

УДК 612.826.4:612.017.2

А.І.Бурачик,

Р.Є.Булик

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

ЕФЕКТИ МЕЛАТОНІНУ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ СУПРАХІАЗМАТИЧНИХ ЯДЕР ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ПРИ СВІТЛОВОЙ СТИМУЛЯЦІЇ

Ключові слова: супрахіазматичні ядра гіпоталамуса, постійне освітлення, мелатонін.

Резюме. Досліджено субмікроскопічну організацію пейсмерних клітин вентролатерального відділу супрахіазматичних ядер переднього гіпо-таламуса щурів. За стандартного режиму освітлення (12.00С:12.00Т) ультра-структура пейсмерних нейронів засвідчує про зниження їх функціональної активності у світловий та зростання - у темновий період доби. Тривале освітлення (світлова стимуляція) (24.00С:00Т) призводить до істотного десинхронізу циркадіанного пейсмерера та пригнічення його активності впродовж періоду спостереження. Ін'єкції мелатоніну на фоні тривалого освітлення призвели до нормалізації нейронного складу нейросекреторних клітин СХЯ гіпоталамуса, що особливо виражено о 02.00 год.

Вступ

Фотоперіод - основний часозадавач, який бере участь у синхронізації ритмів соматичних і вісцеральних функцій, а також координації і модуляції механізмів адаптації організму до впливу різних чинників [6,9]. Осцилятором, який контролює у ссавців більшість ритмів, зокрема, циркадіанні (білядобові) ритми, локалізований у пейсмерних нейронах вентролатерального відділу супрахіазматичного ядра (СХЯв) гіпоталамуса [3,4]. Світлова інформація сприймається сітківкою, по ретиногіпоталамічному тракту передається в СХЯв гіпоталамуса і, в подальшому через структури-посередники, надходить до шишкоподібної залози (епіфіза мозку) [8,12]. Секреторними клітинами залози - пінеалоцитами синтезується основний нейрогормон мелатонін [10]. Серед широко кола ефектів гормону визначальним є хроноритморегулювальний [5]. Фізіологічний контроль функції шишкоподібної залози ссавців здійснюється значною мірою світловим режимом [2]. На світлі продукція мелатоніну залозою пригнічується. Постійна темрява стимулює секрецію епіфізарного гормону і таким чином спричинює зміни діяльності циркадіанного пейсмерера, що віддзеркалюється на ультраструктурному рівні [7]. Відомості, що віддзеркалюють ефекти мелатоніну на структурні зміни в супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса при тривалій експозиції, мають фрагментарний характер. Вивчення морфофункціональних аспектів адаптації СХЯ гіпоталамуса щурів при впливі світла та застосування мелатоніну відкриває широкі можливості для розкриття закономірностей організації ритмічної діяльності гіпоталамічних утворень та структурних проявів

компенсаторно-приспосувальних перетворень циркадіанного осцилятора.

Мета дослідження

З'ясувати ефекти мелатоніну на субмікроскопічні перебуду нейросекреторних клітин вентролатерального відділу супрахіазматичних ядер гіпоталамуса в різні добові періоди при постійному освітленні.

Матеріал і методи

Експерименти проведені на 36 статевозрілих самцях безпородних білих щурів масою 0,15-0,18 кг. Тварин утримували в твариннику при сталій температурі, вологості повітря та вільному доступі до води і їжі. Об'єктом дослідження експериментальних тварин обрано ультраструктуру пейсмерних нейронів вентролатерального відділу СХЯ гіпоталамуса.

Експериментальні тварини поділені на три серії, у кожній з яких забір біоматеріалу здійснювали 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 30-ти діб за умов звичайного світлового режиму - LD (світло з 08.00 до 20.00 год, освітленість люмінесцентними лампами на рівні кліток 350 Лк).

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

Тварини третьої серії знаходилися в умовах, як і щури другої серії, проте щоденно о 19.00 год внутрішньоочеревинно вводили мелатонін (Sigma,

США, ступінь очищення - 99,5%) у дозі 0,5 мг/кг, у 1,0 мл розчинника (0,9% розчин етанолу на фізіологічному розчині).

Після закінчення експерименту наступного дня о 14.00 і 02.00 год здійснювали виведення тварин з експерименту шляхом одномоментної декапітації під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг внутрішньоочеревинно).

Для електронно-мікроскопічного дослідження пейсмерних нейронів вСХЯ гіпоталамуса забір матеріалу проводили відповідно до загальноприйнятих правил [11]. Для дослідження з гіпоталамуса вирізали тонку суцільну пластинку товщиною 1-1,5 мм, яка охоплювала супрахізматичні ядра. Цю пластинку фіксували в 2,5% розчині глутаральдегіду, який готували на фосфатному буфері Міллонга з активною реакцією середовища рН 7,2-7,4. Фіксований матеріал перенесли у буферний розчин і промивали протягом 20-30 хв. Після цього впродовж 60 хв здійснювали постфіксацію матеріалу, використовуючи для цього 1% розчин чотириокису осмію на буфері Міллонга. Далі проводили дегідратацію матеріалу в спиртах і ацетоні та заливали в суміш епоксидних смол відповідно до загальноприйнятої методики [11]. Дослідження в нічний період доби здійснювали при слабкому (2 лк) червоному світлі, яке практично не впливає на біосинтез мелатоніну шишкоподібною залозою [1]. Усі етапи експерименту проведено з дотриманням основних вимог Європейської конвенції щодо гуманного ставлення до тварин.

Обговорення результатів дослідження

Субмікроскопічні дослідження СХЯв гіпоталамуса інтактних тварин о 14.00 год показали, що більшість нейросекреторних клітин мають зменшені ядра неправильної форми з неглибокими інвагінаціями каріолеми. Каріо-плазма має грудочки хроматину та щільне осміофільне ядереце. Нейроплазма займає невеликий об'єм, у ній щільно упаковані з невеликим просвітом каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму та цистерни комплексу Гольджі, у складі останнього мало вакуолей і пухирців. Спостерігаються невеликі зі світлим матриксом і дещо зміненими кристами мітохондрії. У нейроплазмі таких нейросекреторних клітин незначна кількість гормональних гранул. Вказана субмікроскопічна організація нейросекреторних клітин віддзеркалює невисоку функціональну активність.

Дослідження ультраструктурної організації СХЯв гіпоталамуса в інтактних тварин о 02.00 год показали, що для нейросекреторних клітин характерні ядра, каріолема яких значно нерівна, має глибокі інвагінації, що збільшує площу взає-

модії ядра і цитоплазми. У каріоплазмі переважає еухроматин, помітні лише невеликі осміофільні грудочки гетерохроматину. У більшості ядер спостерігаються крупні ядереця і багато рибосомальних гранул. Ядерна оболонка має чисельні ядерні пори.

У нейроплазмі більшості нейросекреторних клітин є протяжні (довгі) каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму з вузьким просвітом, а на мембранах органели розташовані рибосоми. Диктіосоми комплексу Гольджі лежать парануклеарно, вони невеликі і мають неширокі цистерни, помірну кількість вакуолей і пухирців, окремі з яких заповнені осміофільним вмістом. Це нейрогормональні гранули, що формуються. В окремих полях зору за невеликого збільшення електронного мікроскопу спостерігається групове (попарне) розташування нейросекреторних клітин. Їх ультраструктура подібна до описаної вище. В аксоні, що відходить від цієї клітини, виявляється більше гормональних гранул, вони інтенсивно осміофільні й невеликі. Така картина вказує на активний функціональний стан пейсмерних клітин СХЯв.

У тварин, які перебували впродовж тижня за умов світлової стимуляції, ультраструктурна організації СХЯв гіпоталамуса о 14.00 год віддзеркалилася наявністю світлих нейросекреторних клітин, які містять крупні ядра округлої форми. У їх каріоплазмі здебільшого виявляється еухроматин та наявні ділянки гетерохроматину (рис. 1). У нейроплазмі нейронів СХЯв встановлені деструктивні зміни органел. Фрагментація і розширення каналців гранулярного ендоплазматичного ретикулуму та цистерн комплексу Гольджі відбувається з утворенням вакуолей. Руйнування крист мітохондрій супроводжується осередковим просвітленням їх матрикса. У таких нейросекреторних клітинах вміст гормональних гранул незначний. Також наявні темні нейросекреторні клітини, для яких характерні пікнотично змінені ядра, що містять осміофільну каріоплазму, інвагінації каріолеми. Їх електроннощільна нейроплазма має деструктивно змінені органели і мало горизонтальних гранул (рис. 1).

За умов 24-годинного освітлення впродовж 7-ми діб субмікроскопічно в СХЯв гіпоталамуса о 02.00 год встановлені нейросекреторні клітини, що мають світлі ядра з нерівними контурами та погано вираженими ядерними порами. У каріолемі обмаль рибосомальних гранул та зрідка спостерігаються ядереця. Нейроплазма підвищеної електронної щільності, нечітко контуруються мембранні органели. Виявлено осередкове розширення каналців гранулярного ендоплазматич-

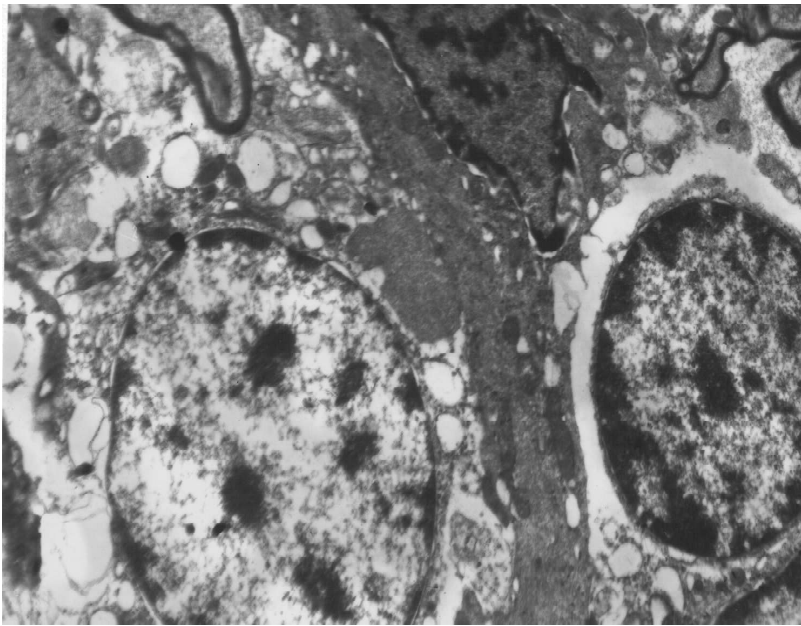


Рис. 1. Субмікроскопічна організація пейсмеркерних клітин вентро-латерального відділу СХЯ гіпоталамуса щурів о 14.00 год за умов постійного освітлення:

1 - інвагінації каріолеми темного нейрочита; 2 - розширені канальці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму; 3 - деструкція комплексу Гольджі. x 7 000

ного ретикулуму з утворенням вакуолеподібних структур. Частина мітохондрій має світлий матрикс і редуковані кристи, гранули гормону поодинокі (рис. 2). Описаний вище ультраструктурний стан засвідчує про зниження функціональної активності структур з елементами деструкції.

Таким чином, виявлені ультрамікроскопічні зміни пейсмеркерних клітин вентролатерального відділу СХЯ гіпоталамуса можна розглядати як віддзеркалення десинхронозу. Згідно з даними літератури, тривале постійне освітлення викликає

гіпофункцію шишкоподібної залози і, відповідно, зниження продукції мелатоніну. Саме пригнічення синтезу цього природнього хронобіотика і є основною причиною функціональної дезорганізації пейсмеркерних клітин вентролатерального відділу СХЯ.

Дослідженням ультраструктури СХЯ гіпоталамуса щурів, яким вводили мелатонін за тривалої світлової стимуляції, встановлено, що частина нейросекреторних клітин мають великі ядра з ядерцями. Каріоплазма таких ядер містить рибо-

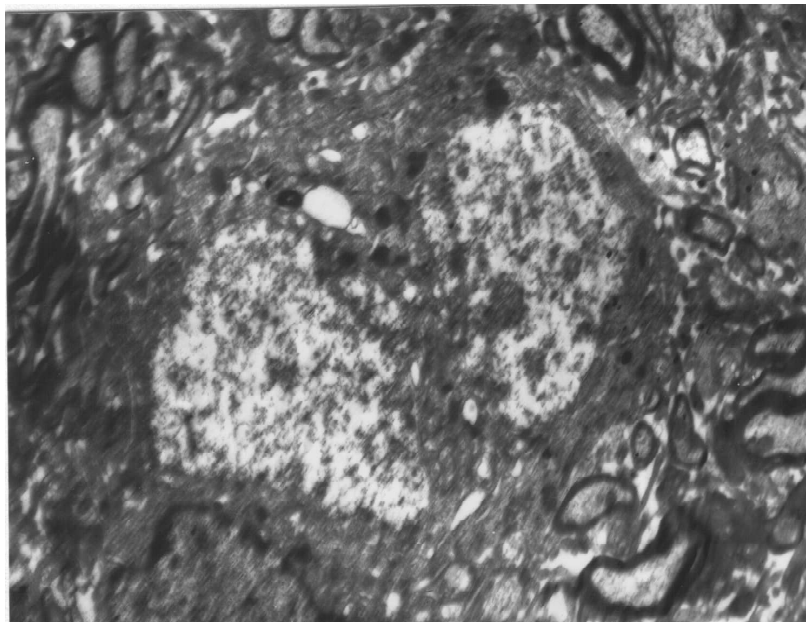


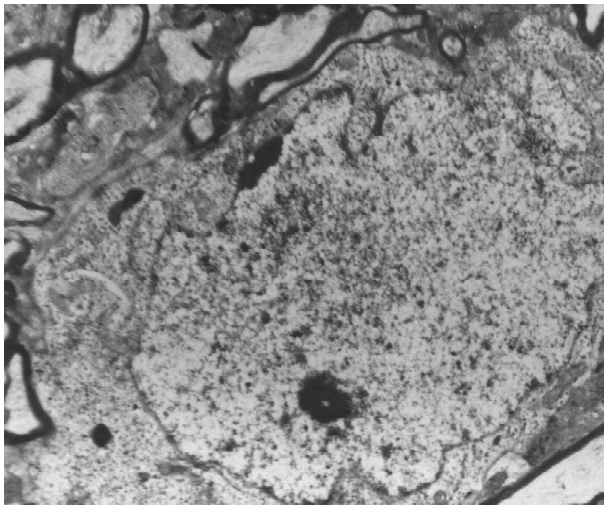
Рис. 2. Зміни ультраструктурної організації нейросекреторних клітин вентролатерального відділу СХЯ гіпоталамуса щура о 02.00 год під дією світлової стимуляції:

1 - сухроматинове ядро; 2 - зруйновані органели; 3 - нейросекреторні гранули; 4 - мієлінові нервові волокна. x 8 000

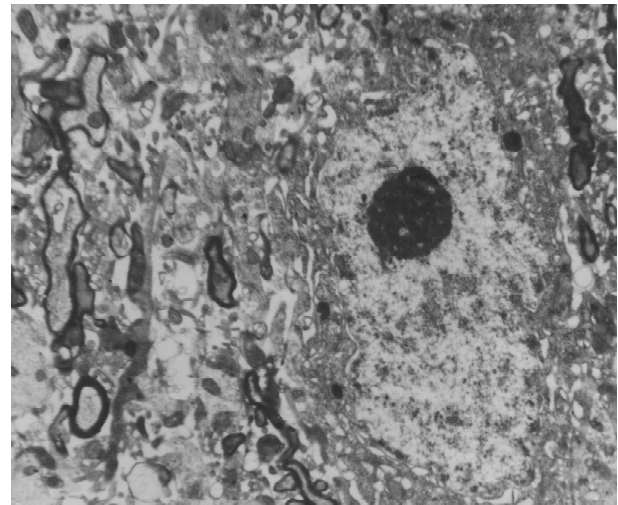
сомальні гранули. Спостерігається нерівномірна каріолема, в ній візуалізуються інвагінації та ядерні пори (рис. 3А).

У нейроплазмі міститься значна кількість рибосом, цистерн і пухирців комплексу Гольджі, каналців гранулярного ендоплазматичного ретикулуму. Помітні скупчення мітохондрій, для них характерна видовжена форма, помірно світлим матрикс і збережені кристи. Однак при дослідженні нейроплазми таких нейросекреторних клітин виявлена незначна кількість гормональних гранул.

З'ясуванням електронномікроскопічної будови СХЯ гіпоталамуса тварин, яким проводили ін'єкції мелатоніну за умов тривалої світлової стимуляції о 02.00 год, виявлено нейросекреторні



А



Б

Рис. 3. Вплив мелатоніну на ультрамікроскопічні зміни нейронів СХЯ гіпоталамуса щурів при світловій стимуляції

А - о 14.00 год, велике ядро (1), інвагінації каріолеми (2), у нейроплазмі багато рибосом (3); х 12 000. Б - о 02.00 год, помірно розширені каналці гранулярної ендоплазматичної сітки (1), гранули гормону (2), інвагінації каріолеми (3), велике ядереце (4); х 7 000.

Таким чином, наведені результати електронномікроскопічної структури пейсмерних нейронів СХЯ гіпоталамуса тварин, які перебували за умов тривалої світлової стимуляції, вказують на виражені порушення структури досліджуваних нейронів. Ін'єкції мелатоніну призвели до нормалізації нейронного складу нейросекреторних клітин вентролатерального відділу СХЯ гіпоталамуса, що особливо помітно проведеними дослідженнями о 02.00 год.

Висновки

1. У тварин, що перебували в умовах стандартного фотоперіоду у нічний період експерименту, структурна організація пейсмерних нейронів супрахізматичних ядер гіпоталамуса віддзеркалює вираженість внутрішньоклітинних синтезувальних процесів. Удень відзначається зниження активності досліджуваних структур.

2. В умовах цілодобового постійного освітлен-

ня ультраструктурна організація вказаних нейронів засвідчує про виражені порушення реактивного характеру з ознаками деструкції органел упродовж періоду спостережень.

Крупні ядереца, значна кількість рибосомальних гранул містяться в каріплазмі. Перинуклеарні проширки нерівномірно розширені. В ядерній оболонці є багато пор. Спостереженням за електроннощільною нейроплазмою встановлено у ній значну кількість рибосом, незначно розширені цистерни комплексу Гольджі, а також каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму. У видовжених мітохондріях помітні невисокої електронної щільності матрикс, водночас кристи чітко контуруються. Незначна кількість гормональних гранул, що наявні в комплексі Гольджі. Такий стан нейросекреторних клітин відповідає зростанню функціональної активності (рис. 3Б).

3. Ін'єкції мелатоніну на фоні постійного освітлення призвели до нормалізації нейронного складу нейросекреторних клітин вентролатерального відділу супрахізматичних ядер гіпоталамуса, що особливо помітно проведеними дослідженнями о 02.00 год.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження морфофункціональних аспектів адаптації СХЯ гіпоталамуса щурів при впливі світла та застосування мелатоніну відкриває широкі можливості для розкриття закономірностей організації ритмічної діяльності гіпоталамічних утворень та структурних проявів компенсаторно-приспосувальних перетворень циркадіанного осцилятора.

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. Герасимов А. В. Функциональная морфология нейронов супрахиазматических ядер крыс после комбинированного воздействия рентгеновского излучения и света / А. В. Герасимов // Радиационная биол. - 2003. - Т. 43, № 4. - С. 389-395. 3. Загорский И. И. Функциональная организация фотопериодической системы головного мозга / И. И. Загорский, В. П. Пишак // Успехи физиол. наук. - 2003. - Т. 34, № 4. - С. 37-53. 4. Логвинов С. В. Циркадианная система и адаптация. Морфофункциональные и радиобиологические аспекты / С. В. Логвинов, А. В. Герасимов. - Томск: Изд-во "Печатная мануфактура", 2007. - 200 с. 5. Перцов С. С. Роль супрахиазматического ядра гипоталамуса в реализации эффектов мелатонина на тимус, надпочечники и селезенку крыс / С. С. Перцов // Бюлл. эксперим. биол. и мед. - 2006. - Т. 141, № 4. - С. 364-367. 6. 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. 7. Benarroch E. E. Suprachiasmatic nucleus and melatonin: reciprocal interactions and clinical correlations / E. E. Benarroch // Neurology. - 2008. - Vol. 71, N8. - P. 594-598. 8. Circadian rhythm. Dysrhythmia in the suprachiasmatic nucleus inhibits memory processing / F. Fernandez, D. Lu, P. Ha [et al.] // Science. - 2014. - Vol. 346, N 6211. - P. 854-857. 9. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations / C. Venegas, J. A. Garcia, G. Escames [et al.] // J. Pineal Res. - 2012. - Vol. 52, N2. - P. 217-227. 10. 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, N3. - P. 929-959. 11. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // J. Cell. Biol. - 1963. - Vol. 17. - P. 208-212. 12. 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, N3. - P. 257-268.

ЭФФЕКТЫ МЕЛАТОНИНА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКИХ ЯДЕР ГИПОТАЛАМУСА КРЫС ПРИ СВЕТОВОЙ СТИМУЛЯЦИИ

А. И. Бурачик, Р. Е. Булик

Резюме. Исследовано субмикроскопическую организацию пейсмекерных клеток вентролатерального отдела супрахиазматических ядер переднего гипоталамуса крыс. При

стандартном режиме освещения (12.00С:12.00Т) ультраструктура пейсмекерных нейронов свидетельствует о снижении их функциональной активности в световой и возростание - в темновой период суток. Длительное освещение (световая стимуляция) (24.00С:00Т) приводит к существенному десинхронизму циркадианного пейсмекера и угнетению его активности в течение периода наблюдения. Инъекции мелатонина на фоне длительного освещения привели к нормализации нейронного состава нейросекреторных клеток супрахиазматических ядер гипоталамуса, что особенно выражено в 02.00 ч.

Ключевые слова: супрахиазматические ядра гипоталамуса, постоянное освещение, мелатонин.

THE EFFECTS OF MELATONIN ON ULTRASTRUCTURE OF THE HYPOTHALAMIC SUPRACHIASMATIC NUCLEI OF RATS UNDER PERMANENT ILLUMINATION

A.I. Burachyk, R.Y. Bulyk

Abstract. The author has studied the submicroscopic organization of pacemaker cells of the ventrolateral segment of the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the rat anterior hypothalamus. With the standard regimen of illumination (12.00L:12.00D) the ultrastructure of pacemaker neurons is indicative of a decline of their functional activity during the light period of a 24-hour period and an elevation during the dark period. A permanent illumination (24.00L:00D) results in essential desynchronization of the circadian pacemaker and an inhibition of its activity during the period of monitoring. Injections of melatonin against a background of permanent illumination resulted in a normalization of the neuronal composition of the neurosecretory cells of the hypothalamic SCN and that is particularly evident at 02.00 a.m.

Key words: hypothalamic suprachiasmatic nuclei, permanent illumination, melatonin.

Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi

Clin. and experim. pathol. - 2017. - Vol. 16, №1 (59). - P. 44-48.

Надійшла до редакції 13.02.2017

Рецензент – проф. В. Ф. Мислицький

© А. И. Бурачик, Р. Е. Булик, 2017