УДК 612.826.4:612.017.2

Р.Є. Булик, А.І. Бурачик
Кафедра медичної біології та генетики (зав. – проф. Р.Є. Булик) ВДНЗ України "Буковинський державний медичний університет", м. Чернівці

ВПЛИВ ТРИВАЛОГО ОСВІТЛЕННЯ НА СУБМІКРОСКОПІЧНІ ЗМІНИ СУПРАХІАЗМАТИЧНИХ ЯДЕР ГІПОТАЛАМУСА

Резюме. Досліджено субмікроскопічну організацію пейсмекерних клітин вентролатерального відділу супрахіазматичних ядер переднього гіпоталамуса щурів. За стандартного режиму освітлення (12.00С:12.00Т) ультраструктура пейсмекерних нейронів свідчить про зниження їх функціональної активності у світловий та зростання – у темновий період доби. Тривалий світловий стрес (24.00С:00Т) призводить до істотного десинхронозу циркадіанного пейсмекера та пригнічення його активності впродовж періоду спостереження. Моделювання гіпофункції шишкоподібної залози спричинює деструктивні зміни компонентів досліджуваних структур, які більш виражені о 02.00 год.
Ключові слова: супрахіазматичні ядра гіпоталамуса, постійне освітлення.

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 [1, 2]. Осцилятором, який контролює у ссавців більшість ритмів, зокрема циркадіанні (білядобові) ритми, локалізований у пейсмекерних 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 (ШЗ) (епіфіза мозку) [5, 6]. Секреторними клітинами залози – пінеалоцитами синтезується основний нейрогормон мелатонін [7]. Серед широкого кола ефектів гормону визначальним є хронорит-морегулювальний [8]. Фізіологічний контроль функції ШЗ ссавців здійснюється значною мірою світловим режимом [9]. На світлі продукція мелатоніну залозою пригнічується. Постійна темрява стимулює секрецію епіфізарного гормону і таким чином спричинює зміни діяльності циркадіанного пейсмекера, що віддзеркалюється на ультраструктурному рівні [10].

Мета дослідження: з'ясувати вплив постійного освітлення на субмікроскопічні перебудови нейросекреторних клітин вентролатерального відділу супрахіазматичних ядер гіпоталамуса в різні періоди доби.

Матеріал і методи. *Експерименти проведені на 24 статевозрілих самцях безпородних білих щурів масою 0,15-0,18 кг. Тварин утри-мували в твариннику при сталій температурі, вологості повітря та вільному доступі до води і їжі. Об'єктом дослідження в експериментальних тварин обрано пейсмекерні нейрони вентролатерального відділу СХЯ гіпоталамуса.*

Експериментальні тварини розподілені на дві серії, у кожній з яких забір біоматеріалу здійснювався о 14.00 і о 02.00 год. Обрані терміни проведення експерименту зумовлені різною функціональною активністю ШЗ у вказані часові періоди доби.

Тварини першої серії (інтактні) перебували 7 діб за умов стандартного світлового режиму (світло з 08.00 до 20.00 год, освітленість люмінесцентними лампами на рівні кліток 500 лк). Щури другої серії перебували за умов цілодобового постійного освітлення (моделювання гіпофункції ШЗ) впродовж 7 діб. Після закінчення 7-денного 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 пейсмекерних нейронів СХЯв гіпоталамуса забір матеріалу проводили згідно із загальноприйнятими правилами [11]. Для дослідження з гіпоталамуса вирізали тонку, суцільну пластинку товщиною 1,0-1,5 мм, яка охоплювала супрахіазматичні ядра. Цю пластинку фіксували в 2,5% розчині глютаральдегіду, який готували на фосфатному буфері Міллонга з активною реакцією

© Булик Р.Є., Бурачик А.І., 2015

середовища pH 7,2-7,4. Фіксований матеріал перено-сили у буферний розчин і промивали впродовж 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 проводили при слабкому (2 лк) червоному світлі, яке практично не впливає на біосинтез мелатоніну ШЗ [1]. Усі етапи експерименту проведено з дотриманням основних вимог Європейської конвенції щодо гуманного ставлення до тварин (Страсбург, 1986).

Результати дослідження та їх обговорення. Субмікроскопічні дослідження СХЯв гіпоталамуса інтактних тварин о 14.00 год показали, що більшість нейросекреторних клітин мають зменшені ядра неправильної форми з неглибокими інвагінаціями каріолеми. Каріоплазма має грудочки хроматину та щільне осміофільне ядерце. Нейроплазма займає невеликий об'єм, у ній щільно упаковані з невеликим просвітом канальці 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 взаємодії ядра і цитоплазми. У каріоплазмі переважає еухроматин, помітні лише невеликі осміофільні грудочки гетерохроматину. У більшості ядер спостерігаються крупні ядерця і багато рибосомальних гранул. Ядерна оболонка має чисельні ядерні пори.

У нейроплазмі більшості нейросекреторних клітин є протяжні (довгі) канальці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму з вузьким просвітом, а на мембранах органели розташовані рибосоми. Диктіосоми комплексу Гольджі розміщені парануклеарно, вони невеликі і мають нешироκі 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 мікроскопа 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 і невеликі. Така картина вказує на активний функціональний стан пейсмекерних 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 установлені деструктивні зміни органел. Фрагментація і розширення канальців гранулярного ендоплазматичного ретакулуму та цистерн комплексу Гольджі відбувається з утворенням вакуолей. Руйнуванням 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 (див. рис. 1).

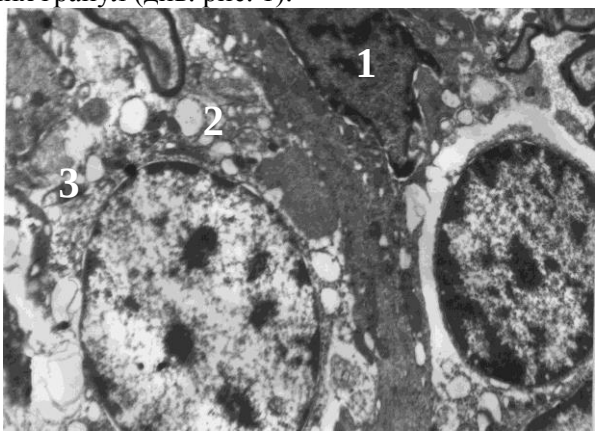

Рис. 1. Субмікроскопічна організація пейсмекерних клітин СХЯв гіпоталамуса щурів о 14.00 год за умов постійного освітлення: 1 – інвагінації каріолеми темного нейроцита; 2 – розширені канальці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму; 3 – деструкція комплексу Гольджі. х7000

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 ядерця. Нейроплазма підвищеної електронної щільності, нечітко контуруються мембранні органели. Виявлено осередкове розширення канальців гранулярного ендоплазматичного ретикулуму з утворенням вакуолеподібних структур. Частина мітохондрій має світлий матрикс і редуковані кристи, гранули гормону поодинокі (рис. 2). Описаний вище ультраструктурний стан свідчить про зниження функціональної активності структур з елементами деструкції.

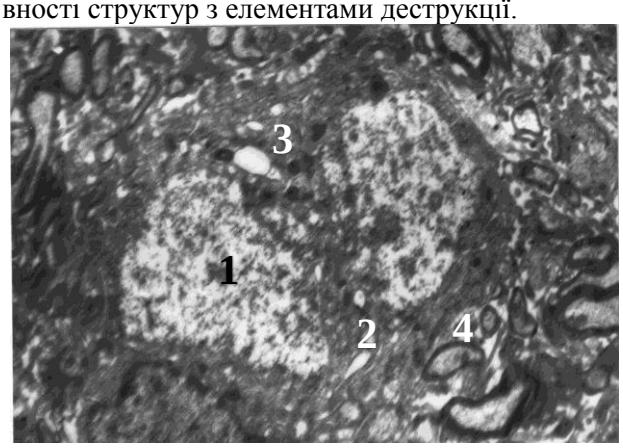

Рис. 2. Зміни ультраструктурної організації нейросекреторних клітин СХЯв гіпоталамуса щура о 02.00 год під дією світлової стимуляції: 1 – еухроматинове ядро; 2 – зруйновані органели; 3 – нейросекреторні гранули; 4 – мієлінові нервові волокна х8000

Таким чином, виявлені ультрамікроскопічні зміни пейсмекерних клітин СХЯв гіпоталамуса можна розглядати як віддзеркалення десинхронозу. Згідно з даними літератури, тривале постійне освітлення викликає гіпофункцію ШЗ і, відповідно, зниження продукції мелатоніну. Саме пригнічення синтезу цього природнього хронобіотика і є основною причиною функціональної дезорганізації пейсмекерних клітин СХЯв.

Висновок. За стандартного режиму освітлення субмікроскопічна організація пейсмекерних клітин вентролатерального відділу супрахіазматичних ядер переднього гіпоталамуса щурів свідчить про зниження функціональної активності нервових клітин у світловий та її зростання – у темновий період доби. Тривалий світловий стрес призводить до істотного десинхронозу циркадіанного пейсмекера та пригнічення його активності впродовж періоду спостереження. За моделювання гіпофункції шишкоподібної залози деструктивні зміни компонентів досліджуваних структур більш виражені о 02.00 год.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження у даному напрямку дадуть змогу глибше пізнати механізми формування циркадіанних ритмів головного мозку щурів та місце і роль супрахіазматичних ядер гіпоталамуса, шишкоподібної залози в забезпеченні циркадіанного періодизму.

Список використаної літератури

1. Anisimov V.N. The light-dark regimen and cancer development / V.N. Anisimov // Neuroendocrinol. Lett. – 2002. – Vol. 23 (Suppl 2). – P. 28-36. 2. 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, № 2. – P. 217-227. 3. Заморский И.И. Функциональная организация фотопериодической системы головного мозга / И.И. Заморский, В.П. Пишак // Успехи физиолог. 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. Cantwell E.L. Chicken suprachiasmatic nuclei: I. Efferent and afferent connections / E.L. Cantwell, V.M. Cassone // J. Comp. Neurol. – 2006. – Vol. 496, № 1. – P. 97-120. 6. Saeb-Parsy K. Responses of cells in the rat supraoptic nucleus in vivo to stimulation of afferent pathways are different at different times of the light/dark cycle / K. Saeb-Parsy, R. Dyball // J. Neuroendocrinol. – 2004. – Vol. 16, № 2. – P. 131-137. 7. 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. 8. Перцов С.С. Роль супрахиазматического ядра гипоталамуса в реализации эффектов мелатонина на тимус, надпочечники и селезенку крыс / С.С. Перцов // Бюлл. эксперимент. биолог. и мед. – 2006. – Т. 141, № 4. – С. 364-367. 9. Герасимов А.В. Функциональная морфология нейронов супрахиазматических ядер крыс после комбинированного воздействия рентгеновского излучения и света / А.В. Герасимов // Радиац. биолог. – 2003. – Т. 43, № 4. – С. 389-395. 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. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopague stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // J. Cell. Biol. – 1963. – Vol. 17. – P. 208-212.

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ОСВЕЩЕНИЯ НА СУБМИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКИХ ЯДЕР ГИПОТАЛАМУСА

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 световом и возростание – в темновом периоде суток. Длительный световой стресс (24.00С:00Т) приводит к существенному десинхронозу циркадианного пейсмекера и угнетению его активности в течение периода наблюдения. Моделирование гипофункции шишковидной железы вызывает деструктивные изменения компонентов исследуемых структур, которые более выражены в 02.00 ч.

Ключевые слова: супрахиазматические ядра гипоталамуса, постоянное освещение.

THE INFLUENCE OF CONSTANT LIGHTING ON SUBMICROSCOPIC CHANGES OF THE HYPOTHALAMIC SUPRACHIASMATIC NUCLEI

Abstract. The submicroscopic organization of the pacemaker cells in the ventrolateral portion of the anterior hypothalamus suprachiasmatic nuclei of rats has been studied. The ultrastructure of the pacemaker neurons under the standard lighting condition – 12.00L:12.00D is indicative of a decrease of their functional activity during the light period and an increase during the dark period of the day. A prolonged light stress – 24.00L:00D leads to essential desynchronosis of the circadian pacemaker and inhibition of its activity throughout the period of observation. Simulation of pineal hypofunction causes destructive changes of the components of the structures examined that are more evident at 02.00 a.m.

Key words: hypothalamic suprachiasmatic nuclei, continuous light.

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

Надійшла 15.10.2015 р.
Рецензент – проф. Піскун Р.П. (Вінниця)