

Р.Є. Булик

Вплив зруйнування супрахіазматичних ядер гіпоталамуса на циркадіанну щільність рецепторів мелатоніну 1А у нейронах гіпокампа щурів

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Ключові слова: рецептори мелатоніну • гіпокамп • супрахіазматичні ядра

Вивчали щільність мелатонінових рецепторів 1А у нейронах гіпокампа щурів за умов зруйнування супрахіазматичних ядер переднього гіпоталамуса. Імуногістохімічно виявлено десинхронізацію циркадіанних ритмів щільності мелатонінових рецепторів 1А нейронів гіпокампа з припиненням добових коливань у середніх тенденціях, а також з підсиленням варіації індивідуальної реакції тварин на моделювання виключення функції супрахіазматичних ядер. Це вказує на забезпечення анатомічними утвореннями останніх ритмічного функціонування центрального відділу лімбічної системи головного мозку - гіпокампа.

Влияние разрушения супрахиазматических ядер гипоталамуса на циркадианную плотность рецепторов мелатонина 1А в нейронах гиппокампа крыс

Р.Е. Булык

Изучали плотность мелатониновых рецепторов 1А в нейронах гиппокампа крыс в условиях разрушения супрахиазматических ядер переднего гипоталамуса. Иммуногистохимически выявлена десинхронизация циркадианных ритмов плотности мелатониновых рецепторов 1А нейронов гиппокампа с прекращением суточных колебаний в средних тенденциях, а также с усилением вариации индивидуальной реакции животных на моделирование исключения функции супрахиазматических ядер. Это указывает на обеспечение анатомическими образованиями последних ритмического функционирования центрального отдела лимбической системы головного мозга - гиппокампа.

Ключевые слова: рецепторы мелатонина • гиппокамп • супрахиазматические ядра*Патологія.* – 2008. – Т.5, №1. – С.54-57

The influence of distruction of the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus on circadian density of melatonin receptors 1A in the neurons of rats hippocampus

R.Ye. Bulyk

Density of melatonin receptors 1A in the neurons of rats hippocampus at distruction of the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus has been studied. Immunohistochemicaly, the desynchronization of circadian rhythms of melatonin receptors 1A density in the hippocampus neurons with cessation of daily allowance oscillations in average tendencies has been revealed as well as intencification of variation of individual animals reaction on the model of suprachiasmatic nuclei functions exclusion. That points out on the providing for anatomic structures of hypothalamus the rhythmic functioning of the central part of cephalon limbic system - hippocampus.

Key words: melatonin receptors • hippocampus • suprachiasmatic nuclei*Pathologia.* 2008;5(1):54-57

Вступ

Циркадіанні ритми ссавців регулюються шляхом зміни активності циркадіанної системи, головними компонентами якої є супрахіазматичні ядра (СХЯ) переднього гіпоталамуса та шишкоподібна залоза [7,10]. СХЯ, як провідний пейсмейкер циркадіанних ритмів, організують єдину часову систему організму, активно підпорядковують своєму впливу інші апарати, що неспроможні самостійно генерувати ритмічні коливання [5,12]. Шишкоподібна залоза – фотонейроендокринний трансдуктор, модулює циркадіанну ритмічність функціонування фізіологічних систем [6]. Основною біологічно активною речовиною, що продукується в залозі є мелатонін [1,16]. Синтез гормону підпорядкований добовій періодичності і сягає максимуму біля 02.00 год, мінімальна його концентрація

реєструється близько полудня [8]. Більшість ефектів мелатоніну, зокрема, синхронізувальна активність, опосередковані його дією на СХЯ [9,12,17]. Це пов'язано з високою щільністю рецепторів індоли в нейронах СХЯ, циркадіанні зміни якої показано в нашій попередній роботі [4]. Специфічні сайти зв'язування мелатоніну ідентифіковані також в інших структурах головного мозку, зокрема в центральному відділі лімбічної системи головного мозку – гіпокампі, що бере безпосередню участь в організації циркадіанної ритміки рухової активності [2,14]. Проте немає повідомлень щодо впливу зруйнування пейсмейкера на щільність рецепторів мелатоніну в нейронах гіпокампа впродовж доби. Характеристика щільності мелатонінових рецепторів у нейронах гіпокампа в циркадіанному аспекті за умов зруйнування СХЯ дасть

зможу визначити вагомість зазначених ядер у регуляції білядодової активності функціонування гіпокампа.

Мета дослідження – з'ясувати щільність мелатонінових рецепторів 1a у нейронах гіпокампа щурів впродовж доби за умов зруйнування супрахіазматичних ядер переднього гіпоталамуса.

Матеріали та методи

Експерименти проведені на 72 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 й їжі. Дослідних тварин поділено на 3 серії (по 4 групи у кожній серії). Щури перебували за умов стандартного світлового режиму – (LD). Люмінесцентні лампи вмикали з 08.00 до 20.00 год, освітленість приміщення на рівні тварин становила 500 лк) впродовж 7-ми діб. З метою виявлення циркадіанних відмінностей мелатонінових рецепторів та враховуючи циклічність продукції мелатоніну етаназію щурів виконували з 6-ти годинним інтервалом (02.00, 08.00, 14.00 та 20.00 год) шляхом одномоментної декапітації на 8-му добу. Експерименти у вечірній та нічний період доби проводили при слабкому (2 лк) червоному світлі, оскільки він практично не впливає на біосинтез мелатоніну шишкоподібною залозою [3]. Всі етапи експерименту проведено з дотриманням основних вимог Європейської конвенції щодо гуманного ставлення до тварин (Страсбург, 1986).

Тваринам 3-ої серії під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг внутрішньоочеревино) виконували двобічну електрокоагуляцію супрахіазматичних ядер переднього гіпоталамуса. Щурів скальпували і проводили трепанацію черепа. Сталеві електроди ($d=0,2$ мм) вводили в головний мозок тварин за стереотаксичними координатами [15]: $AP=-1,0$; $L=0,2$; $H=9,4$. Електрокоагуляцію здійснювали анодним струмом (1 мА) впродовж 20 секунд. Зруйнування супрахіазматичних ядер при електрокоагуляції верифікували на зрізах мозку, які зафарбовували крезил-фіолетом. У 2-ій серії щурам виконували "псевдооперацію" для виключення можливого впливу оперативного втручання на інтерпретацію результатів: електроди вводили в головний мозок за вказаними стереотаксичними координатами, однак при цьому не подавали електричного струму. Щури 1-ої серії залишалися інтактними (без операції).

Для імуногістохімічного дослідження фрагменти великих півкуль мозку з ділянкою гіпокампа фіксували у 10%-му розчині нейтрального забуференого формаліну впродовж 22 год. Після цього виконували прискорене зневоднювання у спиртах висхідної концентрації, заливали у парафін при температурі $+58^{\circ}\text{C}$ з наступним отриманням гістологічних зрізів 5 мкм завтовшки.

З метою виконання імуногістохімічної методики використані поліклональні антитіла до мелатонінових рецепторів 1A виробника Abcam (Велика Британія) та стрептавідинбіотинову систему візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка + діамінобензидин) виробника Chemicon International Inc. (США). Максимально дотримувалися стандартизації протоколу методики для всіх зрізів. Дофарбовування ядер виконували гематоксиліном Майєра.

Кількісні дослідження інтенсивності зафарбовування проводили за наступною схемою. Спочатку, при використанні об'єктива мікроскопа $\times 40$, отримували цифрові копії оптичного зображення, які в подальшому аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми "ВидеоТест - Размер 5.0" (ООО Видеотест, Россия), а саме, проводили комп'ютерну мікроденситометрію. Аналіз здійснювали на підставі вимірювань мікрозондовою методикою у місцях позитивного забарвлення за показником "Оптична щільність" (в умовних одиницях з діапазоном 0-1, причому "0" відповідає абсолютній оптичній прозорості у мікрозонді, а "1" – абсолютній оптичній непрозорості). Інтенсивність специфічного зафарбовування (показник "Оптична щільність") ототожнювали з щільністю мелатонінових рецепторів.

Враховуючи необхідність виконання множинних статистичних порівнянь середніх величин у статистичних вибірках, для визначення відмінностей між сукупностями використано критерій Ньюмена-Кейлса. Розбіжність у варіюванні індивідуальних величин вимірюваного показника оцінювали за допомогою двох відповідних цьому завданню статистичних методів - критерію Фішера та критерію Левене [13].

Результати

Проведені дослідження показали практично повну відсутність істотного впливу псевдооперації на щільність мелатонінових рецепторів 1A у нейронах гіпокампа щурів, що дозволило нам об'єднати дані та сформувати групи контрольних параметрів у досліджувані періоди доби.

Чітке позитивне імуногістохімічне забарвлення визначалось у нейронах гіпокампа у вигляді гранул різних розмірів та оптичної щільності, які концентрувалися переважно по периферії кожної клітини, що вочевидь підтверджує трансмембранне розташування мелатонінових рецепторів 1A. Імуногістохімічного забарвлення ядер не спостерігали – вони профарбовувалися виключно гематоксиліном і характеризувалися типовою для нейронів гіпокампа морфологією.

Мікроскопічна картина "робочого" збільшення (на якому виконували вимірювання) показана на рис. 1. Мікрофотографії (рис. 2) виконані на менших, ніж "робоче" збільшення і носять виключно ілюстративний характер для демонстрації однотипності реакції

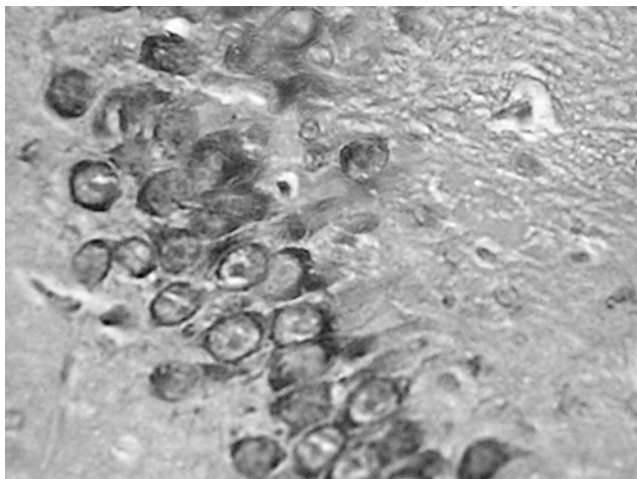


Рис. 1 Мелатонінові рецептори 1А у нейронах гіпокампа щура за умов електролітичного зруйнування супрахізматичних ядер переднього гіпоталамуса*.

Показано "робоче" збільшення. Об. х40, Ок. х10.

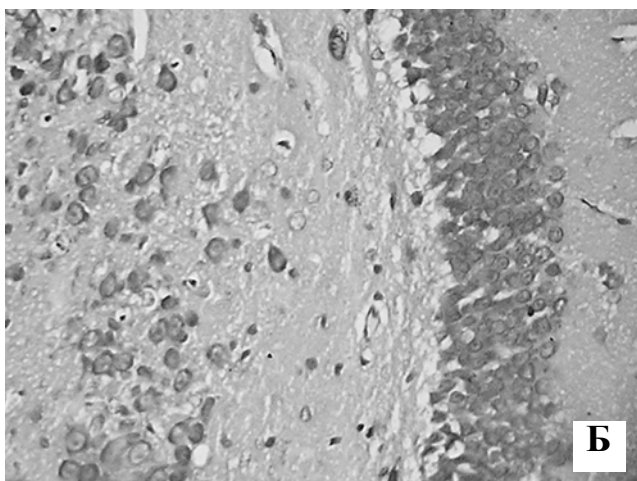
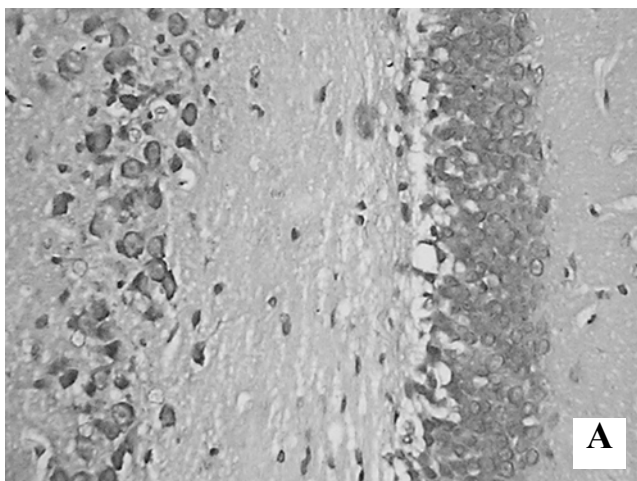


Рис. 2 Щільність мелатонінових рецепторів 1А у нейронах гіпокампа щурів при зруйнуванні супрахізматичних ядер*. Об. х10, Ок. х10.

А) о 02.00 год; Б) о 14.00 год.

мелатонінових рецепторів нейронів гіпокампа різної локалізації.

Слід вказати на те, що при неушкоджених супрахізматичних ядрах у лабораторних щурів згідно з мікроденситометричними даними, які отримані на імуногістохімічних препаратах, відмічали добові коливання щільності мелатонінових рецепторів 1А у гіпокампі. Зокрема, на 02.00 год припадав максимум оптичної щільності забарвлення – $0,37 \pm 0,009$ в.о.опт. щільності, вірогідно нижчу оптичну щільність забарвлення виявлено о 20.00 год ($0,34 \pm 0,011$ в.о.опт. щільності), ще меншу – о 14.00 год ($0,27 \pm 0,008$ в.о.опт. щільності), а мінімальна величина вказаного показника ($0,24 \pm 0,006$ в.о.опт. щільності) зафіксована о 08.00 год доби.

При електролітичному зруйнуванні супрахізматичних ядер вказана циркадіанна закономірність коливання щільності мелатонінових рецепторів 1А у гіпокампі порушувалася. У результаті статистичної обробки отриманих даних обчислені наступні середні величини оптичної щільності специфічного забарвлення на мелатонінові рецептори 1А у нейронах гіпокампа: о 02.00 год – $0,25 \pm 0,013$ в.о.опт. щільності, о 8.00 год – $0,24 \pm 0,012$ в.о.опт. щільності, о 14.00 год – $0,24 \pm 0,011$ в.о.опт. щільності, о 20.00 год – $0,26 \pm 0,012$ в.о.опт. щільності. Згідно з критерієм Ньюмена-Кейлса та Стюдента розбіжностей між середніми величинами не виявлено ($p > 0,05$), не відзначено навіть тенденції до розбіжності ($p > 0,1$). Рис. 2 підтверджує вищевказане.

Обговорення

Таким чином, зміни стану рецепторів мелатоніну 1А у нейронах гіпокампа в експерименті зі зруйнуванням супрахізматичних ядер свідчать про забезпечення останніми анатомічними утвореннями ритмічного функціонування центрального відділу лімбічної системи головного мозку – гіпокампа.

Привертає увагу також те, що у всіх групах дослідження, з моделюванням виключення функції супрахізматичних ядер шляхом їх зруйнування, збільшилося варіювання індивідуальних величин показника "Оптична щільність забарвлення", що підтверджено високою вірогідністю розбіжності варіювання (у діапазоні 0,008-0,026) як згідно з критерієм Фішера, так і з критерієм Левене. Наведений факт вказує на різну індивідуальну реакцію щурів на зруйнування супрахізматичних ядер, що підтверджує суттєву регульовальну роль супрахізматичних ядер переднього гіпоталамуса у формуванні циркадіанної активності гіпокампа ссавців.

Примітка: *- імуногістохімічна методика з поліклональними антитілами до мелатонінових рецепторів 1А та стрептавідинбіотиновою системою візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка + діамінобензидин). Дофарбовування клітинних ядер гематоксилином Майєра.

Висновок

При експериментальному зруйнуванні супрахіазматичних ядер у щурів відбувається десинхронізація циркадіанних ритмів щільності мелатонінових рецепторів 1A нейронів гіпокампа з припиненням добових коливань у середніх тенденціях, а також з підсиленням варіації індивідуальної реакції тварин на моделювання виключення функції супрахіазматичних ядер переднього гіпоталамуса.

Література

1. *Анисимов В.Н.* Мелатонин: перспективы применения для профилактики рака и преждевременного старения // Вестник восстановительной медицины. - 2007. - №1 (19). - С.4-7.
2. *Арушанян Э.Б., Бейер Э.В.* Место гиппокампа в биоритмологической организации поведения // Успехи физиол. наук. - 2001. - Т.32, №1. - С.79-95.
3. *Бондаренко Л.А., Губина-Вакулик Г.И., Сотник Н.Н., Геворкян А.Р.* Влияние постоянного освещения на суточный ритм мелатонина и структуру pineальной железы у кроликов // Пробл. эндокринной патологии. - 2005. - №4. - С.38-45.
4. *Булик Р.С.* Циркадіанні зміни мелатонінових рецепторів 1A у супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса // Інтегративна антропологія. - 2007. - №2. - С.22-24.
5. *Заморский И.И., Пишак В.П.* Функциональная организация фотопериодической системы головного мозга // Успехи физиол. наук. - 2003. - Т.34, №4. - С.37-53.
6. *Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., Малиновская Н.К., Анисимов В.Н.* Мелатонин в норме и патологии. - М.: ИД Медпрактика-М, 2004. - 308 с.
7. *Пишак В.П., Булик Р.С.* Механізми участі шишкоподібної залози в забезпеченні циркадіанної ритмічності фізіологічних функцій // Бук. мед. вісник. - 2006. - Т.10, №4. - С.5-8.
8. *Alarma-Estrany P., Pintor J.* Melatonin receptors in the eye: Location, second messengers and role in ocular physiology // Pharmacol. Ther. - 2007. - Vol.113, N3. - P.507-22.
9. *Arendt J.* Melatonin: characteristics, concerns, and prospects // J. Biol. Rhythms. - 2005. - Vol.20. - P.291-303.
10. *Dubocovich M.L., Markowska M.* Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals // Endocrine. - 2005. - Vol.27, N2. - P.101-110.
11. *Ekmekcioglu C.* Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance // Biomed. Pharmacother. - 2006. - Vol.60, N3. - P.97-108.
12. *Golombek D.A., Ferreyra G.A., Katz M.E. et al.* Neurochemistry of mammalian entrainment: Signal transduction pathways in the suprachiasmatic nuclei // Biol. Rhythm Res. - 2000. - Vol.31, N1. - P.56-70.
13. *Hardle W., Mori Yu., Vieu Ph.* Statistical methods for biostatistics and related fields. - Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. - 372 p.
14. *Musshoff U., Riewenherm D., Berger E. et al.* Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations // Hippocampus. - 2002. - Vol.12, N2. - P.165-73.
15. *Paxinos G.* The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. // Academic Press Inc. - 1986. - 263 p.
16. *Reiter R. J.* Melatonin: clinical relevance // Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. - 2003. - Vol.17, N2. - P.273-285.
17. *Witt-Enderby P., Bennett J., Jarzynka M. et al.* Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms // Life Sci. - 2003. - Vol.72, N2. - P.2183-2198.

Надійшла 12.12.2007 р.

Відомості про авторів:

Булик Роман Євгенович – к.мед.н., доцент кафедри медичної біології, генетики та гістології Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці.

Адреса для листування:

Булик Роман Євгенович, м. Чернівці, вул. Ю. Федьковича, 15. Тел.: (03722) 3-30-21