

МОРФОМЕТРИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕНТРОЛАТЕРАЛЬНОГО ПРЕОПТИЧНОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА ЗРІЛИХ ЩУРІВ ЗА МОДИФІКАЦІЇ ФОТОПЕРІОДУ

Р.Є. Булик, В.Р. Йосипенко

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

Ключові слова:

цикл сон-неспання,
вентролатеральне
преоптичне ядро
гіпоталамуса,
хроноритми, мелатонін.

Буковинський медичний
вісник. Т.24, № 2 (94).
С. 9-14.

DOI:

10.24061/2413-0737.
XXIV.2.94.2020.36

E-mail: v.yosypenko@
bsmu.edu.ua

Мета роботи - з'ясувати вплив різного світлового режиму та мелатоніну на морфометричну характеристику вентролатерального преоптичного (передньо-бічного передзорового) ядра гіпоталамуса зрілих щурів.

Матеріал і методи. Дослідження проведені на 28 білих нелінійних щурах-самцях. Тварини першої серії перебували за умов нормального світлового режиму. Тварини другої серії перебували за умов світлової депривації. Щури третьої серії знаходилися в умовах світлової стимуляції. Четверту серію склали щури, яким на фоні світлової стимуляції внутрішньоочеревинно вводили мелатонін (Sigma, USA) у дозі 0,5 мг/кг маси тіла щура. Морфологічний аналіз нейронів здійснювали за допомогою мікроскопа ЛЮМАМ-8.

Результати. Виявлено асиметричне розташування вентролатеральних преоптичних ядер гіпоталамуса в півкулях головного мозку. Ядро на зрізах мало кулясту чи овальну форму, а нейрони були однотипними як у центрі, так і на периферії ядра. Дані морфометричної характеристики вказують, що в досліджуваних показниках (середній об'єм нейроцита, середній об'єм ядер нейроцитів, ядерно-цитоплазматичне співвідношення в нейроцитах та середня кількість нейроцитів на стандартній площині гістологічного зрізу) чітких розбіжностей у середніх тенденціях не виявлено.

Висновки. Проведені гістологічні дослідження вказують на те, що досліджувані показники не реагують на умови освітлення та час доби, коли моделювалися відповідні умови експерименту.

Ключевые слова: цикл сон-бодрствование, вентролатеральное преоптическое ядро гипоталамуса, хроноритмы, мелатонин.

Буковинский медицинский вестник. Т.24, № 2 (94). С. 9-14.

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕНТРОЛАТЕРАЛЬНОГО ПРЕОПТИЧЕСКОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА ЗРЕЛЫХ КРЫС ПРИ МОДИФИКАЦИИ ФОТОПЕРИОДА

Р. Е. Булик, В. Р. Йосипенко

Цель работы - изучить влияние различного светового режима и мелатонина на морфометрическую характеристику вентролатерального преоптического (передне-бокового предзрительного) ядра гипоталамуса зрелых крыс.

Материал и методы. Исследования проведены на 28 белых нелинейных крысах-самцах. Животные первой серии находились в условиях нормального светового режима. Животные второй серии содержались при световой депривации. Крысы третьей серии пребывали в условиях световой стимуляции. Четвертую серию составляли крысы, которым на фоне световой стимуляции внутрибрюшинно вводили мелатонин (Sigma, USA) в дозе 0,5 мг/кг массы тела крысы. Морфологический анализ нейронов осуществляли с помощью микроскопа ЛЮМАМ-8.

Результаты. Обнаружено асимметричное расположение вентролате-

Оригінальні дослідження

ральных преоптических ядер гипоталамуса в полушариях головного мозга. Ядро на срезах мало шаровидную или овальную форму, а нейроны были однотипными как в центре, так и на периферии ядра. Данные морфометрических характеристик указывают, что в исследуемых показателях (средний объем нейрона, средний объем ядер нейроцитов, ядерно-цитоплазматическое соотношение в нейронах и среднее количество нейроцитов на стандартной плоскости гистологического среза) четких различий в средних тенденциях не обнаружено.

Выводы. Проведенные гистологические исследования указывают на то, что исследуемые показатели не реагируют на условия освещения и время суток, когда моделировались соответствующие условия эксперимента.

Key words: sleep-wake cycle, ventrolateral preoptic nucleus of hypothalamus, chronorhythms, melatonin.

Bukovinian Medical Herald. V.24, № 2 (94). P. 9-14.

MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF THE VENTROLATERAL PREOPTIC NUCLEUS OF THE HYPOTHALAMUS OF MATURE RATS UNDER MODIFICATION OF THE PHOTOPERIOD

R.Ye. Bulyk, V.R. Yosypenko

The aim of the study is to investigate the effect of different light regimes and melatonin on the morphometric characteristics of the ventrolateral preoptic (anterior-lateral preoptic) nucleus of the hypothalamus of mature rats.

Material and methods. The experiments were performed on 28 white non-linear male rats. Animals in the first series were under normal light conditions. Animals of the second series were under light deprivation. The rats of the third series were under light stimulation. The fourth series were rats under light stimulation and intraperitoneally injection of melatonin (Sigma, USA) at a dose of 0.5 mg/kg of body weight. Morphological analysis of neurons was performed using a LUMAM-8 microscope.

Results. The asymmetric location of ventrolateral preoptic nuclei of the hypothalamus in the cerebral hemispheres has been revealed. The nucleus on the sections had a spherical or oval shape, and the neurons were the same in the center and periphery of the nucleus. The morphometric data indicate that in the studied parameters (average neurocyte volume, average neurocyte nucleus volume, the nuclear-cytoplasmic ratio in neurocytes, and average neurocyte count in the standard histological slice plane), no clear differences were observed in the mean trends.

Conclusions. The histological examinations indicate that the studied parameters do not respond to the light conditions and time of day when the corresponding experimental conditions were simulated.

Актуальність. Нормальний сон – один з “трех китів” здоров’я, поруч з правильним харчуванням та фізичною активністю. Більшість людей проводить уві сні близько третини свого життя [1]. Відомо, що в головному мозку, який нормально функціонує, зниження рівня активності (засинання) – це не пасивний [2], а складний фізіологічний процес, що потребує взаємодії різних ділянок головного мозку [1]. Існують структури головного мозку, які активуються при зниженні рівня активності – структури сну. Основним із них є передній гіпоталамус [2], який сьогодні відносять до найважливіших гіпногенних центрів. Особливо важливу роль у регуляції циклу сон-неспанья відіграє вентролатеральне преоптичне (передньо-бічне пе-

редзорове) ядро гіпоталамуса [3]. Попередні дослідження показали, що нейрони вентролатерального преоптичного ядра іннервують ключові регіони головного мозку, які відповідають за період неспанья [4]. Нейрони вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса експресують безпосередньо генний продукт c-Fos, можливий маркер нейронної активності, пропорційно часу, проведеному уві сні. Це дозволяє припустити, що активність вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса може сприяти, підтримувати або посилювати сон [5], а ураження даного ядра призводить до розвитку безсоння [4].

Важливою структурою, що регулює цикл сон-неспанья, є шишкоподібна залоза, яка виділяє гормон мелатонін

[6]. У людини ритм виділення мелатоніну синхронізований зі звичними годинами сну [7]. У темновий період доби його концентрація у крові в 5 – 10 разів вища, ніж удень; рівень починає підвищуватися у вечірній час, сягаючи максимуму вночі – о 02.00 – 04.00, а потім поступово спадає і з 07.00 до 20.00 залишається низьким [8].

Зниження тривалості та якості сну посилює денну сонливість і поступово призводить до широкого спектра змін нервових та нейроендокринних функцій, включаючи підвищений рівень стресу, когнітивні та обмінні порушення, ослаблення імунітету, підвищення ризику виникнення онкологічних та серцево-судинних захворювань [9]. Надлишкова світлова стимуляція та активність людини в нічний час – найпоширеніші причини порушення ритму сон-неспанья [10], що веде до розвитку десинхронозу [8].

Незважаючи на інтенсивне вивчення структур, які беруть участь у регуляції циклу сон-неспанья, відомості щодо морфометричної характеристики вендролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса за різного режиму освітлення та уведення екзогенного мелатоніну носять фрагментарний і суперечливий характер.

Мета дослідження. З'ясувати вплив різного світлового режиму та мелатоніну на морфометричну характеристику вендролатерального преоптичного (передньо-бічного передзорового) ядра гіпоталамуса зрілих щурів.

Матеріал і методи. Дослідження проведені на 28 білих нелінійних щурах-самцях. Лабораторні тварини розподілені на чотири серії досліджень. Тварини першої серії (інтактні) перебували за умов нормального світлового режиму (світло з 08.00 по 20.00, освітленість на рівні кліток 500Лк за допомогою люмінесцентних ламп). Тварини другої серії перебували за умов світлової депривації (цілковита темрява 24 години на добу). Щури третьої серії знаходилися в умовах світлової стимуляції (світло 24 години на добу). Четверту серію склали щури, яким на фоні світлової стимуляції внутрішньоочередивно вводили мелатонін (Sigma, USA) у дозі 0,5 мг/кг маси тіла щура.

Експеримент 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 законами України.

Після завершення 7-денного експерименту на наступний день о 14.00 та о 02.00 виводили лабораторних тварин з експерименту шляхом одномоментної декапітації під етаміналовим наркозом. Вилучений мозок тварин фіксували у 10% розчині нейтрального забуференого формаліну впродовж 48 годин, після чого проводили процедуру зневоднювання у висхідній батареї спиртів та парафінову заливку при температурі 56оС. Парафінові зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином. Морфологічний аналіз нейронів здійснювали за допомогою мікроскопа ЛЮМАМ-8, отримані результати фіксували за допомогою цифрового фотоапарата Olympus C740UZ.

Аналіз кількісних показників цифрових зображень проводили за допомогою копії ліцензійної комп'ютерної програми ВидеоТест – Размер 5.0 (СанктПетербург, Росія, 2000 г.). Враховуючи нормальний розподіл даних (за критерієм Shapiro-Wilk) різницю в середніх тенденціях між групами дослідження оцінювали за допомогою параметричного критерію Стьюдента (непарний для незалежних вибірок, двобічний). Враховуючи малий об'єм вибірок, що порівнювалися, додатково застосували непараметричний критерій Mann-Whitney, що давав значення вірогідності, близькі до критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Під час гістологічних досліджень вендролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса щурів враховували його розташування, розміри та внутрішню структуру. Так, у гістологічний зріз потрапляло або одне (праве чи ліве), або було видно одне ядро в зоні його найбільшого діаметра, а інше ядро було розрізано тангенціально. Це дозволяє стверджувати, що розташування вендролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса є асиметричним, хоча обидва ядра наявні в півкулях головного мозку. Вендролатеральне преоптичне ядро гіпоталамуса на зрізах мало кулясту або овальну форму, а нейрони мали однотипну будову, незалежно від їх розташування.

При забарвленні гематоксиліном і еозином нейрони вендролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса мали забарвлене у темний колір ядро овальної або полігональної форми з гострими кутами, а цитоплазма, навпаки, була світлою. Наведена характеристика дозволила виміряти такі цитометричні параметри, як розміри ядра та клітини в цілому, а також обрахувати похідні параметри, зокрема, ядерно-цитоплазматичне співвідношення. Окрім цього, щільність розташування нейроцитів у вендролатеральному преоптичному ядрі гіпоталамуса була рівномірною, що дозволило вимірювати кількість нейроцитів на одиницю площі вендролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса



Рис. Гістологічний зріз вендролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса (конттури ядра позначені стрілками) інтактного зрілого щура. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.10х. Ок.10х (оптичне збільшення x100)

Оригінальні дослідження

у будь-якій його ділянці – у центрі чи на периферії.

Середні дані (середня арифметична та її похибка) щодо вказаних морфометричних показників за звичайних умов освітлення наведені в таблиці 1.

З наведених у таблиці 1 даних видно, що при звичайному режимі освітлення в різні години доби експерименту по зазначених показниках розбіжностей у середніх тенденціях не виявлено.

За умов світлової депривації всі тенденції, що

описані для щурів, яких утримували за звичайного світлового режиму, збереглися (табл. 2).

Розбіжностей у середніх тенденціях у щурів, що перебували за умов цілодобової темряви, порівняно зі щурами, яких утримували за звичайного світлового режиму, не виявлено ($p > 0,05$).

Вказані тенденції збереглися і за умов світлової стимуляції (табл. 3), і за умов світлової стимуляції й уведення мелатоніну (табл. 4).

Таблиця 1

Окремі морфометричні показники вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса щурів за умов нормального світлового режиму

Показник	Година дослідження	
	14.00	02.00
Середній об'єм нейронів (мкм ³)	1148±12,9	1151±12,1
Середній об'єм ядер нейронів (мкм ³)	424±10,2	426±10,0
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення в нейронах	0,369±0,0028	0,370±0,0025
Середня кількість нейронів на стандартній площині гістологічного зрізу (100×100 мкм ²)	24±0,3	23±0,4

Таблиця 2

Окремі морфометричні показники вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса щурів за умов світлової депривації

Показник	Година дослідження	
	14.00	02.00
Середній об'єм нейронів (мкм ³)	1143±12,6	1145±12,4
Середній об'єм ядер нейронів (мкм ³)	423±10,5	424±10,3
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення в нейронах	0,370±0,0027	0,371±0,0026
Середня кількість нейронів на стандартній площині гістологічного зрізу (100×100 мкм ²)	23±0,6	22±0,6

Таблиця 3

Окремі морфометричні показники вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції

Показник	Година дослідження	
	14.00	02.00
Середній об'єм нейронів (мкм ³)	1152±12,7	1150±12,7
Середній об'єм ядер нейронів (мкм ³)	422±10,6	425±10,3
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення в нейронах	0,366±0,0029	0,369±0,0021
Середня кількість нейронів на стандартній площині гістологічного зрізу (100×100 мкм ²)	25±0,5	23±0,3

Таблиця 4

Окремі морфометричні показники вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну

Показник	Година дослідження	
	14.00	02.00
Середній об'єм нейронів (мкм ³)	1149±12,7	1150±11,9
Середній об'єм ядер нейронів (мкм ³)	424±10,2	426±10,0
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення в нейронах	0,369±0,0024	0,370±0,0027
Середня кількість нейронів на стандартній площині гістологічного зрізу (100×100 мкм ²)	26±0,4	25±0,5

Висновки. 1. Розташування вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса є асиметричним, одно з них знаходиться трохи попереду іншого. 2. Проведені гістологічні дослідження вказують на те, що досліджувані показники не реагують на умови освітлення та час доби, коли моделювалися відповідні умови експерименту.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати досліджень диктують пошуки інших морфологічних методів дослідження, які здатні виявити реакцію нейронів вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса на зміни режиму освітлення. У подальшому планується дослідити морфометричні показники вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса у старих щурів, що дасть змогу проаналізувати характер даних показників у віковому аспекті.

Список літератури

1. Фломин ЮВ. Расстройства сна у пациентов с инсультом: выявление, клиническое значение и современные подходы к лечению. *Международный неврологический журнал*. 2014;1:89-100.

2. Александрова ЕВ, Зайцев ОС, Потапов АА. Нейромедиаторные основы сознания и бессознательных состояний. *Вопросы нейрохирургии*. 2014;78(1):26-31.

3. Оганесян ГА, Аристакесян ЕА, Романова ИВ, Ватаев СИ, Кузик ВВ, Камбарова ДК. Вопросы Эволюции цикла бодрствование-сон. ЧАСТЬ 2: нейромедиаторные механизмы регуляции. *Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера»*. 2013;5(1):97-123.

4. Kroeger D, Absi G, Gagliardi C, Bandaru SS, Madara JS, Ferrari LL, et al. Galanin neurons in the ventrolateral preoptic area promote sleep and heat loss in mice. *Nature Communications*. 2018;9(1):4129.

5. Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE, Lu J, Scammell TE, Saper CB. Afferents to the Ventrolateral Preoptic Nucleus. *J Neurosci*. 2002;22(3):977-90.

6. Кельмансон ИА. Хронопатологические аспекты расстройств сна и когнитивных функций у детей с нарушениями зрения. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2015;60(5):42-50.

7. Brzezinski A, Vangel MG, Wurtman RJ, Norrie G, Zhdanova I, Ben-Shushan A, et al. Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis. *Sleep Med Rev*. 2005;9(1):41-50.

8. Пішак ВП, Булик РЄ, Кривчанська МІ, Громик ОО, Пішак ОВ. Основні фізіологічні властивості мелатоніну. *Інтегративна антропологія*. 2015;1:32-8.

9. Ковальзон ВМ, Дорохов ВВ. Цикл бодрствование-сон и биоритмы человека при различных режимах чередования светлого и темного периода суток. *The journal of scientific articles "Health & education millennium"*. 2013;15(1-4):151-62.

Відомості про авторів

Булик Роман Євгенович – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри медичної біології та генетики Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна.

Йосипенко Владислав Романович – аспірант кафедри медичної біології та генетики Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна.

Сведения об авторах

Булик Роман Евгеньевич - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской биологии и генетики Высшего государственного учебного заведения Украины «Буковинский государственный медицинский

10. Ковальзон ВМ, Долгих ВВ. Регуляция цикла бодрствование-сон. *Неврологический журнал*. 2016;6:316-22.

References

1. Flomin YuV. Rasstroystva sna u patsientov s insul'tom: vyyavlenie, klinicheskoe znachenie i sovremennyye podkhody k lecheniyu [Sleep disorders in stroke patients: detection, clinical importance, and modern treatment approaches]. *Mezhdunarodnyy nevrologicheskiy zhurnal*. 2014;1:89-100. (in Russian).

2. Aleksandrova EV, Zaytsev OS, Potapov AA. Neyromediatornyye osnovy soznaniya i bessoznatel'nykh sostoyaniy [Neurotransmitter foundations of consciousness and the unconscious states]. *Voprosy neyrokhirurgii*. 2014;78(1):26-31. (in Russian).

3. Oganesyanyan GA, Aristakesyan EA, Romanova IV, Vataev SI, Kuzik VV, Kambarova DK. Voprosy evolyutsii tsikla bodrstvovaniya-son. Chast 2: neyromediatornyye mekhanizmy regulyatsii [The evolution of the wakefulness-sleep cycle. Part 2: neurotransmitter regulatory mechanisms]. *Mezhdistsiplinarnyy nauchnyy i prikladnoy zhurnal «Biosfera»*. 2013;5(1):97-123. (in Russian).

4. Kroeger D, Absi G, Gagliardi C, Bandaru SS, Madara JS, Ferrari LL, et al. Galanin neurons in the ventrolateral preoptic area promote sleep and heat loss in mice. *Nature Communications*. 2018;9(1):4129. DOI: 10.1038/s41467-018-06590-7.

5. Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE, Lu J, Scammell TE, Saper CB. Afferents to the Ventrolateral Preoptic Nucleus. *J Neurosci*. 2002;22(3):977-90. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-03-00977.2002.

6. Kel'manson IA. Khronopatologicheskie aspekty rasstroystv sna i kognitivnykh funktsiy u detey s narusheniyami zreniya [Chronopathological aspects of sleep disorders and cognitive functions in children with visual impairment]. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2015;60(5):42-50. (in Russian).

7. Brzezinski A, Vangel MG, Wurtman RJ, Norrie G, Zhdanova I, Ben-Shushan A, et al. Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis. *Sleep Med Rev*. 2005;9(1):41-50. doi: 10.1016/j.smrv.2004.06.004.

8. Pishak VP, Bulyk RІe, Kryvchan'ska MI, Hromyk OO, Pishak OV. Osnovni fiziologichni vlastyivosti melatoninu [Basic physiological properties of melatonin]. *Intehratyvna antropohiia*. 2015;1:32-8. (in Ukrainian).

9. Koval'zon VM, Dorokhov VB. Tsikl bodrstvovaniya-son i bioritmy cheloveka pri razlichnykh rezhimakh cheredovaniya svetlogo i temnogo perioda sutok [The wake-sleep cycle and human biorhythms under different modes of alternating daylight and night time]. *The journal of scientific articles "Health & education millennium"*. 2013;15(1-4):151-62. (in Russian).

10. Koval'zon VM, Dolgikh VV. Regulyatsiya tsikla bodrstvovaniya-son [Regulation of the wakefulness – sleep cycle]. *Nevrologicheskiy zhurnal*. 2016;6:316-22. (in Russian).

Оригінальні дослідження

университет», г. Черновцы, Украина.

Йосипенко Владислав Романович - аспирант кафедры медицинской биологии и генетики Высшего государственного учебного заведения Украины «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы, Украина.

Information about the authors

Bulyk Roman Ye. – Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief of the Department of Medical Biology and Genetics of the Higher State Educational Establishment of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi, Ukraine.

Yosypenko Vladyslav R. – Postgraduate Student of the Department of Medical Biology and Genetics of the Higher State Educational Establishment of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi, Ukraine.

Надійшла до редакції 29.04.2020

Рецензент — проф. Цигикало О.В.

© Р.Є. Булик, В.Р. Йосипенко, 2020
