

УДК 591.185.6

Р.Є. Булик, К.В. Власова, А.І. Бурачик

ОЦІНКА ДИНАМІКИ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ НЕЙРОНІВ СУПРАХІАЗМАТИЧНИХ ЯДЕР ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ЗА ТРИВАЛОЇ СВІТЛОВОЇ ЕКСПОЗИЦІЇ

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці

Резюме. У статті розглядаються результати досліджень морфофункціонального стану нейронів вентролатеральної зони супрахіазматичних ядер гіпоталамуса щурів за умов різної тривалості світлового режиму. Встановлено, що у тварин, які зазнали тривалої експозиції світлом, істотно порушувався добовий ритм морфофункціональної активності нейронів супрахіазматич-

них ядер гіпоталамуса. Більшу їхню активність, на відміну від щурів, які перебували за звичайного освітлення, реєстрували в денний період спостереження.

Ключові слова: супрахіазматичні ядра, морфофункціональний стан, постійне освітлення.

Вступ. Невід'ємною і фундаментальною властивістю живої матерії є ритмічні коливання. Поміж інших параметрів середовища фотоперіод – найнадійніший і найстабільніший синхронізувальний чинник для гоміотермних тварин, у т.ч. для людини [8-11]. Світловий сигнал сприймається сітківкою ока, звідки по ретиногіпоталамічному шляху надходить у супрахіазматичні ядра (СХЯ) гіпоталамуса [1, 14]. Цим ядрам відводять роль основного водія ритму (пейсмейкера) циркадіанних ритмів у головному мозку ссавців [2, 4, 15]. Від СХЯ інформація про освітленість поширюється до шишкоподібної залози (пінеальної залози, епіфіза мозку) [3, 12, 13]. 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 [7]. Показано, що секреція мелатоніну підпорядкована чітким добовим варіаціям із мінімальним значенням вдень і максимумом близько 02.00 год [6]. Пригнічення синтезу мелатоніну світлом використовується як експериментальна модель гіпопінеалізму і характеризується перш за все мелатоніновою недостатністю [5].

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 супрахіазматичних ядер гіпоталамуса щурів у різні проміжки доби та активність нейронів вказаних ядер залежно від тривалості світлового режиму.

Матеріал і методи. Експерименти проведені на статевозрілих самцях безпородних білих щурів масою 0,15-0,18 кг. Тварин утримували у твариннику при сталій температурі, вологості повітря та вільному доступі до води і їжі. Об'єктом дослідження в експериментальних тварин обрано морфофункціональний стан нейронів вентролатеральної зони супрахіазматичних ядер гіпоталамуса.

Експериментальні тварини поділені на дві серії досліджень, у кожній з яких забір біоматері-

алу 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-ї серії (інтактні) перебували за умов постійного освітлення (LL – моделювання гіпофункції шишкоподібної залози) протягом 30 діб.

Тварини серії №2 перебували за умов постійного освітлення (LL – моделювання гіпофункції шишкоподібної залози) протягом 30 діб.

Після закінчення 30-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 внутрішньоочеревино). 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 парафін. 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 ЄС № 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.

Для вивчення морфометричних і денситометричних характеристик нейронів вентролатеральної зони гіпоталамуса гістологічні зрізи завтовшки 7 мкм депарафінували в ксилолі, проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %), тричі відмивали в 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 в 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 пакета 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): $K_i = |lg(D_i / D_0)|$, і вміст РНК у виділених структурах нейронів C_i (одиниць оптичної щільності - ООЩ): $C_i = S_i * |lg(D_i / D_0)|$, де S_i - площа структури нейрона (мкм^2), 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 нейро-

нів СХЯ виявило добову динаміку показників. Так, порівняно з денним періодом (14.00 год), до 02.00 год відзначали вірогідне збільшення на $7,8 \pm 1,4$ % площі тіла нейронів СХЯ внаслідок збільшення площі ядра клітин (табл.). Ці зміни поєднувалися зі зростанням концентрації РНК у самих ядрах на $7,3 \pm 1,5$ %, а також із підвищенням концентрації РНК в ядерцях нейронів на $8,5 \pm 1,7$ % і займаній ними площі на $26,7 \pm 4,9$ % порівняно з денним періодом (рис. 1 і 2). При цьому вірогідних змін з боку площі цитоплазми і концентрації в ній РНК не реєстрували. Отримані величини свідчать про помірне підвищення функціональної і синтетичної активності нейронів СХЯ в інтактних щурів у нічний період доби. Таким чином, у щурів у нормі реєструється добовий ритм морфофункціональної активності нейронів СХЯ з максимумом активності в нічний час (до 02.00 год).

За умов утримування тварин при постійному режимі освітлення вірогідно зменшувалися щодо аналогічних величин в інтактних щурів площі нейрона ($21,3 \pm 2,4$ %; $34,2 \pm 3,9$ %), його цитоплазми ($30,7 \pm 3,5$ %; $39,9 \pm 4,6$ %), ядра ($14,0 \pm 1,7$ %; $31,2 \pm 3,4$ %) та ядерця ($14,0 \pm 1,8$ %; $35,2 \pm 3,8$ %) о 14.00 год та 02.00 год відповідно (табл.). Потрібно також відзначити той факт, що у щурів, які зазнали тривалої експозиції світлом, істотно порушувався добовий ритм морфофункціональної активності нейронів СХЯ. Більшу їх активність, на відміну від тварин, які перебували за звичайного освітлення, реєстрували в денний період спостереження, свідченням чого є отримані параметри морфометричної характеристики ядер, що вивчаються (табл.). Також о 14.00 год вірогідно збільшувалися концентрації РНК в ядрі на $5,8 \pm 0,7$ % та ядерці ($7,1 \pm 0,9$ %), а в цитоплазмі РНК залишилася на рівні, близькому до величин інтактних тварин. Характеризуючи нічний етап експерименту, відзначимо зміщення вищої концентрації РНК у нейронах СХЯ з 14.00 на 02.00 год щодо тварин, яких утримували за звичайного фотоперіоду. Величини концентрації РНК у структурах і цитоплазмі нейронів СХЯ у

Таблиця

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

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	$44,28 \pm 0,564$	$25,38 \pm 0,399$	$4,42 \pm 0,069$	$18,90 \pm 0,336$
Інтактні, 02.00 год	$47,72 \pm 1,262$	$30,24 \pm 0,897$	$5,60 \pm 0,237$	$17,70 \pm 0,658$
Постійне освітлення, 14.00 год	$34,87 \pm 0,690^*$	$21,81 \pm 0,526^*$	$3,80 \pm 0,092^*$	$13,10 \pm 0,384^*$
Постійне освітлення, 02.00 год	$31,41 \pm 0,323^{*****}$	$20,79 \pm 0,258^{**}$	$3,62 \pm 0,046^{**}$	$10,64 \pm 0,191^{*****}$

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 (***)

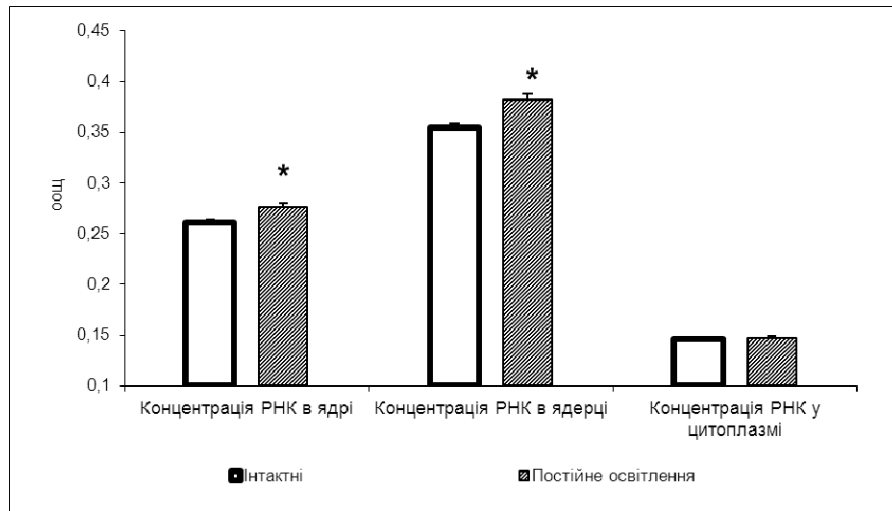


Рис. 1. Концентрація РНК у нейронах супрахіазматичного ядра гіпоталамуса о 14.00 год у щурів, що перебували за умов постійного освітлення

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

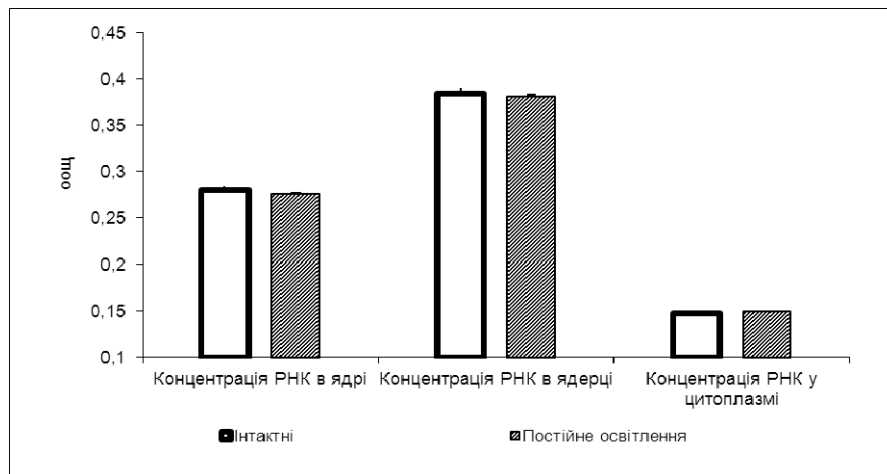


Рис. 2. Концентрація РНК у нейронах супрахіазматичного ядра гіпоталамуса о 02.00 год на фоні постійного освітлення

цьому добовому проміжку вірогідно не відрізнялися від таких в інтактних тварин (рис. 2).

Отримані результати дозволяють дійти висновку, що довжина фотоперіоду суттєво впливає на фоторецепторні пейсмейкери СХЯ. Тривалий світловий режим десинхронізує морфофункціональну активність нейронів СХЯ, змінює концентрацію РНК, що, ймовірно, порушує синтез відповідних імуноспецифічних білків, які залучені в реалізацію часової організації біологічних систем.

Висновок

Тривалість фотоперіоду істотно впливає на фоторецепторні пейсмейкери супрахіазматичних ядер. Постійний світловий режим десинхронізує морфофункціональну активність нейронів супрахіазматичних ядер, змінює концентрацію рибонуклеїнової кислоти в їх ядрі, ядерці та цитоплазмі.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується досліджувати вплив постійної темряви (гіперфункції шишкоподібної залози) на морфофункціональну активність нейронів вентролатеральної зони СХЯ для глибшого

пізнання механізмів участі вказаних структур у регуляції циркадіанних ритмів щурів.

Література

1. Арушанян Э.Б. Мелатонин как универсальный модулятор любых патологических процессов / Э.Б. Арушанян, Е.В. Щетинин // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 2016. – № 1. – С. 79-88.
2. Арушанян Э.Б. Современные представления о роли супрахіазматических ядер гипоталамуса в организации суточного периодизма физиологических функций / Э.Б. Арушанян, А.В. Попов // Успехи физиол. наук. – 2011. – № 4. – С. 39-58.
3. Губин Д.Г. Молекулярные механизмы циркадианних ритмов и принципы развития десинхроноза / Д.Г. Губин // Успехи физиол. наук. – 2013. – № 4. – С. 65-87.
4. Губин Д.Г. Динамика временной организации в процессе старения. Т.1. Центральные и периферические механизмы / Д.Г. Губин, Д.Д. Вайнерт // Успехи геронтол. – 2015. – № 2. – С. 257-268.
5. Каладзе Н.Н. Изучение физиологических, патогенетических и фармакологических эффектов мелатонина: итоги и перспективы / Н.Н. Каладзе, Е.М. Соболева, Н.Н. Скоромная // Здоровье ребенка. – 2010. – № 2 (23). – С. 156-166.
6. Пішак В.П. Молекулярно-генетичні механізми часової організації фізіологічних функцій у ссавців (огляд літератури та власні дані) / В.П. Пішак, Р.С. Булик,

- К.В. Власова // Бук. мед. вісник. – 2014. – Т. 18, № 1. – С. 172-177.
7. Световой десинхронизм и риск злокачественных новообразований у лабораторных животных: состояние проблемы / В.Н. Анисимов, И.А. Виноградова, А.В. Букалев [и др.] // Вопр. онкол. – 2014. – № 2. – С. 15-27.
 8. Цфасман А.З. Суточный ритм мелатонина при депривации ночного сна / А.З. Цфасман, В. Д. Горохов, Д. В. Алпаев // Пробл. эндокринологии. – 2013. – № 2. – С. 40-44.
 9. Bedont J.L. Constructing the suprachiasmatic nucleus: a watchmaker's perspective on the central clockworks / J.L. Bedont, S. Blackshaw // Front Syst. Neurosci. – 2015. – Vol. 9. – P. 74.
 10. Benarroch E.E. Suprachiasmatic nucleus and melatonin: reciprocal interactions and clinical correlations / E.E. Benarroch // Neurology. – 2008. – Vol. 71, № 8. – P. 594-598.
 11. Circadian rhythm. Dysrhythmia in the suprachiasmatic nucleus inhibits memory processing / F. Fernandez, D. Lu, P. Ha [et al.] // Science. – 2014. – Vol. 346, № 6211. – P. 854-857.
 12. Divergent roles of clock genes in retinal and suprachiasmatic nucleus circadian oscillators / G.X. Ruan, K.L. Gamble, M.L. Risner [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 6. – P. 38985.
 13. Kiessling S. Light stimulates the mouse adrenal through a retinohypothalamic pathway independent of an effect on the clock in the suprachiasmatic nucleus / S. Kiessling, P. J. Sollars, G. E. Pickard // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 3. – P. 929-959.
 14. Mattam U. Differential role of melatonin in restoration of age-induced alterations in daily rhythms of expression of various clock genes in suprachiasmatic nucleus of male Wistar rats / U. Mattam, A. Jagota // Biogerontology. – 2014. – Vol. 15, № 3. – P. 257-268.
 15. Sudhof T.C. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle / T.C. Sudhof // Neuron. – 2013. – Vol. 80. – P. 675-690.

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НЕЙРОНОВ СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКИХ ЯДЕР ГИПОТАЛАМУСА КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОЙ СВЕТОВОЙ ЭКСПОЗИЦИИ

Р.Е. Булык, Е.В. Власова, А.И. Бурачик

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, регистрировали в дневной период наблюдения.

Ключевые слова: супрахиазматические ядра, морфофункциональное состояние, постоянное освещение.

THE DYNAMICS APPRECIATION OF THE MORPHOFUNCTIONAL NEURON'S CONDITION IN RAT'S HYPOTHALAMIC SUPRACHIASMATIC NUCLEI UNDER PROLONGED LIGHT EXPOSURE

R. Ye. Bulyk, K. V. Vlasova, A. I. Burachyk

Abstract. The paper deals with the results of studies of the morphofunctional condition of neurons of the rat suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus under conditions of a diverse duration of the photoperiod. It has been established that the diurnal rhythm of the morphofunctional activity of neurons of the hypothalamic suprachiasmatic nuclei subjected to a prolonged exposure to light was essentially disturbed. Their higher activity, in contrast to rats exposed to ordinary lighting, was recorded during the day light observation.

Key words: suprachiasmatic nuclei, morphofunctional condition, permanent lighting.

Higher State Educational Institution of Ukraine "Bukovinian State Medical University" (Chernivtsi)

Рецензент – проф. В.В. Кривецкий

Buk. Med. Herald. – 2016. – Vol. 20, № 4 (80). – P. 30-33

Надійшла до редакції 12.11.2016 року