

Object and methods of the research. An experimental study was performed on 50 mongrel white rats. An acute aseptic inflammation was simulated in 45 animals by intraperitoneal injection of 5 mg of λ -carrageenan ("Sigma", USA) in 1 ml of isotonic sodium chloride solution per 1 animal.

The animals were withdrawn from the experiment on the 1st, 2nd, 3rd, 5th, 7th, 10th, 14th, 21st and 30th day by an overdose of thiopental anesthesia. The study of red bone marrow was carried out in accordance with the established terms of the experiment.

A set of biological material for conducting research was conducted under conditions of a small operating vivarium of the HSEEU "Ukrainian Medical Stomatological Academy" in accordance with the "Rules for the Use of Laboratory Experimental Animals" (2006, Annex 4) and the Helsinki Declaration on the Humane Approach to Animals. For the study, preparations of red bone marrow in rats were used.

After gathering, the material was fixed in a 10% solution of neutral formalin with subsequent decalcification in a solution of ethylenediaminetetraacetic acid, with keeping to pH 7.4. For gaining observation preparations, sections with thickness up to 5 micrometer were stained with hematoxylin and eosin. Subsequently, the preparations were treated using standard sets of NPK "Lektinoest" (Lviv) in the development of lectins 1:50 by the method.

Results of the research and their discussion. In the study of histological preparations of the red bone marrow, it was found that the stroma of the hematopoietic organ was represented by trabecula of bone and reticulum tissue in which a large number of blood vessels were located, mainly sinusoidal capillaries without a basement membrane, but with pores in the endothelium.

Parenchyma of the red bone marrow was represented by islets in which the programmed differentiation of hematopoietic cells were detected at different stages of it. The erythroblastic islet of the red bone marrow is a structural-functional unit of the organ, and was presented by the cells of the erythroblast series, namely: proerythroblast, basophilic, polychromatophilic, and orthochromic erythroblasts, which were located around macrophages.

The basis of the method of carbohydrate specificity study is the use of lectins, which allows to elaborate morphofunctional changes in the structural elements in rats under conditions of experimental inflammation, due to the binding of lectins to glucoconjugates that are on the cell surface. It is proved that carbohydrate residues on cellular elements of the erythroblast islet periodically change the intensity of accumulation of receptors to one or another lectin, determine the different functions of the same lectin or system of lectins.

Key words: experimental inflammation, erythroblast islet, carbohydrate residues, lectins.

Рецензент – проф. Проніна О. М.
Стаття надійшла 25.01.2018 року

DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-1-142-264-269

УДК 591.185.6

Булик Р. Є., Бурачик А. І., Булик Т. С., Кричанська М. І., Власова К. В.

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ПЕРЕТВОРЕННЯ В НЕЙРОНАХ СУПРАХІАЗМАТИЧНИХ ЯДЕР ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ НА ФОНІ РІЗНОЇ ТРИВАЛОСТІ ОСВІТЛЕННЯ І ПРИ КОРЕКЦІЇ МЕЛАТОНІНОМ

Вищий державний навчальний заклад України

«Буковинський державний медичний університет» (м. Чернівці)

bulyk@bsmu.edu.ua

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота є фрагментом НДР «Стрес-індуковані морфофункціональні та біохімічні зміни структур хроноперіодичної і гепато-ренальної систем у свавців» (№ державної реєстрації 0114 U002472).

Вступ. Невід'ємною і фундаментальною властивістю живої матерії є ритмічні коливання. Поміж інших параметрів середовища фотоперіод – найнадійніший і найстабільніший синхронізувальний чинник для гомойотермних тварин, у т. ч. для людини [2,6]. Світловий сигнал сприймається сітківкою ока, звідки по ретиногіпоталамічному шляху надходить у супрахіазматичні ядра (СХЯ) гіпоталамуса [3]. Цим ядрам відводять роль основного водія (пейсмейкера) циркадіанних ритмів у головному мозку свавців [4,10,11]. Від СХЯ інформація про освітленість

поширюється до шишкоподібної залози (епіфіза мозку) [2,9]. Залоза є частиною системи, яка здатна сприймати зміни рівня освітленості навколишнього середовища і забезпечувати циркадіанні ритми функціонування організму, зокрема шляхом синтезу її провідного індолу – мелатоніну [1,5]. Показано, що секреція мелатоніну підпорядкована чітким добовим варіаціям з мінімальним значенням вдень і максимумом близько 02.00 год [8]. Пригнічення синтезу мелатоніну світлом використовується як експериментальна модель гіпопінеалізму і характеризується перш за все мелатоніновою недостатністю [3,7].

Незважаючи на підвищену зацікавленість науковців до вивчення ритмічної діяльності біологічних органів та систем, багато питань щодо морфофункціональної характеристики структури головного

мозку, причетних до формування біологічних ритмів, залишаються нез'ясованими.

Мета дослідження. З'ясувати морфофункціональний стан супрахізматичних ядер гіпоталамуса шурів у різні проміжки доби та активність нейронів вказаних ядер залежно від тривалості світлового режиму та уведення мелатоніну.

Об'єкт і методи дослідження. Експерименти проведені на 48 статевозрілих самцях безпородних білих шурів масою 0,15-0,18 кг. Тварин утримували в твариннику при сталій температурі, вологості повітря та вільному доступі до води й їжі. Об'єктом дослідження в експериментальних тварин обрано морфофункціональний стан супрахізматичних ядер гіпоталамуса у різні проміжки доби.

Експериментальні тварини поділені на 4 серії досліджень, у кожній з яких забір біоматеріалу здійснювався о 14.00 і о 02.00 год. Обрані терміни проведення експерименту зумовлені різною функціональною активністю шишкоподібної залози у вказані часові періоди доби.

Тварини 1-ої серії (інтактні) перебували 7 діб за умов звичайного світлового режиму – LD (світло з 08.00 до 20.00 год, освітленість люмінесцентними лампами на рівні кліток 500 Лк). Тварини серії № 2 перебували за умов постійної темряви (DD – моделювання гіперфункції шишкоподібної залози) протягом 7-ми діб. Тварини серії № 3 перебували за умов постійного освітлення (LL – моделювання гіпофункції шишкоподібної залози) протягом 7-ми діб. Тваринам серії № 4, які знаходилися за умов експерименту, як і шури серії № 3, щоденно о 19.00 год внутрішньоочеревинно вводили мелатонін (Sigma, США, ступінь очищення – 99,5%) у дозі 1,0 мг/кг, у 1,0 мл розчинника (0,9% розчин етанолу на фіз. розчині).

Після закінчення 7-денного експерименту наступного дня о 14.00 і о 02.00 год здійснювали виведення тварин з експерименту шляхом одномоментної декапітації під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг внутрішньоочеревинно). Мозок тварин негайно вилучали і поміщали в 10,0% розчин формаліну в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,2) на 20 годин при кімнатній температурі. Після стандартної процедури зневоднення і просочення хлороформом і парафіном, мозок заливали в парфін. Всі етапи експерименту проведено з дотриманням основних положень Ухвали Першого національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (2001 р.), Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях (від 18.03.1986 р.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 р.) і наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р. та законам України.

Для вивчення морфометричних і денситометричних характеристик нейронів гіпоталамуса гістологічні зрізи завтовшки 7 мкм депарафінували в ксилолі, проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%), тричі відмивали у дистильованій воді і впродовж 48 год забарвлювали за

методом Ейнарсона в розчині галоціанін-хромових галунів, що дозволяє виявляти нуклеїнові кислоти (здебільшого РНК) у нейронах. Потім зрізи тричі відмивали у дистильованій воді дегідрували у висхідних концентраціях етанолу (70%, 96%, 100%), ксилолі і поміщали в канадський бальзам.

Морфометричний і денситометричний аналіз нейронів гіпоталамуса і кількісний аналіз вмісту в них РНК проводили на комп'ютерній системі цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) у видимому спектрі. Зображення, що отримується на мікроскопі AXIOSKOP, за допомогою відеокамери COHU-4922 (COHU Inc., США) вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) та оцифровували за денситометричною шкалою з 256 градаціями сірого кольору. Аналіз зображення проводили в напівавтоматичному режимі за допомогою пакету прикладних програм VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина): інтерактивно визначалися межі тіла нейрона, його ядра і ядерця, а потім автоматично реєструвалися площа виділених об'єктів, концентрація і вміст РНК у них. На підставі цих показників обчислювалася концентрація РНК у виділених структурах нейронів K_i (умовних одиниць оптичної щільності - ООЩ): $K_i = |I_g(D_i/D_0)|$, і вміст РНК у виділених структурах нейронів C_i (одиниць оптичної щільності - ООЩ): $C_i = S_i * |I_g(D_i/D_0)|$, де S_i - площа структури нейрона (мкм²), а D_i і D_0 - показники оптичної щільності виділених структур нейронів і міжклітинної речовини («фон» препарату), відповідно.

Отримані експериментальні дані обробляли на персональних комп'ютерах пакетом прикладних і статистичних програм VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина) і EXCEL-2003 (Microsoft Corp., США). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (\bar{x}), її дисперсії і помилки середньої (S_x). Для виявлення вірогідності відмінностей результатів досліджень у дослідних і контрольних групах тварин визначали коефіцієнт Стьюдента (t), після чого знаходили вірогідність відмінності вибірок (p) і довірчий інтервал середньої за таблицями розподілу Стьюдента. Вірогідними вважали значення, для яких $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Вивчення морфометричних характеристик нейронів СХЯ гіпоталамуса виявило добову динаміку показників. Так, порівняно з денним періодом (14.00 год), до 02.00 год відмічали вірогідне збільшення (на $7,8 \pm 1,5\%$) площі тіла нейронів СХЯ, зумовлене зростанням площі ядра клітин. У свою чергу, збільшення площі ядра нейрона зумовлено вірогідним зростанням площі його ядерця, яка становила $5,60 \pm 0,237$ мкм² (табл.). При цьому в нічний період спостереження ядерно-цитоплазматичне співвідношення (ЯЦС) в пейсмейкерних нейронах становило $1,7 \pm 0,05\%$ і вірогідно більше, ніж у денний проміжок. Водночас питомий об'єм ядра нейрона зростав на $18,2 \pm 2,16\%$, а цитоплазми, навпаки, знижувався на $14,2 \pm 1,98\%$. Ці зміни поєднувалися зі зростанням концентрації РНК у самих ядрах на $7,3 \pm 1,5\%$, а також

Морфометрична характеристика нейронів супрахіазматичного ядра гіпоталамуса у щурів, які перебували за різного світлового режиму та при уведенні їм мелатоніну на фоні цілодобового освітлення ($\bar{x} \pm Sx$)

Серії експериментальних тварин	Площа нейрона, мкм ²	Площа ядра нейрона, мкм ²	Площа ядерця нейрона, мкм ²	Площа цитоплазми нейрона, мкм ²
Інтактні, 14.00 год	44,28 ± 0,557	25,38 ± 0,397	4,42 ± 0,069	18,90 ± 0,336
Інтактні, 02.00 год	47,72 ± 1,262 [*]	30,24 ± 0,897 [*]	5,60 ± 0,237 [*]	17,70 ± 0,658
Постійна темрява, 14.00 год	38,05 ± 0,730 [*]	25,91 ± 0,610	4,51 ± 0,106	11,33 ± 0,372 [*]
Постійна темрява, 02.00 год	37,27 ± 0,361 ^{**}	22,48 ± 0,258 ^{**}	3,92 ± 0,045 ^{**}	14,80 ± 0,202 ^{**}
Постійне освітлення, 14.00 год	34,87 ± 0,640 [*]	21,81 ± 0,526 [*]	3,80 ± 0,092 [*]	13,10 ± 0,384 [*]
Постійне освітлення, 02.00 год	31,41 ± 0,323 ^{**} ***	20,79 ± 0,258 ^{**}	3,62 ± 0,046 ^{**}	10,64 ± 0,191 ^{**} ***
Постійне освітлення + мелатонін, 14.00 год	37,06 ± 0,489	23,59 ± 0,374 ^{***}	4,10 ± 0,065 ^{***}	13,50 ± 0,239
Постійне освітлення + мелатонін, 02.00 год	33,95 ± 0,894 ^{****}	21,82 ± 0,672	3,80 ± 0,118	12,18 ± 0,529 ^{****}

Примітка: вірогідні ($p < 0,05$) зміни щодо параметрів: інтактних тварин о 14.00 год (*), о 02.00 год (**), та щурів, які перебували за умов постійного освітлення, о 14.00 год (***), о 02.00 год (****).

із підвищенням концентрації РНК в ядерцях нейронів на 8,5±1,7% і займаній ними площі на 26,5±5,2% порівняно з денним періодом.

Отримані величини свідчать про підвищення функціональної і синтетичної активності нейронів СХЯ в інтактних щурів у нічний період доби. З метою виявлення місця і ролі провідного нейроендокринного трансдуктора білядобового періодизму – шишкоподібної залози у функціонуванні головного пейсмейкера циркадіанних ритмів – СХЯ гіпоталамуса, нами проведено морфометричне дослідження вказаних ядер в умовах постійної темряви та тривалого освітлення (моделювання тваринам епіфізарної гіпер- та гіпофункції відповідно).

Моделювання підвищеної мелатонін-продуцувальної активності шишкоподібної залози характеризувалося більш глибокими проявами о 02.00 год, порівняно з 14.00 год. Зокрема, морфометрично це проявлялося вірогідним зниженням площі нейрона на 21,89±3,26%. Це зумовлено вірогідним зменшенням площ його ядра на 25,67±4,01% та цитоплазми – на 16,38±2,12% (**табл.**). ЯЦС становило 1,52±0,018 од, питомий об'єм ядра нейрона – 60,30±0,679%, а цитоплазми – 39,70±0,561% від загального об'єму клітини.

Не зважаючи на зменшення площі нейрона і його компонентів, у нічний період в ядрі реєстрували вірогідно вищу концентрацію РНК (на 11,43±1,25%) внаслідок її підвищення в ядерці (на 12,24±1,09%). Паралельно вміст РНК вірогідно зростав і в цитоплазмі, де її концентрація становила 0,168±0,0018 о.о.щ.

Можна припустити, що світлова депривація (індукція синтезу мелатоніну) по-різному впливає на морфофункціональну активність пейсмейкера циркадіанного періодизму, а саме: вдень – знижує, а вночі – підвищує її. Крім того, епіфізарна гіперфункція

призводить до згладжування добових відмінностей площі тіла нейрона СХЯ, що спостерігали в інтактних тварин.

Відомо, що серед зовнішніх геофізичних чинників найвагоміший вплив на роботу циркадіанного пейсмейкера здійснює тривалість світлового дня. Утримання тварин за гіперілюмінованих умов викликало більші зміни морфофункціонального стану нейронів СХЯ гіпоталамуса о 02.00 год, ніж о 14.00 год. Так, площа нейрона становила 31,41±0,323 мкм² і була меншою за аналогічну як в інтактних тварин, так і в щурів з гіперфункцією шишкоподібної залози. Вказані зміни супроводжувалися зменшенням площі ядра на 31,25±3,14% та цитоплазми – на 39,89±4,17% (**табл.**). Крім того, привертало увагу істотне порушення добового ритму морфофункціональної активності нейронів СХЯ. Більшу їх активність, на відміну від тварин, які перебували за звичайного освітлення, реєстрували у денний період спостереження, свідченням чого є отримані параметри морфометричної характеристики ядер, що вивчаються (**табл.**).

Характеризуючи нічний етап експерименту, відзначимо вузький діапазон коливань концентрації РНК у нейронах СХЯ о 14.00 та 02.00 год щодо тварин, яких утримували за звичайного фотоперіоду. У цьому добовому проміжку показники концентрації нуклеїнової кислоти вірогідно не відрізнялися від таких в інтактних тварин. Порівняно з денним періодом (14.00 год), до 02.00 год виявлено вірогідне зменшення на 9,92±1,05% площі тіла нейронів СХЯ, зумовлене зниженням площі цитоплазми клітин. Це стало причиною зростання в нічний період спостереження ЯЦС в пейсмейкерних нейронах, яке становило 1,95±0,024 од. і вірогідно більше (на 16,77±2,15%), ніж у денний проміжок (**табл.**).

Отримані результати дозволяють дійти висновку, що довжина фотоперіоду суттєво впливає на фоторецепторні пейсмейкери СХЯ. На відміну від постійної темряви, тривалий світловий режим викликає більш виражений десинхронізм морфофункціональної активності нейронів СХЯ, знижує концентрацію РНК в їх структурах, в основі чого, ймовірно, лежить порушення синтезу відповідних імуноспецифічних білків, які залучені в реалізацію часової організації біологічних систем.

З метою корекції порушень, що викликані тривалим перебуванням щурів при постійному освітленні, як один з препаратів нами застосований екзогенний мелатонін у дозі 1,0 мг/кг у 1,0 мл розчинника.

При введенні індолу на фоні світлового стресу проявлялася тенденція наближення до норми показників площі нейронів СХЯ о 14.00 год. Зокрема, під час денного етапу дослідження площа нейрона складала $37,06 \pm 0,489$ мкм², ядра – $23,59 \pm 0,374$ мкм², ядерця – $4,10 \pm 0,065$ мкм². Вказані зміни розмірів нейрона СХЯ о 14.00 год спричинені збільшенням площі ядра та ядерця (табл.). ЯЦС перебувало в межах $1,75 \pm 0,028$ од, питомий об'єм ядра – $63,65 \pm 1,019\%$, а цитоплазми $36,35 \pm 0,657\%$. Щодо концентрації РНК у структурах пейсмейкерних клітин СХЯ, то у денний інтервал дослідження в ядрі вона становила $0,273 \pm 0,0029$ о.о.щ., в ядерці – $0,378 \pm 0,0031$ о.о.щ., у цитоплазмі – $0,146 \pm 0,0015$ о.о.щ (рис. 1).

Якщо у тварин, яким ін'єкували мелатонін на фоні епіфізарної гіпофункції, о 14.00 год збільшення площі нейрона вірогідно відбувалося внаслідок зростання площі ядра та ядерця, то о 02.00 год – у результаті збільшення площі цитоплазми (на $14,5 \pm 1,8\%$) щодо щурів, яким індол не вводили (табл.).

Вірогідно вищим у цей добовий період було ЯЦС стосовно вказаної групи порівняння. При цьому концентрація РНК у компонентах нейронів СХЯ також синхронно підвищувалася. Однак, за морфометричними вимірюваннями, застосування гормону не нормалізувало циркадний ритм активності пейсмейкерних клітин досліджуваних ядер (рис. 2). Це дає підстави стверджувати, що світловий режим є домінуючим чинником у формуванні добових ритмів.

Висновки

1. Тривалість фотоперіоду істотно впливає на фоторецепторні пейсмейкери СХЯ. Постійний світловий режим десинхронізує морфофункціональну ак-

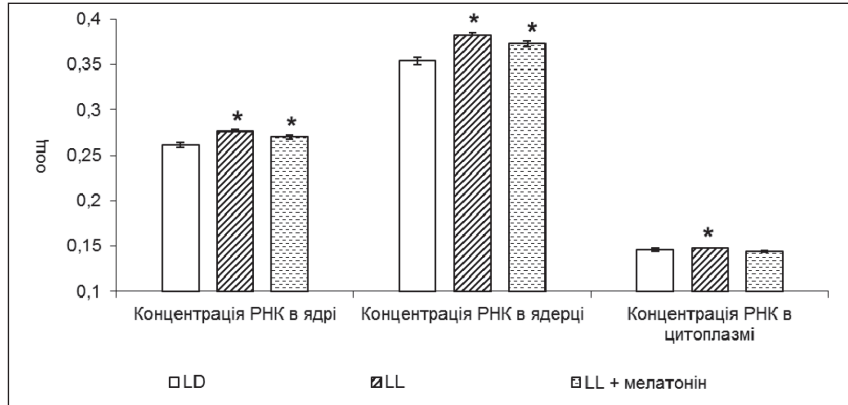


Рис. 1. Вплив мелатоніну на концентрацію РНК у нейронах супрахізматичного ядра гіпоталамуса о 14.00 год у щурів, що перебували за умов постійного освітлення.

Примітка: * – вірогідні ($p < 0,05$) зміни щодо інтактних тварин.

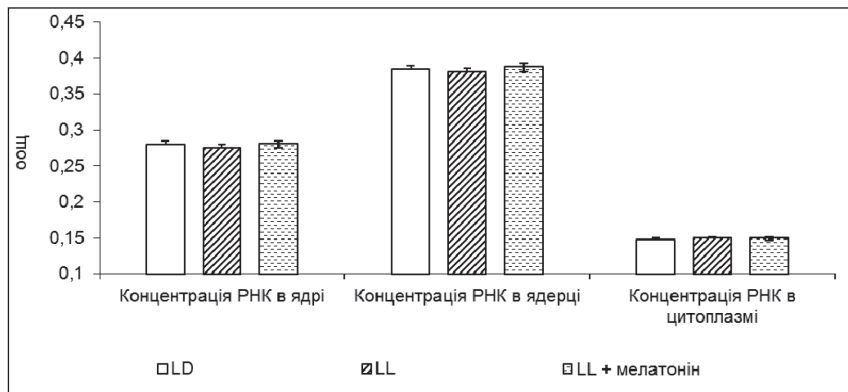


Рис. 2. Концентрація РНК у нейронах супрахізматичного ядра гіпоталамуса о 02.00 год за умов введення щурам мелатоніну на фоні постійного освітлення.

тивність нейронів СХЯ, змінює у концентрацію РНК в їх ядрі, ядерці та цитоплазмі.

2. Уведення мелатоніну тваринам, що перебували за умов постійного освітлення нормалізувало показники площі нейронів СХЯ і концентрацію у них РНК. Водночас, індол не коригував ритм активності нейронів СХЯ, який залишався таким, як і при тривалому фотоперіоді та інверсним щодо тварин, які перебували за звичайного світлового режиму.

3. Рівень концентрації РНК у нейронах СХЯ о 02.00 год не зазнає вірогідних змін у групах порівняння, що, ймовірно, свідчить про залучення додаткових ендогенних механізмів, спрямованих на збереження функціональної активності нейронів у вказаний період, коли в нормі в організмі продукується найбільше мелатоніну.

Перспективи подальших розробок у даному напрямку. У подальшому планується досліджувати вплив синтетичних пептидів шишкоподібної залози на морфофункціональну активність нейронів СХЯ для глибшого пізнання механізмів участі вказаних структур у регуляції циркадних ритмів ссавців.

Література

1. Arushanyan EB, Shchetinin EV. Melatonin kak universal'nyy modulyator lyubykh patologicheskikh protsessov. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2016;60(1):79-88. [in Russian].
2. Zamorskiy II, Sopova IYu, Khavinson VKh. Vliyanie melatonina i epitalamina na sodержanie produktov belkovoy i lipidnoy peroksidatsii v kore bol'shikh polushariy i gippokampe mozga kryv v usloviyakh ostroy gipoksii. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 2012;154(7):59-61. [in Russian].
3. Karachentsev Yul, Kravchun NA, redaktory. Pineal'naya zheleza i gipotalamo-gipofizarno-tireoidnaya sistema: vozrastnye i khronobiologicheskie aspekty. Khar'kov: S. A. M.; 2013. 264 s. [in Russian].
4. Tymofii OV, Bulyk Rle, Lomakina YuV. Efekty melatoninu na ekspresiiu hena c-Fos u neuronakh medial'noho dribnoklitynnoho sub'iadra paraventrykuliarnoho yadra lipotalamusa schuriv pry zminenomu fotoperiodi. Svit medytsyny ta biolohii. 2015;2(Ch 2):187-91. [in Ukrainian].
5. Khavinson VKh, Lin'kova NS, Kvetnoy IM, Kvetnaya TV, Polyakova VO, Korf Kh. Molekulyarno-kletochnye mekhanizmy peptidnoy regulyatsii sinteza melatonina v kul'ture pinealotsitov. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 2012;153(2):223-6. [in Russian].
6. Bedont JL, Blackshaw S. Constructing the suprachiasmatic nucleus: a watchmaker's perspective on the central clockworks. Front Syst Neurosci. 2015 May 8;9:74.
7. Bedont JL, Newman EA, Blackshaw S. Patterning, specification, and differentiation in the developing hypothalamus. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2015 Sep-Oct;4(5):445-68.
8. Fernandez F, Lu D, Ha P, Costacurta P, Chavez R, Heller HC, et al. Circadian rhythm. Dysrhythmia in the suprachiasmatic nucleus inhibits memory processing. Science. 2014 Nov 14;346(6211):854-7.
9. Kiessling S, Sollars PJ, Pickard GE. Light stimulates the mouse adrenal through a retinohypothalamic pathway independent of an effect on the clock in the suprachiasmatic nucleus. PLoS One [Internet]. 2014 Mar 21 [cited 2018 Jan 11];9(3):e92959.
10. Venegas C, García JA, Escames G, Ortiz F, López A, Doerrier C, et al. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. J Pineal Res. 2012 Mar;52(2):217-27.
11. Wang JL, Lim AS, Chiang WY, Hsieh WH, Lo MT, Schneider JA, et al. Suprachiasmatic neuron numbers and rest-activity circadian rhythms in older humans. Ann Neurol. 2015 Aug;78(2):317-22.

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ПЕРЕТВОРЕННЯ В НЕЙРОНАХ СУПРАХІАЗМАТИЧНИХ ЯДЕР ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ НА ФОНІ РІЗНОЇ ТРИВАЛОСТІ ОСВІТЛЕННЯ І ПРИ КОРЕКЦІЇ МЕЛАТОНІНОМ

Булик Р. Є., Бурачик А. І., Булик Т. С., Кривчанська М. І., Власова К. В.

Резюме. У статті розглядаються результати досліджень морфофункціонального стану нейронів супрахіазматичних ядер (СХЯ) гіпоталамуса щурів за умов різної тривалості світлового режиму. Встановлено, що у тварин, які зазнали тривалої експозиції світлом, істотно порушувався добовий ритм морфофункціональної активності нейронів СХЯ гіпоталамуса. Більшу їхню активність, на відміну від щурів, які перебували за звичайного освітлення та світлової депривації, реєстрували у денний період спостереження. Уведення мелатоніну тваринам, що перебували за умов постійного освітлення, нормалізувало показники площі нейронів СХЯ і концентрацію в них РНК. Водночас, індол не коригував ритм активності нейронів СХЯ, який залишався таким, як і при тривалому фотоперіоді та інверсним щодо тварин, які перебували за звичайного світлового режиму.

Ключові слова: супрахіазматичні ядра, гіпоталамус, морфофункціональний стан, світлова деривація, постійне освітлення, мелатонін.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ В НЕЙРОНАХ СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКИХ ЯДЕР ГИПОТАЛАМУСА КРЫС НА ФОНЕ РАЗНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ОСВЕЩЕНИЯ И ПРИ КОРЕКЦИИ МЕЛАТОНИНОМ

Булик Р. Е., Бурачик А. И., Булик Т. С., Кривчанская М. И., Власова К. В.

Резюме. В статье рассматриваются результаты исследований морфофункционального состояния нейронов супрахиазматических ядер гипоталамуса крыс в условиях разной длительности светового режима. Установлено, что у животных, подвергшихся длительной экспозиции освещением, существенно нарушался суточный ритм морфофункциональной активности нейронов супрахиазматических ядер гипоталамуса. Большую их активность, в отличие от крыс, находящихся при обычном освещении и световой депривации, регистрировали в дневной период наблюдения. Введение мелатонина животным, содержащимся в условиях постоянного освещения, нормализовало показатели площади нейронов СХЯ и концентрацию в них РНК. В то же время, индол не корригировал ритм активности нейронов СХЯ, который оставался таким, как и при длительном фотопериоде и инверсным относительно животных, находящихся при обычном световом режиме.

Ключевые слова: супрахиазматические ядра, гипоталамус, морфофункциональное состояние, световая депривация, постоянное освещение, мелатонин.

MORPHOFUNCTIONAL TRANSFORMATION IN NEURONS OF THE SUPRACHIASMATIC NUCLEI OF RATS' HYPOTHALAMUS ON THE BACKGROUND OF DIFFERENT ILLUMINATION PERIODS AND IN CASE OF MELATONIN CORRECTION

Bulyk R. Ye., Burachyk A. I., Bulyk T. S., Kryvchanska M. I., Vlasova K. V.

Abstract. The mechanisms of circadian pacemaker activity of the neuronal systems of the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus are currently deeply researched. Meanwhile, information concerning the

effects of photoperiod modifications (in particular, constant illumination or darkness) on the activities of specific structures involved in the formation of circadian rhythms remains relatively limited.

We studied the circadian variation of the cytometric characteristics of the SCN neurons of the hypothalamus of rats, as well as the effect of experimental changes in the light-dark cycle and the introduction of exogenous melatonin on these parameters. Three groups of animals (12 rats each) were kept for seven days under normal photoperiod conditions (12.00L:12.00D, control group), constant illumination and prolonged darkness. The fourth group of animals under experimental conditions, like the rats of group 2, was injected intraperitoneally with melatonin (Sigma, USA, purification rate 99.5%) at a dose of 1.0 mg/kg, 1.0 ml of solvent (0.9% ethanol solution in NSS).

To study the morphometric characteristics of the hypothalamus neurons, multiple histological sections were prepared according to a standard procedure on a rotary microtome. Morphometric analysis of the hypothalamus neurons and quantitative analysis of the content of RNA in them were performed on a VIDAS-386 computer system for digital image analysis in the visible region.

Analyzing the morphometric parameters of neurons of the hypothalamus, the daily dynamics of the indices was found. Thus, compared to the daytime period (2 p.m.), till 2 a.m., a significant increase (by $7.8 \pm 1.5\%$) of the body area of the SCN neurons was observed, due to the growth of the cell nucleus area. In turn, the increase in the area of the nucleus of the neuron was due to the probable increase in the area of its nucleolus, which was $5.60 \pm 0.237 \mu\text{m}^2$. At the same time, at night, the observed nuclear-cytoplasmic ratio (N:C Ratios) in pacemaker neurons were $1.7 \pm 0.05\%$ and significantly higher than in the daytime. While also, the specific volume of the neuron core increased by $18.2 \pm 2.16\%$, and the cytoplasm, on the contrary, decreased by $14.2 \pm 1.98\%$. These changes were combined with an increase in the concentration of RNA in the nuclei by $7.3 \pm 1.5\%$, as well as with an increase in the concentration of RNA in the nucleoli of neurons by $8.5 \pm 1.7\%$ and the area occupied by them by $26.5 \pm 5.2\%$ in comparison with the daily period.

With the purpose of deeper analysis of place and role of the pineal gland, the leading neuroendocrine transducer of circadian periodism, in the functioning of the hypothalamus SCN, we performed morphometric studies of these nuclei under conditions of constant darkness and prolonged illumination (simulation of epiphyseal hyper- and hypofunction of the animals, respectively). In contrast to light deprivation, a prolonged light regime causes a more pronounced desynchronization of the morphofunctional activity of SCN neurons, reduces the concentration of RNA in their structures, which is likely to be caused by a disruption of the synthesis of corresponding c-Fos proteins involved in the realization of the temporal organization of biological systems.

In order to correct the disruptions caused by prolonged stay of rats at constant illumination, we used exogenous melatonin as one of the drugs. With the introduction of melatonin on the background of light stress, a tendency to normalization of the parameters of the area of SCN neurons appeared about 2 p.m. In particular, during the day step of the study, the area of the neuron was $37.06 \pm 0.49 \mu\text{m}^2$, of the nucleus, $23.59 \pm 0.374 \mu\text{m}^2$, of the nucleolus, $4.10 \pm 0.065 \mu\text{m}^2$. The indicated change in the size of the SCN neuron at 2 p. m. was due to an increase in the area of the nucleus and nucleolus. N:C Ratios were within 1.75 ± 0.028 units, the specific volume of the nucleus was $63.7 \pm 1.02\%$, and the cytoplasm was $36.4 \pm 0.66\%$. As to the concentration of RNA in the structures of the pacemaker cells of the SCN, it was 0.273 ± 0.0029 AU in the daytime step in the nucleus, 0.378 ± 0.0031 AU in the nucleolus, and 0.146 ± 0.0015 AU in the cytoplasm.

As to the comparison group, the N:C Ratio was proved higher in this diurnal period. At the same time, the concentration of RNA in the components of the SCN neurons also increased synchronously. However, according to morphometric measurements, the use of the hormone did not normalize the circadian rhythm of activity of pacemaker cells of the investigated nuclei. This gives grounds to state that the light regime is the dominant factor in the development of circadian rhythms.

Key words: suprachiasmatic nuclei, hypothalamus, morphofunctional condition, light deprivation, permanent lighting, melatonin.

Рецензент – проф. Білаш С. М.

Стаття надійшла 26.01.2018 року