

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Йосипенко Владислав Романович

УДК 611.013:575.22:611.018:611.814]:612.014.44

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОНТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУР ПЕРЕДНЬОГО
ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ЗА МОДИФІКАЦІЇ ФОТОПЕРІОДУ**

22 – Охорона здоров'я; 222 – Медицина
14.03.01 – нормальна анатомія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело


_____ В.Р. Йосипенко

Науковий керівник – Булик Роман Євгенович, доктор медичних наук,
професор

Чернівці – 2022

АНОТАЦІЯ

Йосипенко В.Р. Онтогенетичні особливості структур переднього гіпоталамуса щурів за модифікації фотоперіоду. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 22 – Охорона здоров'я; 222 – Медицина (14.03.01 – нормальна анатомія). – Буковинський державний медичний університет, Чернівці, 2021.

Буковинський державний медичний університет, Чернівці, 2022.

Дисертація присвячена гістологічній, морфометричній, гістохімічній, імуногістохімічній та субмікроскопічній характеристиці ключового елемента у регуляції циклу сон-неспанннн – бічного передзорового ядра (БПЯ) гіпоталамуса зрілих та старих щурів за модифікацій фотоперіоду й уведенні мелатоніну.

Дослідження проведені на 336 білих нелінійних щурах-самцях, з яких 144 статовозрілих та 192 старих тварин. Усі тварини були поділені на групи: контроль (стандартний режим освітлення), темрява (світлова депривація), світло (світлова стимуляція) та світло + мелатонін (на тлі світлової стимуляції щурам внутрішньоочеревинно вводили екзогенний мелатонін (Sigma, USA) у дозі 0,5 мг/кг маси тіла щура). З урахуванням циклічності синтезу мелатоніну, а також для виявлення циркадіанних відмінностей у досліджуваних структурах забір матеріалу здійснювали з 12-годинним інтервалом (о 14.00 та о 02.00 год.).

У роботі використані наступні методи дослідження: гістологічні та морфометричні: середній об'єм нейронів (мкм³), середній об'єм ядер нейронів (мкм³), ядерно-цитоплазматичне співвідношення в нейронах, середня кількість нейронів на стандартній площині гістологічного зрізу (100x100 мкм²); гістохімічні: оптична густина специфічного забарвлення на тигроїдну субстанцію (од.опт.густини); концентрація білків у нейронах БПЯ гіпоталамуса та коефіцієнт R/B при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo (од.опт.густини); імуногістохімічні: оптична густина

імуногістохімічного забарвлення на рецептори до мелатоніну типу 1A та 1B (в.од.опт.густини); електронно-мікроскопічні: об'єм та форма ядер та ядерцець нейронів, характер ядерної оболонки та міжмембранного простору, характер каріоплазми; архітектурний стан гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки, комплексу Гольджі та мітохондрій, осміофільні включення; статистично-аналітичні.

На основі проведених гістологічних досліджень доведено, що розташування БПЯ гіпоталамуса є асиметричним, одне з них знаходиться попереду іншого. Аналіз морфометричних даних показав, що у старих щурів порівняно зі зрілими тваринами зменшується середня кількість нейронів (близько на 30%) на одиницю площі гістологічного зрізу, знижується об'єм нейронів внаслідок зменшення об'єму їх цитоплазми з відповідним зростанням ядерно-цитоплазматичного співвідношення ($p < 0,001$). Водночас, зазначені показники не реагували ні на умови освітлення, ні на час доби, коли моделювалися відповідні умови експерименту.

Доповнено наукові дані про вікові зміни тигроїдної субстанції у нейронах БПЯ гіпоталамуса за різного режиму освітлення та уведення мелатоніну. Вперше виявлено, що кількість тигроїдної субстанції у зрілих щурів, у середньому, є вищою, ніж у старих щурів ($p < 0,001$). Однак, коли тигроїдна субстанція нейронів БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів не реагує на зміни режиму освітлення, то у старих щурів вона характерно змінюється. Зокрема, згідно даних оптичної густини забарвлення при виконанні методики за Ніслем за умов світлової депривації вона зростає, а при світловій стимуляції – знижується ($p < 0,001$). Важливим є те, що мелатонін здатний підвищувати кількість тигроїдної субстанції у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів, яких утримували за умов світлової стимуляції майже до рівня, який властивий щурам, що перебували за стандартних умов освітлення ($p < 0,001$).

Вперше доведена залежність між часом доби, режимом освітлення та щільністю мелатонінових рецепторів (MP) 1A та 1B у нейронах БПЯ гіпоталамуса у віковому аспекті. Зокрема, добові коливання оптичної густини

(щільності) МР типу 1А та 1В в нейронах БПЯ гіпоталамуса характеризуються чіткою циркадіанною ритмічністю, з найвищими показниками о 02.00 год., тоді як о 14.00 год. вона знижується ($p < 0,001$). У старих щурів щільність МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса є нижчою, ніж у зрілих тварин ($p < 0,001$). Проведені імуногістохімічні дослідження дозволили дійти висновку, що МР типу 1А та 1В в нейронах БПЯ гіпоталамуса проявляють в основному подібні тенденції щодо реакції на умови освітлення. Зокрема, як у зрілих, так і у старих щурів підвищується інтенсивність імуногістохімічного забарвлення на МР типу 1А та 1В за умов світлової депривації ($p < 0,001$), але знижується за умов світової стимуляції ($p < 0,001$).

Доведений позитивний ефект гормону шишкоподібної залози – мелатоніну для корекції порушень, викликаних світловою стимуляцією. При введенні мелатоніну на тлі постійного освітлення спостерігали вірогідне ($p < 0,001$) підвищення середніх величин щільності МР типу 1А та 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса щодо тварин, яким на тлі світлового стресу ін'єкції препарату не проводили.

Вперше за допомогою сучасних досліджень встановлено концентрацію протеїнів у нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих і старих щурів за стандартного і зміненого режиму освітлення та уведення мелатоніну. Так, доведено, що оптична густина специфічного забарвлення на білок у нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих щурів у середньому суттєво перевищує показники старих щурів ($p < 0,001$). У складі їх білків переважають карбоксильні групи, що свідчить про високу інтенсивність обміну білків. Необхідно відмітити, що в обох вікових категоріях немає різниці між різними періодами доби (14.00 та 02.00 год.).

Водночас, модифікація фотоперіоду призводить до порушення накопичення протеїнів та зміни у співвідношенні карбоксильних та аміногруп білків у нейронах БПЯ гіпоталамуса. Зокрема, за умов світлової депривації, оптична густина специфічного забарвлення на білок у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів не змінюється незалежно від періоду доби, тоді,

коли у старих щурів інтенсивність забарвлення на білок в нейронах БПЯ гіпоталамуса знижується ($p < 0,001$). Світлова експозиція призводить до зростання середньої інтенсивності забарвлення на білок в нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих щурів, тоді, коли у старих щурів, навпаки, спостерігається зниження середньої інтенсивності забарвлення на білок в нейронах БПЯ гіпоталамуса ($p < 0,001$). Уведення мелатоніну щурам, які знаходилися в умовах постійного освітлення, суттєво покращує процеси накопичення протеїнів у нейронах БПЯ гіпоталамуса як зрілих, так і старих щурів, причому це не залежить від періоду доби ($p < 0,001$).

Уперше експериментально встановлено співвідношення між аміно- та карбоксильними групами у складі білків (коефіцієнт R/V) у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів за модифікації фотоперіоду. Результати досліджень, дозволили дійти висновку, що коефіцієнт R/V в нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів є значно вищим, ніж у старих щурів ($p < 0,001$). Отримані дані вказують на те, що нейрони БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів мають в своєму складі білки, які більше збагачені на карбоксильні групи, ніж у старих щурів. Це може свідчити про більш виражені процеси окиснювальної модифікації білків у старих щурів. Зміна режиму освітлення по-різному впливає на показники коефіцієнту R/V у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів. Зокрема, за умов світлової депривації, коефіцієнт R/V у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів у середньому не змінюється. Водночас, світлова стимуляція веде до зростання коефіцієнту R/V в нейронах БПЯ гіпоталамуса і у зрілих, і у старих щурів ($p < 0,001$). Отримані результати можна тлумачити як зростання інтенсивності процесів окиснювальної модифікації білків у нейронах БПЯ гіпоталамуса у відповідь на зміну режиму освітлення.

Уперше з'ясовано вплив мелатоніну в якості експериментальної терапії виявлених відхилень. Так, ін'єкції екзогенного мелатоніну на тлі постійного освітлення призводять до нормалізації коефіцієнту R/V у нейронах БПЯ гіпоталамуса. Цей ефект більш помітний для старих щурів, у яких відбулася

повна нормалізація середніх значень коефіцієнту R/V в нейронах БПЯ гіпоталамуса, але менш помітний для зрілих щурів ($p < 0,001$).

Вперше проаналізовано субмікроскопічний характер перебудови архітекtonіки нейронів БПЯ гіпоталамуса старих щурів за зміни режиму освітлення. В результаті проведеного вивчення клітин БПЯ гіпоталамуса експериментальних тварин встановлено їх відносно підвищену функціональну активність в темновий період доби. Зміна режиму освітлення спричинює порушення архітекtonіки нейронів БПЯ, що проявляється вираженими гіпертрофічними та початковими деструктивними змінами ядер і органел нейронів БПЯ гіпоталамуса. Більш істотні ультрамікроскопічні зміни структурної організації нейронів БПЯ гіпоталамуса спостерігали у щурів, що перебували за умов світлової стимуляції, ніж при світловій депривації, що підтверджується зміною ультраструктури нервових клітин о 02.00 год. та появою “темних” клітин.

За умов використання екзогенного мелатоніну на тлі цілодобового освітлення встановлено відносну нормалізацію субмікроскопічного стану нервових клітин БПЯ гіпоталамуса, однак ультраструктура органел синтетичного та енергетичного забезпечення були в стані виснаження на тлі тривалого світлового періоду.

Отримані результати проведених експериментальних досліджень розширили уяву про гістологічну, морфометричну, гістохімічну, імуногістохімічну та субмікроскопічну організацію одного з ключових елементів у регуляції циклу сон-неспанья – БПЯ гіпоталамуса. З’ясовано характер змін досліджуваних структур в онтогенезі та за зміни режиму освітлення, що є важливим для пізнання механізмів виникнення та розвитку розладів сну та десинхронозів. Це дає можливість покращити ранню діагностику, удосконалити лікування та профілактику виникнення цих патологічних станів. Дані дослідження дають можливість науково обґрунтувати застосування мелатоніну при хронопатологічних явищах та розладах сну.

Наукові розробки впроваджено у навчальний процес – у матеріали лекцій та практичних занять, а також у наукову роботу кафедри анатомії людини ім. М.Г. Туркевича, кафедри анатомії, клінічної анатомії та оперативної хірургії, кафедри гістології, цитології та ембріології Буковинського державного медичного університету; кафедри оперативної хірургії та клінічної анатомії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова; кафедри патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології Запорізького державного медичного університету; кафедри анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії Запорізького державного медичного університету; кафедри анатомії людини Івано-Франківського національного медичного університету; кафедри клінічної медицини навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Ключові слова: цикл сон-неспанья, передній гіпоталамус, бічне передзорове ядро гіпоталамуса, циркадіанні ритми, фотоперіод, мелатонін.

SUMMARY

Yosypenko V.R. Ontogenetic Features of the Anterior Hypothalamus Structure in Rats under Photoperiod Modification – Qualification scientific work as a manuscript.

The thesis to obtain the academic degree of Doctor of Philosophy (PhD) on specialty 22 – Health Care; 222 – Medicine (14.03.01 – Normal Anatomy). – Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, 2021.

Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, 2022.

The thesis deals with histologic, morphometric, immunohistochemical, and submicroscopic characteristics of a key element in the regulation of the sleep-wake cycle – the lateral preoptic nucleus (LPN) of the hypothalamus under the standard and modified photoperiod and injection of exogenous melatonin.

The research was carried out on 336 albino nonlinear male rats including 144 mature and 192 old animals. All the animals were divided into the groups: control

(with standard light), darkness (light deprivation), light (light stimulation) and light + melatonin (in the ground of light stimulation exogenous melatonin (Sigma, USA) was injected into the peritoneum of rats in the dose of 0,5 mg/kg of the body weight). Considering cyclic synthesis of melatonin and in order to find circadian differences in the structures examined, the material for the study was taken with 12-hour interval (at 2 p.m. and 2 a.m.).

The following methods of examination were used in the study: histologic and morphometric – an average volume of neurons (mcm^3), an average volume of neuron nuclei (mcm^3), nucleocytoplasmic ratio in neurons, an average amount of neurons on the standard plane of a histologic section ($100 \times 100 \text{ mcm}^2$); histochemical – optic density of specific staining and tigroid substance (optic density unit), protein concentration in the hypothalamic LPN and R/B coefficient with the use of Mikel Calvo histochemical method (optic density unit); immunohistochemical – optic density of immunohistochemical staining on the receptors to melatonin type 1A and 1B (optic density unit); electron microscopic – volume and shape of nuclei and nucleoli of neurons, the character of the nuclear membrane and inter-membrane space, karyoplasm character, architectural state of the granular and agranular endoplasmic reticulum, Golgi complex and mitochondria, osmiophil inclusions.

On the basis of our histological examinations carried out the location of the hypothalamic LPNs can be stated as one located asymmetrically, one of them is found a little forward. Analysis of the morphometric findings showed that amount of neurons per unit of a histological section in old rats decreases in comparison with mature ones (about 30% less). The volume of neurons reduces at the expense of reduced volume of their cytoplasm with appropriate increase of the nucleocytoplasmic ratio ($p < 0,001$). At the same time, the indices indicated neither responded to the light conditions nor the time of the day, when appropriate conditions of the experiment were simulated.

The scientific data concerning age changes of the tigroid substance in the neurons of the hypothalamic LPNs under different light regimens and melatonin injection are supplemented. The amount of the tigroid substance in mature rats was

found to be on an average higher than in old rats for the first time ($p < 0,001$). Though, when the tigroid substance of the hypothalamic LPNs neurons of mature rats does not respond to the light regimen, it changes specifically in old rats. Thus, according to the data of the staining optic density performed by Nissl method it increases under conditions of light deprivation and decreases in case of light stimulation ($p < 0,001$). It is important to note that melatonin is able to increase the tigroid substance amount in the hypothalamic LPNs neurons of rats kept under conditions of light stimulation practically to the level of those rats kept under the standard light conditions ($p < 0,001$).

For the first time dependence between the hours of the day, light regimen and density of melatonin receptors (MR) 1A and 1B in the hypothalamic LPNs neurons was found in the age aspect. Thus, the daily range of optic density of 1A and 1B MRs in the hypothalamic LPNs neurons is characterized by an accurate circadian rhythm, with the highest index at 2 a.m. and lower one at 2 p.m. ($p < 0,001$). The density of 1A MRs in the hypothalamic LPNs neurons of old rats is lower than in mature rats ($p < 0,001$). The immunohistochemical examinations conducted enabled to draw a conclusion that melatonin receptors of 1A and 1B types in the hypothalamic LPNs neurons in general demonstrate similar tendencies concerning response to light conditions. Thus, intensity of immunohistochemical staining to 1A and 1B MRs under conditions of light deprivation increases both in mature and old rats ($p < 0,001$), but it decreases under conditions of light stimulation ($p < 0,001$).

A positive effect of melatonin as a hormone of the pineal gland to correct disorders caused by light stimulation is confirmed. Injection of exogenous melatonin in the ground of continuous light promoted a reliable ($p < 0,001$) increase of density mean values of 1A and 1B MRs in the hypothalamic LPNs neurons, in comparison with animals that were not given melatonin injections in the ground of light stress.

For the first time by means of up-to-date studies the protein concentration in the hypothalamic LPNs neurons of mature and old rats was determined under the standard and modified light regimens and melatonin injection. Thus, the optic density of specific staining to protein in the hypothalamic LPNs neurons of mature

rats was evidenced to increase considerably the indices of old rats ($p < 0,001$). Carboxyl groups prevail in the content of their proteins which is indicative of a high intensity of protein metabolism. At the same time, it should be noted that there is no difference between various hours of the day in both age categories (2 p.m. and 2 a.m.).

At the same time, modification of light regimen results in disorders of protein accumulation and changes in the ration of carboxyl and amino groups of proteins in the hypothalamic LPNs neurons. Thus, under conditions of light deprivation the optic density of specific staining to protein in the hypothalamic LPNs neurons of mature rats does not change on an average depending on the hour of the day, while in old rats the intensity of staining to protein in the hypothalamic LPNs neurons decreases ($p < 0,001$). Light exposition leads to the increase of a mean intensity of staining to protein in the hypothalamic LPNs neurons of mature rats, and on the contrary, in old rats a mean intensity of staining to protein in the hypothalamic LPNs neurons of old rats decreases ($p < 0,001$). Exogenous melatonin injections given to rats kept under conditions of continuous light improves considerably the processes of protein accumulation in the hypothalamic LPNs neurons of both mature and old rats, and it does not depend on the hour of the day ($p < 0,001$).

For the first time in the course of the experiment the ratio between amino and carboxyl groups in the content of proteins (R/B coefficient) in the hypothalamic LPNs neurons of mature and old rats was found under photoperiod modification. The results of our research enabled to conclude that R/B coefficient in the hypothalamic LPNs neurons of mature rats on an average is considerably higher than in old rats ($p < 0,001$). The data obtained are indicative of the fact that proteins of the hypothalamic LPNs neurons of mature rats contain proteins more saturated with carboxyl groups than those of old rats. It may be indicative of more pronounced processes of protein oxidation modification in old rats. Light regimen modification produces various effects on the parameters of R/B coefficient in the hypothalamic LPNs neurons of mature and old rats. Thus, under conditions of light deprivation R/B coefficient in the hypothalamic LPNs neurons of mature and old rats does not

change on an average. At the same time, light stimulation results in the increase of R/B coefficient in the hypothalamic LPNs neurons both in mature and old rats ($p < 0,001$). The results obtained can be interpreted as the increase in the intensity of protein oxidation modification processes in the hypothalamic LPNs neurons in response to light regimen modification.

For the first time the effect of melatonin as an experimental therapy of the deviation found was determined. Thus, exogenous melatonin injection in the ground of continuous light results in normalization of R/B coefficient in the hypothalamic LPNs neurons. This effect is more obvious for old rats, since a complete normalization of R/B coefficient mean values occurred in their hypothalamic LPNs neurons, but it was less obvious for mature rats ($p < 0,001$).

For the first time submicroscopic character of the architectonic reconstruction of the hypothalamic LPNs neurons of old rats was analyzed under light regimen modification. The results of our investigation of the hypothalamic LPNs cells of the experimental animals found their relative increased functional activity at a dark period of the day. Changes of the light regimen leads to disorders in the architectonics of the LPNs neurons manifested by pronounced hypertrophic and initial destructive changes of the nuclei and organelles of the hypothalamic LPNs neurons. More substantial ultramicroscopic changes in the structural organization of the hypothalamic LPNs neurons were found in rats kept under conditions of light stimulation than those kept under light deprivation, which is confirmed by the changes of the nerve cell ultrastructure at 2 a.m. and appearance of “dark” cells.

When exogenous melatonin is used in the ground of twenty-four-hour light, a relative normalization of the submicroscopic state of the hypothalamic LPNs cells is determined, though ultrastructure of organelles of synthetic and energy supply is found to be exhausted under a long light period.

The results of the experimental studies conducted have added to the conception concerning histological, morphometric, histochemical and submicroscopic organization of one of the key elements in the regulation of the sleep-wake cycle – the hypothalamic LPNs. The character of changes of the

structures examined in ontogenesis and during light regimen modification is established, which is an important thing to understand the mechanisms of occurrence and development of sleep disorders and desynchronosis. It enables to improve early diagnostics, treatment and prevention of these pathological conditions. The data of the research enable to scientifically substantiate melatonin use in chronopathological conditions and sleep disorders.

The scientific elaboration are introduced into the educational process – the materials of lectures and practical classes, the scientific research of the Department of Human Anatomy, Department of Anatomy, Clinical Anatomy and Operative Surgery, Department of Histology, Cytology and Embryology at Bukovinian State Medical University; Department of Operative Surgery and Clinical Anatomy of National Pirogov Memorial Medical University; Department of Pathologic Physiology with the Course of Normal Physiology at Zaporizzhia State Medical University; Department of Human Anatomy, Operative Surgery and Topographic Anatomy at Zaporizzhia State Medical University; Department of Human Anatomy at Ivano-Frankivsk National Medical University; Department of Clinical Medicine of the Educational-Scientific Center «Institute of Biology and Medicine» Taras Shevchenko Kyiv National University.

Key words: sleep-wake cycle, anterior hypothalamus, lateral preoptic nucleus of the hypothalamus, circadian rhythms, photoperiod, melatonin.

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБ ЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Морфометрична характеристика вендролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса зрілих щурів за модифікації фотоперіоду. Буковинський медичний вісник. 2020;24(2):9-14. doi: [10.24061/2413-0737.XXIV.2.94.2020.36](https://doi.org/10.24061/2413-0737.XXIV.2.94.2020.36)

2. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Аналіз щільності мелатонінових рецепторів типу 1А у нейронах передньо-бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів

за різного світлового режиму. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2020. № 3. С. 45-49. doi: [10.11603/1811-2471.2020.v.i3.11581](https://doi.org/10.11603/1811-2471.2020.v.i3.11581)

3. Булик РЄ, Йосипенко ВР, Власова КВ. Вікові особливості морфометричного стану бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів на тлі різної тривалості фотоперіоду. Вісник проблем біології і медицини. 2021;2:197-200. doi: [10.29254/2077-4214-2021-2-160-197-200](https://doi.org/10.29254/2077-4214-2021-2-160-197-200)

4. Йосипенко ВР, Булик РЄ, Кривчанська МІ, Лукань ЮР. Ультраструктурна організація нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса старих щурів за різних умов освітлення. Клінічна та експериментальна патологія. 2021;20(3):28-33. doi: [10.24061/1727-4338.XX.3.77.2021.4](https://doi.org/10.24061/1727-4338.XX.3.77.2021.4)

5. Bulyk RYe, Yosyenko VR, Vlasova KV. Ontogenetic aspects of melatonin receptors 1A density in the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus under various light conditions. Wiad Lek. 2021;74(9 Cz 1):2202-6. doi: [10.36740/WLek202109131](https://doi.org/10.36740/WLek202109131) (Індексується у наукометричній базі Scopus)

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

6. Bulyk RYe, Vlasova KV, Kushniryk OV, Yosyenko VR. Oscillations of the melatonin receptors density in the magnocellular neurons of hypothalamic supraoptic nucleus under the condition of altered photoperiod and injections of melatonin. В: Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю Вікові та хронобіологічні аспекти медицини і фармації; 2018 Жов 4-5; Чернівці. Чернівці: БДМУ; 2018, с. 18-9.

7. Йосипенко ВР. Роль вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса в регуляції циклу “сон-неспанья”. ВІМСО Journal. 2019;2019:196.

8. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Онтогенетичні особливості щільності мелатонінових рецепторів у нейронах вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса. В: Матеріали міжнар. наук-практ. конф. Охорона та захист

здоров'я людини в умовах сьогодення; 2019 Лис 1-2; Київ. Київ: Київський медичний науковий центр; 2019, с. 10-1.

9. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Імуногістохімічні особливості вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса щурів на фоні постійного освітлення та уведення мелатоніну. In: Proceedings of IV International Scientific and Practical Conference Priority directions of science development; 2020 Feb 3-4; Lviv, Ukraine. Lviv; 2020, p. 84-5.

10. Yosypenko VR. Age characteristics of the density of melatonin receptors in the neurons of the ventrolateral preoptic nucleus of the hypothalamus under the light stimulation. В: Бойчук ТМ, Іващук ОІ, Безрук ВВ, редактори. Матеріали 101-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»; 2020 Лют 10, 12, 17; Чернівці. Чернівці; 2020, с. 66.

11. Йосипенко ВР. Порівняльна характеристика щільності рецепторів 1А до мелатоніну в нейронах вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса за умов світлової стимуляції. ВІМСО Journal. 2020;2020:181.

12. Bulyk RYe, Yosypenko VR. Age characteristics of morphometric changes of the anterior-lateral preoptic nucleus of the hypothalamus of rats. In: Natural Science Readings; 2020 May 28-30; Bratislava. Bratislava; 2020, p. 35-3.

13. Bulyk RYe, Yosypenko VR. Influence of light stimulation on age features of the anterior-lateral preoptic nucleus of the hypothalamus. In: Proceedings of the 1st International scientific and practical conference Actual trends of modern scientific research; 2020 Jul 19-21; Munich, Germany. Munich: MDPC Publishing; 2020, p. 46-8.

14. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Вікові морфометричні зміни нейронів передньо-бічного передзорового ядра гіпоталамуса за умов світлової депривації. В: Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. Вітчизняна та світова медицина: вимоги сьогодення; 2020 Жов 9-10; Дніпро. Дніпро: Організація наукових медичних досліджень «Salutem»; 2020, с. 5-8.

15. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Гістохімічні особливості тигроїдної субстанції нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса зрілих і старих щурів за умови світлової стимуляції. В: Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. Нові досягнення у галузі медичних та фармацевтичних наук; 2020 Лис 20-21; Одеса. Одеса: Південна фундація медицини; 2020, с. 80-3.

16. Yosyenko VR. Correction of immunohistochemical disorders of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus of mature rates caused by constant lighting. В: Бойчук ТМ, Іващук ОІ, Безрук ВВ, редактори. Матеріали підсумкової 102-ї наук.-практ. конф. з міжнар. участю професорсько-викладацького персоналу Буковинського державного медичного університету; 2021 Лют 08, 10, 15; Чернівці. Чернівці: Медуніверситет; 2021, с. 66-7.

17. Йосипенко ВР. Вплив мелатоніну на щільність тигроїдної субстанції бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів. *VIMCO Journal*. 2021;2021:117.

18. Potdar M, Yosyenko VR. The role of melatonin in sleep regulation. *VIMCO Journal*. 2021;2021:115.

19. Йосипенко ВР, Булик РЄ. Вікові відмінності щільності мелатонінових рецепторів типу 1В у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса. В: Матеріали VII Національного конгресу геронтологів і геріатрів України; 2021 Жов 6-8; Київ. Київ; 2021, с. 21.

20. Булик РЄ, Йосипенко ВР, Волошин ВЛ. Особливості вікових змін окиснювальної модифікації білків у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів при цілодобовому освітленні. В: Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. Актуальні досягнення медичних наукових досліджень в Україні та країнах ближнього зарубіжжя; 2021 Жов 1-2; Київ. Київ: Київський медичний науковий центр; 2021, с. 5-7.

21. Булик РЄ, Йосипенко ВР, Кривчанська МІ. Показники окисної модифікації білків у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів при світловій стимуляції. In: *Proceedings of 3rd International scientific and*

practical conference Topical issues of modern science, society and education; 2021 Oct 3-5; Kharkiv, Ukraine. Kharkiv: SPC-Sci-conf.com.ua; 2021, p. 135-6.

22. Йосипенко ВР, Булик РЄ. Вплив модифікацій фотоперіоду на ультраструктурний стан нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса старих щурів. In: Proceedings of V International Scientific and Practical Conference Science, innovations and education: problems and prospects; 2021 Dec 8-10; Tokyo, Japan. Tokyo; 2021, p. 167-9.

23. Bulyk R, Yosyenko V, Vlasova K, Voloshyn H. Effect of melatonin on indicators of oxide modification of proteins in neurons of the lateral preoptic nuclei of rat hypothalamus under light stress. In: Proceedings of XIV International Scientific and Practical Conference Theoretical foundations in practice and science; 2021 Dec 21-24; Bilbao, Spain. Bilbao; 2021, p. 257-9.

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ДОДАТКОВО ВІДОБРАЖАЮТЬ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

24. Bulyk RYe, Yosyenko VR. Effect of melatonin on daily oscillations of the density of melatonin receptors 1A in neurons of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus in rats under different light mode. Deutscher Wissenschaftsherold. German Science Herald. 2021;1:32-5. doi: [10.19221/202117](https://doi.org/10.19221/202117)

25. Bulyk RYe, Yosyenko VR. Characteristics of density of melatonin receptors of type 1B in neurons of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus under different light modes. Proceedings of the 9th International Scientific and Practical Conference Challenges in Science of Nowadays; 2021 Jul 16-18; Washington, USA. InterConf. 2021;66:344-9.

26. Bulyk RYe, Yosyenko VR, Kryvchanska MI, Vlasova KV, Lukan YR. Age changes in the tigroid substance of neurons of the lateral preoptic nucleus of hypothalamus under different light modes. Journal of Education, Health and Sport. 2021;11(10): 269-74. doi: [10.12775/JEHS.2021.11.10.025](https://doi.org/10.12775/JEHS.2021.11.10.025)

27. Булик РЄ, Кривчанська МІ, Йосипенко ВР, винахідники; Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет»; патентовласник. Спосіб моделювання морфологічних порушень шишкоподібної залози у щурів. Патент України № 143485. 2020 Лип 27.

28. Булик РЄ, Кривчанська МІ, Йосипенко ВР, Махрова ЄГ, винахідники; Буковинський державний медичний університет; патентовласник. Спосіб експериментального порушення циркадіанної організації ренальних функцій у щурів в умовах різної тривалості фотоперіоду. Патент України № 147909. 2021 Чер 17.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	20
ВСТУП.....	21
Розділ 1. СУЧАСНІ ВІДОМОСТІ ПРО БІЧНЕ ПЕРЕДЗОРОВЕ ЯДРО ГІПОТАЛАМУСА ТА ЙОГО УЧАСТЬ У РЕГУЛЯЦІЇ ЦИКЛУ СОН- НЕСПАННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	30
1.1 Біологічні ритми як фундаментальна властивість всіх живих організмів.....	30
1.2 Структура бічного передзорового ядра гіпоталамуса та його участь у регуляції циклу сон-неспанья.....	35
1.3 Мелатонін – фізіологічний регулятор сну та циркадіаного ритму.....	40
1.4 Порушення циклу сон-неспанья.....	46
Розділ 2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІД- ЖЕННЯ.....	58
2.1 Матеріал дослідження.....	58
2.2 Методи дослідження.....	62
Розділ 3. ГІСТОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА БІЧНОГО ПЕРЕДЗОРОВОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ТА ГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТИГРОЇДНОЇ СУБСТАНЦІЇ ЙОГО НЕЙРОНІВ ЗА РІЗНИХ УМОВ СВІТЛОВОГО РЕЖИМУ ТА КОРЕКЦІЇ МЕЛАТОНІНОМ.....	67
3.1 Особливості гістології та морфометрії нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса за різного режиму освітлення та уведення мелатоніну.....	67
3.2 Гістохімічні особливості тигроїдної субстанції нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса за різних умов світлового режиму та корекції мелатоніном.....	77

Розділ 4. ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ БІЧНОГО ПЕРЕДЗОРОВОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ЗА РІЗНИХ УМОВ СВІТЛОВОГО РЕЖИМУ ТА КОРЕКЦІЇ МЕЛАТОНІНОМ...	86
Розділ 5. ГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПРОТЕЇНІВ НЕЙРОНІВ БІЧНОГО ПЕРЕДЗОРОВОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ЗА РІЗНИХ УМОВ СВІТЛОВОГО РЕЖИМУ ТА КОРЕКЦІЇ МЕЛАТОНІНОМ.....	118
5.1 Особливості оптичної густини специфічного забарвлення на білок у монохроматичному варіанті при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів за модифікованого світлового режиму та уведення мелатоніну.....	118
5.2 Коефіцієнт R/V при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів за різного світлового режиму та уведення мелатоніну.....	134
Розділ 6. УЛЬТРАСТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ НЕЙРОНІВ БІЧНОГО ПЕРЕДЗОРОВОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА СТАРИХ ЩУРІВ ЗА РІЗНОГО РЕЖИМУ ОСВІТЛЕННЯ ТА ЗА УМОВ КОРЕКЦІЇ МЕЛАТОНІНОМ.....	148
Розділ 7. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	158
ВИСНОВКИ.....	174
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	177
ДОДАТКИ.....	206

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- БПЯ – бічне передзорове ядро
- ГАМК - гамма-аміномасляна кислота
- НПЯ – надперехресне ядро
- ШЗ – шишкоподібна залоза
- АФК – активні форми кисню
- ПШЯ – пришлуночкове ядро
- ГСЯ – горбове сосочкоподібне ядро
- МР – мелатонінові рецептори
- МРТ1 – мелатонінові рецептори 1-го типу
- МРТ2 – мелатонінові рецептори 2-го типу

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Фізіологічні процеси в живих системах підпорядковані закономірним циклічним коливанням – біологічним ритмам [1], а будь-які зміни в житті людини – це джерело стресу, що є універсальною реакцією на необхідність адаптації до нових умов довкілля [2]. Фактори, які впливають на ритмічність процесів, що відбуваються у живих організмах називаються синхронізаторами. Одним з найсильніших синхронізаторів для людини є зміна світла та темряви й тривалість фотоперіоду [30]. Щоденний вплив світла на сітківку необхідний для синхронізації циркадніанних ритмів із зовнішнім 24-годинним сонячним середовищем [31].

Цикл сон-неспаня – це найбільш очевидний добовий ритм, який спостерігається у людей і багатьох тварин [38, 8]. Нормальний сон – один з “трьох китів” здоров’я, поруч з правильним харчуванням та фізичною активністю [39]. Приблизно третину свого життя людина проводить уві сні, а його якість визначає загальний рівень здоров’я [34]. Критично важливим компонентом у регуляції циклу сон-неспаня є структури переднього гіпоталамуса [10], а саме бічне передзорове ядро (БПЯ) гіпоталамуса [56]. Нейрони цього ядра містять нейромедіатори галанін і гамма-аміномасляну кислоту (ГАМК) [61], що забезпечують інгібуючу іннервацію основних моноамінових систем головного мозку, що підтримують період неспаня [62]. Нейрони БПЯ гіпоталамуса експресують безпосередньо генний продукт c-Fos [70], можливий маркер нейронної активності, пропорційно часу, проведеного уві сні. Це дозволяє припустити, що активність БПЯ гіпоталамуса може сприяти, підтримувати або посилювати сон [71], а ураження даного ядра призводить до розвитку безсоння [62].

Доведено, що у регуляції циклу сон-неспаня, шляхом синтезу нейрогормону мелатоніну, бере участь і ШЗ [9]. Мелатонін і меншою мірою фізична та соціальна активність людини є важливими факторами для

синхронізації циркадіанного ритму з 24-годинною добою [84]. Мелатонін транспортується сироватковим альбуміном [25] і впливає на органи-мішені зв'язуючись з специфічними рецепторами в плазматичній мембрані [43] та ядрі (ROR α /RZR) [87]. Відомі зараз рецептори до мелатоніну поділяють на два основних типи: мелатонінові рецептори 1-го типу та 2-го типу [88]. У секретії нейрогормону спостерігається циркадіанний характер. Саме в темновий період доби виробляється близько 70% добової кількості мелатоніну [95]. Наявність добового ритму продукції мелатоніну є маркером нормальної роботи циркадіанної системи ендогенних біоритмів і їх синхронізації зі зміною дня і ночі [117] та регуляції циклу сон-неспаня [34]. Секреція мелатоніну в організмі людини суттєво варіює залежно від віку [79]. Дослідження доводять, що середньодобова концентрація мелатоніну у людей похилого віку на 50% менше, ніж у молодих [118]. Важливо також відзначити, що з віком кількість рецепторів до мелатоніну в органах і тканинах знижується, що має важливе значення в процесах старіння організму [84].

Сон має фундаментальне значення для психічного та фізичного здоров'я людини [96]. Зниження тривалості та/або якості сну поступово призводить до змін нервових та нейроендокринних функцій, включаючи підвищений рівень стресу, когнітивні та обмінні порушення [134], підвищення ризику розвитку онкологічних, метаболічних, серцево-судинних захворювань [4] та передчасної смерті [134]. На час сну та якість сну впливають вік, психологічні та фізіологічні умови, культура та екологічні фактори [186]. Велике значення мають й умови освітлення. Зміна режиму освітлення [38] та активність людини в нічний час – найпоширеніші причини порушення ритму сон-неспаня [42].

Отже, не викликає сумніву актуальність дослідження гістологічних, морфометричних, гістохімічних, ультрамікроскопічних та імуногістохімічних характеристик одного з ключових елементів у регуляції циклу сон-неспаня – БПЯ гіпоталамуса в умовах модифікації фотоперіоду та динаміки даних змін

у онтогенезі, а також з'ясуванні впливу на стан вказаного ядра мелатоніну, в якості протективного та біоритморегулювального агента.

Зв'язок роботи з науковими планами, програмами, темами.

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану наукових досліджень Буковинського державного медичного університету і є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри медичної біології та генетики “Морфофункціональне і біохімічне обґрунтування дисфункцій нейросекреторних структур головного мозку й ендокринних залоз та гепаторенальної системи щурів при експериментальній патології, у віковому аспекті та шляхи її корекції” (шифр теми: 0119U101346 – фундаментальна). Автор є співвиконавцем теми та виконавцем фрагменту присвяченому з'ясуванню онтогенетичних особливостей структур переднього гіпоталамуса щурів за модифікації фотоперіоду.

Мета дослідження: з'ясувати гістологічні, морфометричні, ультрамікроскопічні, гістохімічні та імуногістохімічні особливості структурної організації БПЯ гіпоталамуса щурів за умови модифікації фотоперіоду та динаміки даних змін в онтогенезі, а також дослідити вплив на стан вказаного ядра мелатоніну.

Завдання дослідження:

1. Оцінити гістологічні зміни БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів у різні періоди доби в умовах зміненого фотоперіоду та уведення мелатоніну.

2. Охарактеризувати особливості впливу змін фотоперіоду та ін'єкції мелатоніну на морфометричні показники нейронів БПЯ гіпоталамуса у зрілих і старих щурів.

3. Проаналізувати гістохімічні особливості тигроїдної субстанції нейронів БПЯ гіпоталамуса за різних умов світлового режиму та уведення мелатоніну у зрілих і старих щурів.

4. Визначити щільність рецепторів до мелатоніну типу 1A та 1B у нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих і старих щурів за модифікації фотоперіоду та застосування мелатоніну.

5. Вивчити оптичну густину специфічного забарвлення на білок та співвідношення між карбоксильними та аміно-групами протеїнів у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за модифікованого світлового режиму та уведення мелатоніну.

6. Дослідити стан БПЯ ядра гіпоталамуса старих щурів на ультра-мікроскопічному рівні за різного режиму освітлення та в різні періоди доби.

Об'єкт дослідження – вплив зміненого фотоперіоду та уведення мелатоніну на структурні перебудови нейронів БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів.

Предмет дослідження – гістологічні, морфометричні, ультрамікроскопічні, гістохімічні та імуногістохімічні зміни та закономірності вікової динаміки БПЯ гіпоталамуса щурів за умови модифікації фотоперіоду та уведення мелатоніну.

Методи дослідження: гістологічні та морфометричні: середній об'єм нейронів (мкм³), середній об'єм ядер нейронів (мкм³), ядерно-цитоплазматичне співвідношення в нейронах, середня кількість нейронів на стандартній площині гістологічного зрізу (100x100 мкм²). Гістохімічні: оптична густина специфічного забарвлення на тигроїдну субстанцію (од.опт.густини), концентрація білків у нейронах БПЯ гіпоталамуса та коефіцієнт R/B при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo (од.опт.густини). Імуногістохімічні: оптична густина імуногістохімічного забарвлення на рецептори до мелатоніну типу 1A та 1B (од.опт.густини). Електронно-мікроскопічні: об'єм та форма ядер та ядерець нейронів, характер ядерної оболонки та міжмембранного простору, характер каріоплазми, архітектурний стан гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки, комплексу Гольджі та мітохондрій, осміофільні включення; статистично-аналітичні.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі вперше досліджено вікові зміни БПЯ гіпоталамуса щурів за умови модифікації фотоперіоду, а також з'ясувано вплив на стан вказаного ядра мелатоніну.

Уперше розкрито гістологічну та морфометричну характеристику БПЯ гіпоталамуса та особливості його вікових змін за стандартного та зміненого режиму освітлення. Зокрема, з віком спостерігається зменшення кількості нейронів БПЯ на 30% ($p < 0,001$). Доповнено наукові дані про вплив різного режиму освітлення на характер вікових зміни тигроїдної субстанції у нейронах БПЯ гіпоталамуса. Так, кількість тигроїдної субстанції у зрілих щурів є вірогідно вищою, ніж у старих щурів ($0,263 \pm 0,0017$ і $0,216 \pm 0,0018$ од.опт.густини відповідно) ($p < 0,001$). При світловій стимуляції у старих щурів кількість тигроїдної субстанції зменшується і о 02.00 год. складає $0,192 \pm 0,0019$ од.опт.густини ($p < 0,001$).

Уперше доведена залежність між часом доби, режимом освітлення та щільністю МР типу 1А та 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса у віковому аспекті. Зокрема, найвищі показники оптичної густини (щільності) МР типу 1А та 1В в нейронах БПЯ гіпоталамуса спостерігаються о 02.00 год. і складають $0,264 \pm 0,0016$ од.опт.густини, тоді як о 14.00 год. ($p < 0,001$). У старих щурів щільність МР типу 1А та 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса є нижчою, ніж у зрілих тварин і о 02.00 год. перебуває у межах $0,216 \pm 0,0013$ од.опт.густини ($p < 0,001$). Як у зрілих так і у старих щурів підвищується оптична густина МР типу 1А та 1В за умов світлової депривації ($p < 0,001$), але знижується за умов світової стимуляції ($p < 0,001$).

Уперше за допомогою сучасних досліджень комплексно проаналізовано концентрацію протеїнів у нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих і старих щурів за стандартного і зміненого режиму освітлення та уведення мелатоніну. Доведено, концентрація білків у зрілих щурів суттєво перевищує показники старих щурів і складає $0,274 \pm 0,0017$ од.опт.густини ($p < 0,001$). У їхньому складі переважають карбоксильні групи, що свідчить про високу інтенсивність обміну білків. Світлова експозиція призводить до зростання середньої інтенсивності забарвлення на білок в нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих щурів ($0,326 \pm 0,0014$ од.опт.густини), тоді, коли у старих щурів, навпаки,

спостерігається зниження середньої інтенсивності забарвлення на білок в нейронах БПЯ гіпоталамуса ($0,196 \pm 0,0017$ од.опт.густини) ($p < 0,001$).

Уперше експериментально встановлено співвідношення між аміно- та карбоксильними групами у складі білків (коефіцієнт R/B) у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів за модифікації фотоперіоду, що дає змогу оцінювати процеси окиснювальної модифікації білків у нейронах БПЯ гіпоталамуса у відповідь на зміну режиму освітлення. При цьому виявлено вірогідну вікову різницю показника коефіцієнту R/B: у зрілих щурів о 02.00 год. він становив $1,26 \pm 0,006$, тоді коли у старих щурів – $1,17 \pm 0,004$ ($p < 0,001$). Тривалий вплив освітлення веде до зростання коефіцієнту R/B і у зрілих ($1,48 \pm 0,008$), і у старих щурів ($1,24 \pm 0,007$) ($p < 0,001$).

Вперше описано субмікроскопічний характер перебудови архітекtonіки нейронів БПЯ гіпоталамуса старих щурів за зміни режиму освітлення, що проявляється вираженими гіпертрофічними та початковими деструктивними змінами ядер і органел нейронів БПЯ гіпоталамуса. Більш істотні ультрамікроскопічні зміни спостерігали у щурів, що перебували за умов світлової стимуляції, ніж при світловій депривації, що підтверджується зміною ультраструктури нервових клітин о 02.00 год. та появою “темних” клітин.

Вперше з’ясовано циркадіанні відмінності у досліджуваних структурах та доведений позитивний вплив мелатоніну ($0,5$ мг/кг) в якості експериментальної терапії для корекції виявлених відхилень.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати дослідження значно розширюють наукові дані про гістологічну, морфометричну, гістохімічну, імуногістохімічну та субмікроскопічну організацію одного з ключових елементів у регуляції циклу сон-неспаннн – БПЯ гіпоталамуса.

Відомості щодо структури БПЯ гіпоталамуса та щільності МР у них мають важливе значення для пізнання механізмів регуляції циклу сон-неспаннн та циркадіанної організації головного мозку щурів.

Одержані дані про співвідношення між аміно- та карбоксильними групами у складі білків нейронів БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів за модифікації фотоперіоду дають змогу оцінити процеси окиснювальної модифікації білків, що може бути використано при розробці нових методів протекції у відповідь на окиснювальний стрес.

Визначення вікових особливостей перебудов досліджуваних структур мають важливе значення для пізнання механізмів виникнення та розвитку розладів сну та десинхронозів за модифікованого фотоперіоду у віковому аспекті. Отримані відомості дають можливість покращити ранню діагностику, удосконалити лікування та профілактику виникнення цих патологічних станів.

Дані дослідження дозволяють науково обґрунтувати застосування мелатоніну при хронопатологічних явищах та розладах сну.

Впровадження результатів дослідження. Наукові розробки впроваджено у навчальний процес - у матеріали лекцій та практичних занять, а також у наукову роботу кафедри анатомії людини ім. Т.Г. Туркевича, кафедри анатомії, клінічної анатомії та оперативної хірургії, кафедри гістології, цитології та ембріології Буковинського державного медичного університету; кафедри оперативної хірургії та клінічної анатомії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова; кафедри патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології Запорізького державного медичного університету; кафедри анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії Запорізького державного медичного університету; кафедри анатомії людини Івано-Франківського національного медичного університету; кафедри клінічної медицини навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійно виконаним дослідженням. Автором проаналізовано наукову літературу і проведено патентно-інформаційний пошук. Разом із науковим керівником визначено мету та завдання наукової роботи, складено план та робочу

програму дослідження; підібрано методи дослідження. Дисертантом самостійно проведено всі етапи експерименту та зібрано матеріал для гістологічних, морфометричних, гістохімічних, імуногістохімічних та субмікроскопічних досліджень. Особисто написано та проілюстровано всі розділи дисертації, проведено статистичну обробку й аналіз отриманих даних. Висновки сформульовані разом із науковим керівником. Автор самостійно та за співавторства підготував праці до публікації, у яких реалізував наукові ідеї. Результати дослідження висвітлені у доповідях на всеукраїнських та закордонних науково-практичних конференціях та конгресах.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення та висновки дисертації оприлюднені на 9th International Scientific and Practical Conference «Challenges in Science of Nowadays» (Washington, USA, July 16-18, 2021); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Вікові та хронобіологічні аспекти медицини і фармації» (Чернівці, 4-5 жовтня 2018 р.); Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених ВІМСО (Чернівці, 2-5 квітня 2019р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Охорона та захист здоров'я людини в умовах сьогодення» (Київ, 1-2 лист 2019р.); IV International Scientific and Practical Conference “Priority directions of science development” (Lviv, Ukraine, 3-4 February 2020); 101-ї підсумковій науковій конференції професорсько-викладацького складу ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», присвяченій 75-річчю БДМУ (Чернівці, 2020 р.); Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених ВІМСО (Чернівці, 7-8 квітня 2020р.); 5th International Scientific-Practical Conference “Natural Science Readings” (May 28-30, 2020. Bratislava); 1st International scientific and practical conference “Actual trends of modern scientific research” (Munich, Germany July 19-21, 2020); Міжнародній науково-практичній конференції «Вітчизняна та світова медицина: вимоги сьогодення» (Дніпро, 9-10 жовтня 2020р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Нові досягнення у галузі медичних та фармацевтичних наук» (Одеса, 20-21

листопада 2020р.); Підсумкова 102-а науково-практична конференція професорсько-викладацького персоналу БДМУ (Чернівці, 8, 10, 15 лютого 2021р.); Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених ВІМСО (Чернівці, 6-9 квітня 2021р.); VII Національному конгресі геронтологів і гериатрів України (Київ, 6-8 жовтня 2021р.); Міжнародній науково-практичній конференції “Актуальні досягнення медичних наукових досліджень в Україні та країнах ближнього зарубіжжя” (м. Київ, 1–2 жовтня 2021 р.); The 3rd International scientific and practical conference —Topical issues of modern science, society and education (Kharkiv, October 3-5, 2021). V International Scientific and Practical Conference “Science, innovations and education: problems and prospects” (Tokyo, Japan, 8-10 December 2021); XIV International Scientific and Practical Conference “Theoretical foundations in practice and science” (Bilbao, Spain, 2021).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 28 наукових праць, зокрема, 8 статей (4 – у закордонних виданнях, одне з яких індексується у наукометричній базі Scopus; 4 публікацій – у фахових наукових виданнях України категорії «Б»), 18 тез (4 з яких на закордонних конференціях), отримано 2 патенти України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 222 сторінках (155 сторінок основного тексту) і складається із анотації (українською та англійською мовами), змісту, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Дисертація проілюстрована 88 рисунками та 25 таблицями. Список використаних джерел включає 242 опрацьоване найменування, із яких 104 – кирилицею та 138 – латиницею.

РОЗДІЛ 1
СУЧАСНІ ВІДОМОСТІ ПРО БІЧНЕ ПЕРЕДЗОРОВЕ ЯДРО
ГІПОТАЛАМУСА ТА ЙОГО УЧАСТЬ У РЕГУЛЯЦІЇ ЦИКЛУ
СОН-НЕСПАННЯ
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Біологічні ритми як фундаментальна властивість всіх живих організмів

Фізіологічні процеси в живих системах підпорядковані закономірним циклічним коливанням – біологічним ритмам [1], а будь-які зміни в житті людини є джерелом стресу, що є універсальною реакцією на необхідність адаптації до нових умов довкілля [2]. Під біологічними ритмами розуміють закономірні коливання інтенсивності процесів і фізіологічних реакцій, в основі яких лежать зміни метаболізму біологічних систем, зумовлені впливом зовнішніх (зміна освітленості, температури, магнітного поля, інтенсивності космічних випромінювань, морські припливи і відливи, сезонні і сонячно-місячні впливи) і внутрішніх (нейрогуморальні процеси, що перебігають в певному, спадково закріпленому ритмі) чинників [3]. Біологічні ритми є еволюційно виробленими механізмами [4], які забезпечують адаптацію та виживання живих істот в умовах зовнішнього середовища, що постійно змінюється [5].

Циклічність біологічних функцій на всіх рівнях організації життя є [6] невід'ємною та фундаментальною властивістю всіх живих організмів [7], починаючи від одноклітинних організмів, рослин і закінчуючи людьми [8]. Серед всіх біологічних ритмів найважливішими та найпомітнішими є циркадіанні ритми [9], що мають найбільше значення для організму людини [5] та належать до вільноперебігаючих ендогенних ритмів [10], тривалістю приблизно 24 год [9]. Вони закріплені генетично [2] та пов'язані з циклічною зміною дня і ночі, тобто обертанням Землі навколо власної осі [4].

Формування циркадіанних ритмів забезпечується участю ендогенних чинників із залученням певних анатомічних структур, що виконують роль «внутрішнього біологічного годинника» – циркадіанних пейсмейкерів. Циркадіанна система ссавців складається з ієрархічної багатоосциляторної структури [11], яку умовно можна розділити на 2 частини: центральний годинник [12], що знаходиться в надперехресному ядрі (НПЯ), яке розташоване у передньому гіпоталамусі [9] та отримує світлові сигнали, і периферичні годинники, що знаходяться в різних тканинах по всьому тілу [12]. НПЯ являє собою двостороннє парне ядро, що складається з ущільнених нейронів малого діаметра, які розташовані латеральніше третього шлуночка, на вершині зорової хіазми [13]. НПЯ є унікальним у всьому мозку ссавців, оскільки його нейрони утворюють пов'язану міжклітинну мережу, здатну до самопідтримуваних циркадіанних коливань як нейронної активності, так і експресії генів, навіть за відсутності зовнішніх подразників [14]. Було показано, що тварини з ураженням НПЯ мають такий самий загальний час сну, як і контрольні, але сплять у неконсолідованих випадкових нападах, не пов'язаних з циклом світло-темрява, а трансплантація донорського НПЯ рятує нормальний фенотип у цьому відношенні [15].

По всьому тілу периферійні молекулярні біологічні годинники передають часовий контроль над органами та тканинами [16] та відіграють невід'ємну та унікальну роль у кожній із відповідних тканин, керуючи циркадіанною експресією специфічних генів, які беруть участь у різноманітних фізіологічних функціях [17]. Сьогодні на клітинному рівні відкрито циркадіанну ритмічність у метаболізмі синтезу ДНК та РНК у клітинах, в анаболізмі білків, у роботі ферментів, у синтезі АТФ у мітохондріях [18]. Окрім того, виявлено наявність циркадіанних ритмів рухової активності, температури тіла та шкіри, частоти пульсу і дихання, кров'яного тиску, діурезу [10] та болю. У пацієнтів менш виражений біль в темновий період доби, а у здорових людей вночі вищий больовий поріг [19]. Особливу цікавість викликають сезонні загострення захворювань внутрішніх

органів. В період біологічної весни й осені циркадіанні ритми знаходяться в процесі підйому або спадання їх амплітуди. Цей момент є одним із визначальних факторів в патогенезі сезонних загострень захворювань [6].

Внутрішні механізми вимірювання часу дозволяють організмам адаптуватися до змін навколишнього середовища, що повторюються, які спричинені добовими ритмами [20]. Якщо організм позбавити можливості відчувати зміну дня і ночі (в умовах експериментальної лабораторії або полярної ночі та полярного дня), він все одно буде відтворювати циркадіанний ритм з тією самою періодичністю, зберігаючи чіткий режим сну та неспання [21].

Люди здавна помітили, що неузгодженість між способом життя і «біологічним годинником» може мати негативні наслідки для здоров'я [22]. Людський організм зберігає свій ритм у своєму часовому поясі. Під час подорожі різними широтами, швидкістю, що перевищує рух Землі, зміни зовнішніх сигналів перевищують рівень терпимості біологічних годинників організму. Це спричиняє зміни у нашій фізіологічній діяльності, режимі сон-неспання, розумовій активності, змушуючи їх тимчасово втрачати відлік часу, які з часом знову синхронізуються з новими часовими поясами [23].

Ритмічність на клітинному рівні породжується за механізмом молекулярного зв'язку, в якому гени циркадіанного годинника регулюють свою власну транскрипцію, а також транскрипцію сотень керованих ним генів [24]. Молекулярна основа регуляції циркадіанних ритмів забезпечується генами, робота яких здійснюється за принципом позитивного і негативного зворотного зв'язку. Нагромаджені протягом дня білки BMAL1 і CLOCK утворюють комплекс BMAL1/CLOCK, який активує транскрипцію генів PER (PER1, PER2, PER3) і CRY (CRY1, CRY2). Синтезовані білки PER і CRY також формують комплекс PER/CRY, що діє за принципом негативного зворотного зв'язку. PER/CRY переміщається в ядро клітини і пригнічує активність комплексу BMAL1/CLOCK, що призводить до зниження експресії білків PER і CRY. Протягом ночі комплекс PER/CRY руйнується, і 24-годинний цикл

починається заново [25]. Інший ген, який бере участь у регуляції циклу сон-неспанья - REVERB- α . Комплекс BMAL1/CLOCK активує транскрипцію гена, що призводить до накопичення в клітині білка REVERB- α . Білок REVERB- α в свою чергу пригнічує транскрипцію гена BMAL1 і ймовірно генів CLOCK і CRY1 [26]. Мутації у гені CLOCK призводять до зміни циркадіанного ритму. Мутантний білок CLOCK, аналогічно до нормального, формує з BMAL1 комплекси, що зв'язуються з ДНК, але вони не можуть активувати транскрипцію [27]. Водночас, порушення BMAL1 у ссавців призводить до низки фізіологічних відхилень, включаючи порушення циркадіанного ритму, аберації в циклі сон-неспанья, порушення функції сітківки, нейродегенерацію і коротший термін життя [28].

Не можна ігнорувати докази взаємозв'язку між циркадіанною системою та статевими відмінностями. Гендерні відмінності в регуляторних подіях на рівні окремих клітин мозку можуть виникати внаслідок багатьох чинників, включаючи: різницю статевих хромосом, спеціалізацію в експресії рецепторів, іонні канали або як результат різниці в циркулюючих гормонах. У свою чергу, ці гендерні відмінності можуть породжувати різницю між чоловіками та жінками в будові органів та їх поведінці. Так, на сьогодні відкриті морфологічні гендерні відмінності в будові НПЯ гіпоталамуса як у тварин, так і у людей. Наприклад, електронно-мікроскопічний аналіз вказує на те, що в НПЯ самців щурів є більше нейронів, які містять більше ядер, ніж самки, і що загальний обсяг нейронів також більший. Водночас, у жінок спостерігається більша експресія нейромедіаторів ГАМК/глутамату ніж у чоловіків [29].

Чинники, які впливають на ритмічність процесів, що відбуваються у живих організмах називаються синхронізаторами. Одним з найсильніших синхронізаторів для людини є зміна світла і темряви та тривалість фотоперіоду [30]. Щоденний вплив світла на сітківку необхідний для синхронізації циркадіанних ритмів із зовнішнім 24-годинним сонячним середовищем [31]. Світловий подразник (переважно в синьому діапазоні) активує розпад меланопсину в фоторецептивних клітинах сітківки ока [32], звідки по

ретиногіпоталамічному шляху надходить у НПЯ гіпоталамуса [7]. У людини максимальний вплив на НПЯ має синє світло світлодіодів (з довжиною хвилі 480 нм), яке часто використовують у сучасних гаджетах [33], а потім в порядку спадання ідуть хвилі довжиною 472, 500, 520 і 548 нм [9], що діють як найбільш сильний сигнал для активації рецепторів меланопсину та стимулюють неспання. Водночас, червоний світловий спектр сприяє засинанню [34].

Постійний світловий режим десинхронізує морфофункціональну активність нейронів НПЯ, змінює концентрацію РНК в їх ядрі, ядерці та цитоплазмі [35]. На тваринних моделях порушення циркадіанного ритму через зміну режиму освітлення та впливу тривалого світлового режиму призводило до зниження експресії *Per-2* в НПЯ [36]. У літературі добре показано, що циркадіанні ритми стають менш стійкими зі старінням, що характеризується зниженням їх амплітуди і здатності пристосовуватися до фазового зсуву (зміни в фазах циркадіанних ритмів) [37].

Наш 24-годинний циркадіанний цикл сон-неспання [38] - це найбільш очевидний добовий ритм, який спостерігається у людей і багатьох тварин, однак сон – це не тільки частина циркадіанної системи [8]. Нормальний сон – один з “трьох китів” здоров’я, поруч з правильним харчуванням та фізичною активністю [39]. Приблизно третину свого життя людина проводить уві сні, а його якість визначає загальний рівень здоров’я [34]. Сон характеризується відносною нерухомістю і зниженою чутливістю до подразників навколишнього середовища [40]. Відомо, що у головному мозку, який нормально функціонує, зниження рівня активності (засинання) – це не пасивний [41], а складний фізіологічний процес, що потребує взаємодії різних ділянок головного мозку [39].

Найбільш важливою ознакою природного сну є його ритмічність [42]. Сон складається зі двох фаз, фази повільного сну (NREM), в якій розрізняють 4 стадії: 1-я стадія - дрімота, 2-я стадія - легкий сон, 3-тя стадія - помірно глибокий сон і 4-я стадія - глибокий сон та фази швидкого сну (REM) [34].

Нічний сон складається з 4-5 таких циклів, кожен з яких розпочинається з перших стадій повільного та завершується фазою швидкого сну. Кожний цикл у людини триває близько 90-100 хв [10]. Повільний сон займає 75-80% від загальної тривалості нічного сну [43] (співвідношення тривалості фаз наступне: 1-ша фаза повільного сну – 5%, 2-га фаза повільного сну – 50%, 3-тя фаза повільного сну – 25 %, 4-та фаза повільного сну– 20%) [44], а швидкий – 20-25% [43]. Для фази повільного сну характерне уповільнення всіх процесів життєдіяльності, відсутність сновидінь. Для фази швидкого сну характерне підвищення мозкової й гемодинамічної активності, активні рухи очних яблук, наявність сновидінь [44]. Ритмічне чергування фаз сну є одною з диференційних ознак від монотонних станів, подібних до сну (наркоз, кома, фармакологічний сон) [42].

Давно клінічно було показано, що жінки та чоловіки мають різні моделі сну. Зокрема, жінки парадоксальним чином сплять довше, ніж чоловіки, але повідомляють про нижчу якість сну. Дослідження електроенцефалографії також показали більшу частку глибокого повільного сну (стадія 3) і меншу кількість легкого сну (стадія 1 і 2) у жінок, ніж у чоловіків. Однак клінічні дані не узгоджуються з цими висновками, та показують, що у жінок діагностували безсоння та інші розлади сну, значно частіше, ніж у чоловіків. Гендерні відмінності в моделях сну можуть бути пов'язані з незалежними від сну факторами, включаючи психосоціальні, які можуть бути пов'язані з більшою тривожністю у жінок [45].

1.2. Структура бічного передзорового ядра гіпоталамуса та його участь у регуляції циклу сон-неспанья

Сон – це надзвичайно складний генетично детермінований циклічний процес [46], що регулюється гомеостатичними та циркадіанними процесами, які залучають різні нейронні структури, серед яких надзвичайно важливою є гіпоталамічна регуляція [47]. Гомеостатичний процес залежить від тривалості сну і неспанья. Циркадіанний процес визначає періоди високої і низької

схильності до сну (на відміну від гомеостатичного процесу він практично не залежить від кількості годин сну і неспання) [48]. Коли гомеостатичний потяг до сну зростає вище певного порогу, запускається сон; коли він знижується нижче іншого порогу, активується неспання. Циркадіанний процес являє собою добову коливальну модуляцію цих порогів. Вважається, що швидке перемикавання мозку між станами сну та неспання досягається за допомогою протилежних гальмівних дій нейронних структур, що сприяють сну та пробудженню, один на одного, що називається моделлю регуляції сну «Flip-Flop Switch» [49]. Окрім цього існує ще і ультрадіанний процес, що описує чергування фаз повільного і швидкого сну [48].

Сьогодні доведено, що у гіпоталамусі є кілька нейропептид-продукуючих нейронів, що беруть участь у регуляції циклу сон-неспання [47]. Неспання — це поведінковий стан, що визначається довільною руховою активністю та реагуванням на внутрішні та зовнішні подразники [14]. Перехід від стану неспання до сну і навпаки забезпечується активацією чи гальмуванням певних нейромедіаторних систем. Так, в підтриманні стану неспання беруть участь моноамінергічні системи стовбура, холінергічна система передніх відділів мозку [41], орексинергічна система [50], а провідну роль у підтримці неспання відводять горбовому сосочкоподібному ядру (ГСЯ) гіпоталамуса [51]. Шляхи, що сприяють пробудженню, піднімаються через парамедіанну область середнього мозку, розділяючись на дорсальний шлях у таламус і великий вентральний шлях, який іннервує гіпоталамус, базальну частину переднього мозку та кору [14]. Нейрони орексину стають більш активними, коли збудження поєднується з енергоємними діями, такими як стрес і тривога, а також вони сигналізують про очікування їжі та винагороду [52].

На початку повільно-хвильового сну нейрони гіпоталамуса активуються циркадіанними годинниками, локалізованими в НПЯ, і гіпногенним фактором, аденозином, який поступово накопичується в мозку під час неспання [53]. Встановлено, що рівень аденозину знижується в гіпоталамусі,

стовбурі мозку, та корі головного мозку під час сну та поступово зростає під час неспання. Існує чотири типи рецепторів аденозину - рецептори A_1 , A_{2A} , A_{2B} та A_3 . Рецептори A_1 і A_{2A} (A_{1R} та A_{2AR}) привернули найбільшу увагу до регулювання сну через їх розподіл у мозку. A_{1R} , які з'єднані з білком G, зменшують збудливість нейронів в корі, мозочку та гіпокампі. A_{2AR} посилюють сон через збудження активних у сні ГАМК-ергічних нейронів у гіпоталамусі [54]. Цікаво, що астроцити є основним джерелом аденозину. Ін'єкції в мозок агоністів рецепторів аденозину збільшують повільнохвильовий сон, тоді як антагоністи аденозину, такі як кофеїн, сприяють неспанню [14]. Вважається, що кофеїн діє шляхом оборотного антагонізму аденозинових рецепторів (A_{2AR}) [55].

Критично важливим компонентом у регуляції циклу сон-неспання є структури у передньому гіпоталамусі [10], а саме бічне передзорове ядро (БПЯ) гіпоталамуса [56] (Lateral preoptic nucleus) [57], яке відносять до головних гіпногенних центрів [58] і називають "центром регуляції сну" [59]. В умовах експерименту лазерна стимуляція нейронів БПЯ (2,5 або 10Гц) викликала збільшення часу сну [60]. Нейрони цього ядра містять нейромедіатори галанін і ГАМК [61], що забезпечують інгібуючу іннервацію основних моноамінових систем головного мозку, що підтримують період неспання [62]. ГАМК-ергічні нейрони БПЯ під час сну, мічені імуногістохімічним методом, проєктуються на гістамінергічне ГСЯ гіпоталамуса, що сприяє пробудженню, у задньому гіпоталамусі [60]. Електрофізіологічні дослідження *in vitro* показують, що аденозин збуджує нейрони БПЯ гіпоталамуса прямо або опосередковано шляхом пресинаптичного інгібування ГАМК-ергічних аферентів [14].

Дослідження, засновані на електрофізіологічній реєстрації та імунохімії c-Fos, показали, що більшість нейронів, активних уві сні, у БПЯ є ГАМК-ергічними і що кількість c-Fos позитивних ГАМК-ергічних нейронів позитивно корелює з кількістю сну [63]. Останніми дослідженнями було показано, що існує два типи ГАМК-ергічних нейронів у БПЯ. Один тип - це

нейрони, що стимулюють сон, які направляють гальмівні проєкції до центрів збудження (проєкційні нейрони) [15]. При збудженні ці нейрони вивільняють ГАМК у ГСЯ, таким чином пригнічуючи активність цього ядра, що відповідає за період неспання, зменшуючи вивільнення гістаміну та викликаючи початок сну [64]. Інший тип нейронів - це місцеві нейрони, що інгібують клітини, які стимулюють сон. Одним із критеріїв, за допомогою якого можна розрізнити ці нейрони, є їх реакція на норадреналін. Проєкційні нейрони пригнічуються норадреналіном, тоді як місцеві ГАМК-ергічні нейрони активуються норадреналіном [65].

ГСЯ та БПЯ гіпоталамуса можуть інгібувати один одного, завдяки чому нейрони БПЯ вивільняють галанін та/або ГАМК на своєму кінці в ГСЯ, а нейрони ГСЯ вивільняють норадреналін та/або ГАМК у БПЯ, що забезпечує регуляцію циклу сон-неспання [66]. Концентрація ГАМК наростає по мірі поглиблення повільного сну [67]. Це призводить до блокади кори по відношенню до слухового і зорового аналізатора і циркуляції імпульсу між таламокортикальними, кірковими і ретикулярними таламічними нейронами, які визначають період неспання [68]. Глутамат, який є попередником ГАМК, регулює глибину сну і м'язовий тонус, а також, як і аспартат, впливає на процеси пам'яті, що реалізується через NMDA-рецептори [69]. Дослідження показують, що приблизно 80% нейронів, які проєктуються на ГСЯ з БПЯ, експресують галанін, що сприяє сну. Нейрони галаніну розташовані в ряді ядер і субструктур БПЯ в преоптичній ділянці. До них належать дорсальні та медіальні розширення БПЯ, а також серединне, медіальне та пришлуночкові ядра (ПШЯ) [63].

Нейрони БПЯ гіпоталамуса експресують безпосередньо генний продукт c-Fos [70], можливий маркер нейронної активності, пропорційно часу, проведеного уві сні. Це дозволяє припустити, що активність БПЯ гіпоталамуса може сприяти, підтримувати або посилювати сон [71], а ураження даного ядра призводить до розвитку безсоння [62]. Щури з гістологічно підтвердженою 70% втратою нейронів БПЯ гіпоталамуса продемонстрували значне і стійке

збільшення періоду неспання (приблизно 34%) та зниження повільного та швидкого сну [72]. Дослідженнями було встановлено, що БПЯ отримують циркадіанну іннервацію від НПЯ шляхом непрямих проєкцій через дорсальний медіальний гіпоталамус та/або суправентрикулярну зону [65].

Фізіологічні та фізіопатологічні дослідження показали, що сон підтримує тісний взаємозв'язок з обміном речовин. Показано, що сполуки, пов'язані з обміном речовин, такі як глюкоза, глікоген, лактат та/або АТФ коливаються у період неспання. Дефіцит їжі в моделях гризунів збільшує період неспання і, навпаки, споживання вуглеводів покращує сон. Зокрема, дослідження доводять, що збільшення концентрації позаклітинної глюкози у БПЯ може сприяти сну, збільшуючи активність нейронів БПЯ, що стимулюють сон. Глюкоза специфічно підвищує збудливість нейронів, що стимулюють сон. Цей ефект вимагає внутрішньонейронного метаболізму глюкози до АТФ, що, у свою чергу, інгібує АТФ-чутливі калієві канали. Крім того, після інфузії глюкози спостерігається селективне збільшення експресії *c-Fos* у нейронах БПЯ гіпоталамуса [73]. Окрім того, літературні дані вказують на те, що деякі лікарські препарати мають багато побічних ефектів, включаючи й порушення сну. Зокрема, клінічно важливі дози морфію збільшують легкий сон (стадія 2), але зменшують глибокий сон (стадії 3 і 4) та швидкий сон [74].

Зростаюча кількість доказів свідчить про те, що у регуляції циклу сон-неспання беруть участь й клітини нейроглії, зокрема астроцити. Вони взаємодіють із сусідніми нейронами шляхом вивільнення окремих нейроактивних речовин, таких як глутамат, АТФ та ГАМК [75-76]. Астроцити також відіграють важливу роль у гомеостазі сну та в когнітивних порушеннях, пов'язаних з втратою сну. Такі глобальні зміни в гомеостазі сну можуть бути опосередковані астроцитарним вивільненням АТФ та подальшим гідролізом АТФ до аденозину [77]. Крім того, стимуляція місцевих астроцитів у зоні, що відповідає за регуляцію неспання, наприклад задній гіпоталамус, збільшує сон [78]. Нещодавні дослідження показують, що селективна стимуляція

астроцитів БПЯ індукує вивільнення АТФ і тим самим сприяє сну. Водночас, інгібітор метаболізму астроцитів значно знижує рівень позаклітинного АТФ та тривалість сну [77]. Експресія c-Fos, як маркер гістологічної активності нейронів та дані електрофізіологічного запису підтверджують, що нейрони БПЯ беруть участь у підтримці сну [60]. Крім того, експресія c-Fos під час сну спостерігалася і в астроцитах БПЯ гіпоталамуса, що вказує на причинно-наслідкову залежність між астроцитами БПЯ гіпоталамуса та сном [77].

1.3. Мелатонін – фізіологічний регулятор сну та циркадіаного ритму

Доведено, що у регуляції циклу сон-неспанья, шляхом синтезу нейрогормону мелатоніну, бере участь і шишкоподібна залоза (ШЗ) [9]. ШЗ закладається в ембріональному періоді як структурна частина головного мозку, але позаутробно відбувається редукція більшої частини її зв'язків із центральною нервовою системою, а натомість встановлюються зв'язки з периферичними симпатичними нервовими закінченнями [79]. За сучасними даними ШЗ є органом який поєднує процеси адаптогенезу та імуногенезу, приймає участь у запуску стресових реакцій і визначає послідовність порушень в організмі в різні стадії розвитку стресу.

Дослідники вважають ШЗ найважливішим організатором біологічних ритмів [80]. Мелатонін – фізіологічний регулятор сну та циркадіаного ритму [81], що запускає цикл активації та репресії головних циркадіанних генів (CLOCK, BMAL1 і REV-ERB, PER1, PER2, CRY1 I CRY2) [82]. Він синтезується з амінокислоти триптофану, яка надходить з їжею і послідовно зазнає гідроксилування та декарбоксилування за участі ферментів триптофан-5-монооксигенази і декарбоксилази ароматичних кислот. Шлях утворення багатоступеневий, проміжним продуктом синтезу є серотонін, який є субстратом для утворення мелатоніну [83].

Мелатонін і меншою мірою фізична та соціальна активність людини є важливими чинниками для синхронізації циркадіанного ритму з 24-годинним днем [84]. У людини ритм виділення мелатоніну синхронізований зі звичними

годинами сну, а щоденний початок секреції мелатоніну добре корелює з початком збільшення нічної сонливості (“ворота сну”) [85]. Механізм, що лежить в основі снодійного ефекту мелатоніну, досі залишається нез’ясованим, але існує три основні гіпотези: 1) безпосередній вплив на водія циркадіанного ритму неспання, 2) зниження температури тіла, і 3) пряма дія на сомногенні структури головного мозку. Мелатонін збільшує загальний час сну, прискореним засипанням, більш рідкісними пробудженнями, відчуттям свіжості та бадьорості після пробудження [86].

Мелатонін транспортується сироватковим альбуміном [25] і впливає на органи-мішені зв’язуючись з специфічними рецепторами в плазматичній мембрані [43] та ядрі (ROR α /RZR) [87]. Відомі зараз рецептори до мелатоніну поділяють на два основних типи: мелатонінові рецептори 1-го типу (MPT1) та 2-го типу (MPT2) [88], хромосомна локалізація яких 4q35 та 11q21-22 [89]. У MPT1 розрізняють три субтипи: 1A, 1B та 1C. У головному мозку ссавців, у тому числі і людини, переважають рецептори типу 1A та 1B [90]. Передача сигналу за допомогою рецепторів мелатоніну MPT1 і MPT2 відбувається за рахунок зв’язування гетеро тримерних G-білків, що складаються з α , β і γ - субодиниць. Активація цих рецепторів призводить до дисоціації G-білка на α -субодиницю і $\beta\gamma$ -димер, який взаємодіє з різними ефекторними молекулами, які беруть участь в клітинному сигналі. Ефекторна система, на яку діє мелатонін через рецептори MPT1 і MPT2, включає аденілатциклазу, фосфоліпазу C, фосфоліпазу A2, калієві канали і гуанілатциклазу і кальцієві канали [91]. Шляхом експериментальних досліджень було виявлено, що вплив на MPT1 рецептори пов’язано з пригніченням електричної активності мозку і, як наслідок, снодійним ефектом, а вплив на MPT2 - зі зміщенням фаз сну та неспання [92]. При відсутності рецепторів мелатонін діє на клітину шляхом модуляції цитоскелета та мітотичної активності через зв’язування з кальмодуліном [93].

Протягом дня у людини синтезується приблизно 30 мкг мелатоніну [94], а у його секреції спостерігається циркадіанний характер. Саме в темновий

період доби виробляється близько 70% добової кількості мелатоніну [95] і його концентрація у крові у темновий період доби в 5-10 раз вища, ніж у день. Увечері рівень починає підвищуватися, досягаючи максимуму – від 60 до 100 мг/мл – о 02.00-04.00 год., а згодом поступово знижується і з 07.00 до 20.00 год. залишається низьким – нижче 20 мг/мл. Депонування мелатоніну у ШЗ не відбувається. Коли його рівень у залозі підвищується, він, маючи ліпофільні властивості, надходить у кровотік шляхом пасивної дифузії за концентраційним градієнтом [83]. Мелатонін гідролізується в печінці і виводиться з сечею (80-90%), основними метаболітами є 6-гідроксимелатонінсульфат і 6-гідроксиглюкуронід. Концентрація метаболітів мелатоніну в слині і/або сечі добре корелює із загальним рівнем мелатоніну в крові [25].

Мелатонін завдяки своїм плейотропним механізмам та унікальним способам дії, здатний регулювати деякі фізіологічні та нервові функції. Серед них циркадіанні та сезонні біоритми організму; цикл сну і неспання; ендокринні функції, такі як енергетичний обмін, глікемічний контроль, гестація та розвиток плоду; імунна система; нейронний розвиток, нейронний захист та нейропластичність тощо [32]. Мелатонін широко застосовують як додаткову терапію при лікуванні інсультів. У дослідженні Z. Pei та ін. показано, що введення мелатоніну після експериментального інсульту у тварин знижує обсяг ураженої ділянки. У цілій низці досліджень мелатонін продемонстрував нейропротективний ефект при нейродегенеративних захворюваннях. Зокрема, мелатонін зменшує токсичність β -амілоїду і запобігає загибелі клітин в експериментальних моделях хвороби Альцгеймера, а також зменшує окислювальний стрес у моделях хвороби Паркінсона [96].

Мелатонін відіграє ключову роль у патофізіології різних серцево-судинних захворювань [97]. Дослідження доводять, що мелатонін має кардіопротективний ефект при інфаркті міокарда. Уведення мелатоніну через 45 хв після експериментальної оклюзії лівої передньої низхідної коронарної артерії зменшило розмір зони інфаркту з $59\pm 4\%$ (контрольна група) до $39\pm 5\%$,

схожі дані отримали в експериментах, коли мелатонін вводили через 30 хв після оклюзії [98]. Також McMullan та співавторами доведено взаємозв'язок між рівнем мелатоніну та ризиком розвитку гострого інфаркту міокарда. Чим нижчий рівень мелатоніну, тим вищий ризик розвитку гострого інфаркту міокарда, і цей взаємозв'язок особливо чітко простежується у жінок з підвищеним значенням індексу маси тіла [99].

Мелатонін проявляє антиоксидантні властивості і може бути корисним для запобігання реакціям окислювального стресу. Вважається, що вироблення активних форм кисню (АФК), що спричинені запаленням, змінює властивості клітинної мембрани, що призводить до дисфункції тканин і, як наслідок, подальшої продукції АФК. Мелатонін задіяний у реакціях вільних радикалів та активує ендogenous систему захисту [100]. Механізм антиоксидантної дії мелатоніну полягає у зв'язуванні вільних радикалів та активації захисного фактору – глутатіонпероксидази, у такий спосіб запобігаючи пошкодженню ДНК, клітинних білків та ліпідів мембран [96]. Порушення секреції мелатоніну сприяє розладам сну, прогресуванню раку, діабету 2 типу та нейродегенеративним захворюванням [101]. Повідомлялося, що мелатонін відіграє кілька важливих ролей у центральній нервовій системі, включаючи поліпшення нейрогенезу та синаптичну пластичність, пригнічення нейрозапалення, посилення функції пам'яті [22]. Мелатонін відіграє важливу роль у нормалізації постстресового стану завдяки впливу на нейромедіаторні системи та синхронізації добових ритмів. Діючи одночасно на нейроендокринну та імунну системи, мелатонін оптимізує гомеостаз та забезпечує захист від стресу [102].

Багато досліджень повідомляють про протиракову дію мелатоніну [103], нормальний рівень якого захищає клітини від негативних наслідків канцерогенезу [104]. Зокрема, цій темі присвячені численні дослідження, в яких показано здатність цього гормону гальмувати ріст злоякісного утворення та потенціювати дію цитостатиків. Механізм протипухлинної дії мелатоніну до кінця не вивчений, але визначені деякі аспекти гальмування пухлинного росту:

активація Т-хелперів 1-го типу та збільшення продукції ряду цитокінів (інтерлейкіну-2, 6 та інтерферону γ) [96, 105].

Мелатонін – не тільки синхронізатор циркадіанних ритмів та антиоксидант, але й важливий модулятор активності генів [106]. Досліджено, що фосфорилування гістонів, ацетилювання та метилювання ДНК, які модифікують експресію генів циркадіанного годинника, підпорядковуються циркадіанним ритмам [107-110]. Мелатонін впливає на активність багатьох генів у центральній нервовій системі, насамперед у НПЯ гіпоталамуса та в деяких периферичних тканинах [111]. Метилювання ДНК у НПЯ бере участь у регуляції циркадіанних ритмів. Метилтрансфераза гістону, MLL1, яка метилює гістон H3 на лізині 4 (H3-K4), також пов'язана з біологічними ритмами, а саме з активацією транскрипції. Дослідження продемонстрували, що швидке фосфорилування гістону 3 на Серині 10 (H3S10) у НПЯ запускається у відповідь на світло. Це фосфорилування призводить до індукції PER1 та безпосередньо-ранньої експресії генів, таких як утворення *c-fos*, що вказує на те, що опосередкована світлом сигналізація регулює експресію циркадіанних генів шляхом ремоделювання хроматину [106]. Взаємодія епігенетичних факторів із «годинними» генами (PER, CLOCK, BMAL, CRY тощо) визначає фотоперіодичний контроль циркадіанних та сезонних змін фізіологічних функцій організму [112-114].

Ендогенні мелатонінергічні системи порушуються сучасним способом життя людини через зміну циркадіанного захоплення, гостре пригнічення світлом та самостійне введення фармакологічного мелатоніну [100]. При відсутності світла дорсальні нейрони ПШЯ гіпоталамуса, що відповідають за регуляцію вегетативних функцій, забезпечують тонічну стимуляцію ШЗ. Нейрони ПШЯ мають проекційні зв'язки з нейронами, розташованими у верхньому шийному ганглії, які в свою чергу мають проекційні зв'язки з ШЗ. Вивільнення норадреналіну нейронами верхнього шийного ганглія стимулює ШЗ, наслідком чого є посилення вироблення мелатоніну. При впливі світла нейрони НПЯ інгібують нейрони ПШЯ гіпоталамуса, що відповідають за

стимуляцію ШЗ і вироблення мелатоніну. Таким чином, світло гальмує вироблення мелатоніну, а відсутність світла сприяє синтезу мелатоніну [9].

Погіршення НПЯ/ШЗ мережі часто є нормальним наслідком старіння та пов'язаних з ним захворювань, але в сучасних суспільствах, де світлове забруднення стає все більш поширеним у всьому світі, супутні патології також можуть виникати в більш ранньому віці [115]. Водночас, деякі хімічні речовини, зокрема етанол, викликають зниження або, навіть, припинення синтезу мелатоніну [6]. Негативний вплив на синтез мелатоніну мають і деякі лікарські препарати. Наприклад, β -адреноблокатори, клонідин, налоксон та нестероїдні протизапальні препарати пригнічують синтез мелатоніну [116]. Наявність добового ритму продукції мелатоніну є маркером злагодженої роботи циркадіанної системи ендогенних біоритмів і їх синхронізації зі зміною дня і ночі [117] та регуляції циклу сон-неспаннн [34]. Вагомим доказом того, що мелатонін залучений у регуляцію циклу сон-неспаннн є той факт, що блокування синтезу мелатоніну вночі за допомогою β -адреноблокаторів збільшує час перебування в періоді неспаннн під час звичайних годин сну, а введення екзогенного мелатоніну може змінити цей ефект [29]. Крім циркадіанного характеру синтезу мелатоніну у ссавців підпорядкований і сезонній періодичності. У весняні місяці (подовження світлового дня) рівень синтезу гормону падає, а восени (вкорочення світлового дня) спостерігається зворотна картина [3].

Секреція мелатоніну в організмі людини суттєво варіює залежно від віку. Його продукція починається з 3-4-х місяців життя, потім швидко збільшується, досягаючи піку у віці 1-3-х років, і далі дещо знижується до рівня, який зберігається до старості [79]. Мелатонін у новонароджених ссавців має материнське походження. Під час вагітності він легко проникає крізь плаценту. Кількість мелатоніну у грудному молоці людини також демонструє циркадіанний ритм: високий рівень у нічний час і невизначений – протягом дня [96]. У процесі старіння циркадіанний ритм секреції мелатоніну зберігається [118], проте знижується його кількість [119].

З віком концентрація мелатоніну дещо знижується, після чого його рівень залишається стабільним до 35-40 років, а потім повільно знижується і до 70 років нічна концентрація мелатоніну практично не відрізняється від денної [43]. Дослідження доводять, що середньодобова концентрація у людей похилого віку на 50% менше, ніж у молодих [118]. Морфологічно це проявляється прогресуючим зниженням загальної кількості пінеалоцитів та розвитком склерозу ШЗ [120]. Важливо також відзначити, що з віком кількість рецепторів до мелатоніну в органах і тканинах (ендотелій, серце, головний мозок, нирки, сітківка та ін.) знижується, що має важливе значення в процесах старіння організму [84]. Зі старінням змінюється і режим сну, зокрема це проявляється зменшенням загального часу сну [121] та зміною тривалості фаз сну: тривалість швидкого сну знижується щодо загальної кількості сну, а частка 1 та 2 фази повільного сну зростає [43].

На сьогодні доведені гендерні та етнічні відмінності у синтезі мелатоніну. Статеві відмінності мелатоніну включають більшу концентрацію мелатоніну, а також більш ранній початок пікових рівнів мелатоніну у жінок, ніж у чоловіків [29]. Окрім цього науковцями виявлено, що афроамериканці демонструють значно нижчу секрецію мелатоніну в сечі порівняно з американцями європейського походження [122], а представники азійської раси демонструють меншу концентрацію мелатоніну, ніж європейці [123].

Мелатонін виробляється не тільки в ШЗ. Він також виявлений у всіх органах: шлунково-кишковому тракті, печінці, нирках, надниркових залозах, серці, тимусі, статевих залозах, плаценті, матці, тромбоцитах, лейкоцитах та інших клітинах системи імунітету [124]. При цьому синтез мелатоніну в мітохондріях клітин еукаріот свідчить про унікальний механізм захисту клітинних органел від оксидативного ушкодження [117].

1.4. Порушення циклу сон-неспанння

Сон має фундаментальне значення для психічного та фізичного здоров'я людини [96]. Повнота, глибина, фазовість сну необхідні організму людини для

відновлення і коригування всіх функцій його життєдіяльності, починаючи від вітальних і закінчуючи когнітивними та емоційно-пізнавальними [68]. Уві сні центральна нервова система перемикається з аналізу екстероцептивної інформації на аналіз сигналів, що надходять від інтерорецепторів, що знаходяться у всіх системах живого організму [125]. Циркадіанний ритм циклу сон-неспанья важливий для оптимальної роботи нашого організму [126]. Унаслідок узгодженості всіх фізіологічних ритмів і з періодичними змінами в довкіллі в організмів існує надійна система регуляції функцій – гомеостаз [83].

Гострі та хронічні порушення сну є поширеною ознакою сучасного суспільства через такі фактори, як вимоги до роботи, сімейні обов'язки, соціальний тиск та вибір способу життя [127], а останнім часом і електронні пристрої, телебачення, відеоігри, комп'ютери та смартфони [128]. В результаті порушень циркадіанних ритмів виникає неузгодженість між періодом сну і фізичним/соціальним 24-годинним циклом навколишнього середовища, що може проявлятися безсонням вночі та сонливістю протягом дня [38].

Інсомнія – порушення ініціації, підтримки чи якості сну. Хронічна інсомнія характеризується тривалістю не менше місяця, порушенням соціальної, професійної чи побутової адаптації [81]. Варто відзначити, що рівень мелатоніну в сироватці крові людей, що страждають на інсомнію значно нижчий, ніж у здорових людей [85]. Сьогодні поширеність порушень сну у людській популяції сягає 80-95%. Щорічно нестачу сну відчувають від 1/3 до 1/2 населення, а в 10-15% людей безсоння – клінічно значуща проблема, яка знижує якість життя [129].

Дослідження якості нічного сну у молодших школярів показало, що порушеннями сну страждає третина дітей. В іншій роботі була встановлена висока поширеність хронічного безсоння, наростаючою з віком у жінок, які працюють розумово. У віковій групі 30-39 років порушення сну виявлялися у 36,2% жінок, в групі 40-49 років - у 44,5%, в групі 50-59 років - у 53,6% [130]. Водночас, люди старші за 75 років страждають на інсомнію в 2 рази частіше ніж люди середнього віку [131].

У сучасному світі збільшення повсякденної активності людини та звичайне використання телебачення, інтернету та мобільного телефону майже 24 години на добу призводить до поступового зменшення часу сну [132]. Епідеміологічні дослідження повідомляють, що тривалість нічного сну за останні 30 років зменшилася на 18 хвилин [133]. Зниження тривалості та/або якості сну поступово призводить до змін нервових та нейроендокринних функцій, включаючи підвищений рівень стресу, когнітивні та обмінні порушення [134], підвищення ризику розвитку онкологічних, метаболічних, серцево-судинних захворювань [4] та передчасної смерті [134]. Короткий сон (<6 годин на ніч) у людей статистично пов'язаний зі скороченням тривалості життя, підвищеною вразливістю до вірусної інфекції та зниженим титром антитіл після вакцинації [135-137]. Нещодавні дослідження доводять, що серед осіб віком до 65 років короткий сон (менше 5 год.) у вихідні дні асоціюється з вищим рівнем смертності на 52% [138].

Короткочасне позбавлення сну перед вакцинацією, негативно впливає на титри антитіл проти грипу і знижує ефективність вакцини [139]. Серед неврологічних захворювань з інсомнією асоціюються інсульт, хвороба Паркінсона, розсіяний склероз, деменція, епілепсія [39] та хвороба Альцгеймера [19]. Зокрема, згідно недавніх досліджень, частота порушень сну у хворих на хворобу Альцгеймера становить близько 70% [140], а пацієнтів з хворобою Паркінсона у 60-98% випадків [141]. Цікаво, що нові епідеміологічні дані свідчать про те, що порушення сну в середині життя може вплинути підвищити ризик деменції в наступні десятиліття [128].

Сон відіграє важливу роль у консолідації пам'яті, тоді як порушення сну значно погіршує навчання та пам'ять. Хронічне порушення сну, що включає повну втрату сну, і хронічне обмеження сну (часткова втрата сну протягом кількох днів або років), використовувалися для визначення впливу втрати сну на когнітивну функцію. Постійним результатом у цих дослідженнях є порушення уваги, про що свідчить повільний час реакції та збільшення провалів під час простих тестів на пильність. Метааналіз демонструє, що

гостра депривація сну порушує широкий спектр когнітивних функцій, включаючи істотний вплив на постійну увагу та завдання робочої пам'яті [142]. В одному дослідженні показано, що повна депривація сну протягом однієї ночі значно погіршувала об'єктивну продуктивність робочої пам'яті у молодих жінок [143]. Постійне обмеження сну може мати такі ж наслідки, як і гостра депривація сну: обмеження сну до 6 годин на ніч може призвести до значного погіршення психомоторної пильності. Якщо депривацію сну продовжити до 2 тижнів, вона може досягти рівнів порушення, які можна порівняти з приблизно 2 ночами повної депривації сну [128]. Після 5 ночей сну, обмеженого до 4 год., у здорових людей віком 22-45 років психомоторна пильність і суб'єктивна сонливість не відновилися повністю навіть після тривалого відновлення сну вночі [144].

Епідеміологічні дані вказують на те, що зменшення тривалості сну є фактором ризику серцево-судинних захворювань [145-147]. Гостра тотальна депривація сну викликає порушення серцево-судинних функцій з підвищеною симпатичною активністю. Наприклад, обмеження сну у здорових молодих людей до 5 годин протягом 1 ночі пов'язане зі збільшенням частоти серцевих скорочень на 5 ударів/хв і систолічного/діастолічного артеріального тиску на 10 мм рт.ст. [128]. Подібно до повної депривації сну, обмеження сну протягом тривалого періоду також призводить до змін частоти серцевих скорочень, артеріального тиску та показників серцевої функції [148-149]. Наприклад, обмеження сну від 3,6 до 4,5 год на ніч протягом 10 днів у здорових людей було пов'язано з підвищенням частоти серцевих скорочень і артеріального тиску. В останній (10-й) день частота серцевих скорочень була підвищена на 5 ударів/хв під час періодів сну та на 22 удари/хв у періоди позбавлення сну, порівняно з вихідними рівнями [128]. Обмеження сну до < 80% звичної тривалості протягом 4 тижнів у молодих чоловіків призводило до зниження варіабельності серцевого ритму та підвищення рівня катехоламінів у плазмі крові [148].

Останні дані свідчать про циркадіанний контроль над фізіологією шлунково-кишкового тракту за апетитом, травленням, поглинанням поживних речовин і клітинною проліферацією в травній системі [150]. Рецептори ядерних гормонів (PPAR α , PPAR γ , REV-ERB α , ROR α , HNF4 α , TR α і NURR1) присутні в метаболічних тканинах, функціонують як сенсори, які поєднують циркадіанний і метаболічний шляхи [151]. Наприклад, PPAR є сполучною ланкою між циркадіанними годинниками та енергетичним обміном. PPAR γ локалізується в жировій тканині і активує транскрипційні фактори, які підвищують ліпогенез і накопичення ліпідів. PPAR α запускає кетогенез і окислення жирних кислот печінки у відповідь на голодування [12]. Іншим фактором, який впливає на функцію циркадіанного ритму, є гени сиртуїну (SIRT). Гени сімейства SIRT є NAD⁺-залежними ферментами деацетилази класу III, які впливають на багато клітинних функцій, включаючи метаболізм людини, старіння, рак і старіння клітин. Регуляція експресії генів є одним з найважливіших механізмів, на який впливає сімейство SIRT. Існує 7 варіантів генів серії SIRT (SIRT 1–7). SIRT1, SIRT6 і SIRT7 переважно локалізуються в ядрі клітини, SIRT2 в цитоплазмі, а SIRT3, SIRT4 і SIRT5 в мітохондріях. SIRT1 відіграє значну роль у регуляції метаболічних процесів, таких як чутливість до інсуліну, ліпідний обмін та гліюконеогенез, а також тривалість життя людини [152]. SIRT1 модулює активність CLOCK:BMAL1 і сприяє регуляції циркадіанного циклу. Гени SIRT3–5 регулюють окислення жирних кислот, кетогенез, цикл сечовини та окисне фосфорилування. У процесі метаболізму чутливість до інсуліну та секреція інсуліну знижуються вночі (особливо між 03.00 і 05.00 год.) порівняно з ранком. Цей метаболічний процес, відомий як феномен світанку, підкреслює вплив контролю циркадіанного ритму на метаболізм глюкози.

Дослідження показують, що багато білків, пов'язаних з метаболізмом ліпідів (наприклад, AroB, AroA1 і AroA4) демонструють зміни протягом дня [12]. Крім того, дослідження на мишах показують, що поглинання холестерину та ліпідів у темновий період доби вище, ніж у денний [153].

Втрата синхронізації між внутрішніми годинниками та довкіллям навколишнього середовища призводить до порушення циркадіанних ритмів, що серйозно впливає на метаболічний гомеостаз, призводить до зміни харчової поведінки, зміни метаболізму глюкози, ліпідів та збільшення ваги [154]. Особи, які зазвичай сплять менше 6 год на день, мають підвищений ризик ожиріння і мають вищий середній індекс маси тіла, ніж ті, хто спить 9 год на день. [56]. Зменшення тривалості сну на 1 год в день асоціюється зі збільшенням індексу маси тіла на $0,35 \text{ кг/м}^2$ [118]. Обмеження сну, лише 2 ночі поспіль, змінило рівень гормонів, що регулюють апетит, лептин і грелін, що, в свою чергу, може підвищити апетит і, зрештою, призвести до збільшення ваги [56]. Також було доведено, що розлади сну сприяють порушенню метаболізму глюкози. Обмеження сну до 5 годин протягом 5 днів в тиждень з раннім пробудженням знижувало чутливість до інсуліну на 20% у здорових людей [34]. Також у людей із обмеженим сном виявили підвищений рівень холестерину [56].

Вплив штучного світла вночі призводить до порушення циркадної системи, що шкідливо для здоров'я. В промислово розвинених країнах, за оцінками, 75% усієї робочої сили було залучено до змінної та нічної роботи [155]. Робота в нічні години найбільше десинхронізує ритмічну діяльність, оскільки пов'язана з недостатнім сном протягом часу, що передбачений для відпочинку [156]. У таких працівників виявлено значну варіабельність циркадіанного ритму синтезу мелатоніну з початком синтезу між 21.45 і 05.05 год., що має серйозні наслідки для здоров'я [43]. Так, згідно дослідження було показано, що робітники, які працюють позмінно мали більш високий шанс розвитку абдомінального ожиріння. Водночас, постійні нічні робітники продемонстрували на 29% більш високий ризик, ніж робітники, які працюють позмінно (співвідношення шансів 1,43 проти 1,14) [34]. Водночас, було показано, що чоловіки, які працюють у нічні зміни мають вищий шанс розвитку раку передміхурової залози [34]. Епідеміологічні дослідження, переважно медсестер, виявили зв'язок між тривалою нічною роботою та 50-

100% вищою захворюваністю на рак молочної залози [155]. Інше епідеміологічне дослідження показало, що робота принаймні 3 ночі на місяць протягом 15 і більше років може підвищити ризик колоректального раку у жінок [12]. Вважається, що причина таких поганих наслідків для здоров'я працівників нічної зміни - зміщення циркадіанного ритму, хронічної втрати сну, підвищеного освітлення вночі, зміненого режиму харчування, збільшення куріння, тощо [8].

Неможливо оминати увагою роль сну в імунних процесах. Саме під час фізіологічного сну збільшується секреція прозапальних цитокінів, активація імунних клітин, їх проліферація та диференціація [157]. Рівень клітин імунної системи характеризується циркадіанним характером. Циркулюючі імунні клітини, включаючи Т- і В-клітини, досягають піку вночі, а потім, до настання ранку, знижуються [158-159]. Таким чином, сон є потужним імуномодельючим фактором, а його порушення мають імуносупресивний ефект [68]. Втрата сну викликає збільшення рівня плазмових маркерів запалення, таких як С-реактивний білок, фактор некрозу пухлини-альфа (TNF- α) та інтерлейкін-6 (IL-6) у людей [56]. Все більше даних вказують на те, що короткий час сну (< 6 або 7 год/ніч) асоційований з розвитком хронічних захворювань та схильності до гострих інфекційних хвороб. Наприклад, повне та часткове позбавлення сну у людей призводить до зміни імунних параметрів, критичних для резистентності хазяїна від інфекційних патогенів, включаючи зниження проліферації Т-клітин та зміщення цитокінових відповідей Т-хелперних клітин [136]. Встановлено, що циркадіанні ритми можуть регулювати нашу вроджену та набуту імунну відповідь, пригнічувати вірусну реплікацію всередині клітин - господарів, координувати фізіологічні процеси та часто визначати тяжкість багатьох захворювань [139, 160]. Попередні дані свідчать про те, що якщо порушується циркадіанна система, уразливість клітин-господарів щодо вірусу грипу та герпесу зростає [161-163]. Деякі патогени порушують циркадний цикл сну/неспанья, щоб викликати захворювання. Наприклад, *Trypanosoma brucei* (збудник Африканського

трипаносомозу або сонної хвороби) змінює режим сну у хворих, скорочуючи періодичність молекулярних циркадіанних годин [164].

Світло вночі як циркадіанний фактор порушення може впливати на імунну систему людини і, отже, збільшити сприйнятливість людини до тяжкості інфекційних захворювань, таких як COVID-19 [165]. Циркадіанний ген, *Vmal1*, є значним інгібітором вірусу простого герпесу та вірусів грипу, що підкреслює роль циркадіанних факторів у регуляції вірусних інфекцій [166].

Нещодавніми дослідженнями встановлено взаємозв'язок між COVID-19 та порушенням сну. У людей з ПЛР-підтвердженою інфекцією COVID-19 зменшується тривалість загального сну під час інкубаційного періоду та збільшується під час симптоматичної фази, що отримало назву ковід-асоційовані порушення сну [167]. При ефективному лікуванні спостерігається швидке повернення до вихідної тривалості сну [168]. Зміни сну під час інфекції є компонентом реакцій гострої фази, що сприяє одужанню, через механізми, що включають вироблення цитокінів та інтерлейкінів [169]. Цитокіновий шторм, що є імунною реакцією при COVID-19, призводить до запалення та пошкодження ЦНС. Вірус SARS-CoV-2 переважно вражає префронтальну кору, базальні ганглії, гіпоталамус, тобто ті області, які беруть участь у регуляції сну [170].

Велика роль відводиться взаємним ендокринним впливам сну, особливо у зв'язку з циркадною активністю ряду гормонів. Початок сну пов'язаний зі зростанням вмісту пролактину, рівень якого низький вдень і високий вночі. Сильно виражена залежність ритму сну і від циркадіанної концентрації соматотропіну [68] й гормонів ШЗ. Недавні дослідження доводять, що у здорових людей середнього віку обмеження сну (до 5,5 год протягом 14 днів) супроводжувалося зниженням рівня тиреотропного гормону та тироксину [118]. Ще одним гормоном, виділення якого регулюється циркадіанною системою є кортизол. Концентрація кортизолу в кровообігу досягає пікового рівня безпосередньо перед ранковим пробудженням. Протягом дня рівень

кортизолу поступово знижується. Найнижчого рівня він досягає під час сну після півночі [171].

На клітинному рівні сон супроводжується підвищенням динаміки хромосом та репарацією ДНК [172]. Останні дослідження ізраїльських вчених показали, що накопичення пошкоджень ДНК у нейронах протягом періоду неспання веде до наростання сонливості та, як наслідок, засинання, а під час сну дефекти ДНК виправляються ефективніше. У роботі вчених зазначається, що під час сну в нейронах накопичуються спеціальні білки, що беруть участь у репарації ДНК, зокрема Rad52 та Ku80. Ключову роль у процесі репарації відіграє білок Parg1, який є маркером пошкоджень ДНК. Він акумулюється у відповідних ділянках гена, позначаючи їх протягом періоду неспання та запускає процеси репарації під час сну. Вчені зазначають, що Parg1 посиляє сигнали про пошкодження ДНК і сприяє засипанню, щоб активувати репараційний процес. Водночас, нестача білка Parg1 маскує потребу в сні, навіть при збільшенні кількості пошкоджень ДНК. Дослідники також зазначають, що це може пояснити, чому хворі на рак люди, які приймають інгібітори Parg1, відчувають хронічну втому: ймовірно, через прийом ліків у них порушується цикл сон-неспання, а значить, втома залишається [173].

В багаточисельних працях встановлений зв'язок між психоемоційним станом людини та циклом сон-неспання, якістю нічного сну та його фазовою структурою. Нормальний фізіологічний сон є важливим антистресовим фактором, що визначає працездатність, втому та ін. Водночас, депривація сну сприяє розвитку емоційного стресу, який веде до порушення сну. При цьому формується порочне коло: викликані стресом порушення сну стають додатковим фактором, що посилює стрес [174]. Відома роль сну у патогенезі головних болів. Хороший сон може зняти напад, а недостатність сну є тригером для розвитку головного болю [175].

Порушення сну та його ритмів можуть призвести до розвитку психічних захворювань. Доведено, що у 83-100% випадків при різноманітних депресивних розладах спостерігається порушення сну [176], а прийом

мелатоніну полегшують симптоми депресії [177]. Ризик розвитку депресії у пацієнтів з інсомнією підвищується в 4 рази [178]. Вважається, що порушення циркадіанних ритмів лежать в основі перебігу хвороби біполярного розладу, де терапія яскравим світлом може полегшити депресію [179]. Додаткові дослідження інших психічних розладів (особливо шизофренії, емоційно нестабільного розладу особистості та алкогольної залежності) показали, що пацієнти з цими патологіями теж мають певний ступінь змін структури сну [180]. Дуже часто порушення сну призводить до зловживання снодійними препаратами і збільшення ризику дорожньо-транспортних пригод. Доведено, що ризик потрапити в ДТП у пацієнтів з безсонням в 2,5-4,5 рази вищий порівнюючи з здоровими людьми [178].

На сьогодні у популяції Землі спостерігається зростання людей літнього віку [43]. Поряд з численними фізіологічними змінами при старінні, змінюється і сон [82]. Варто відзначити, що у людей старших 65 років інсомнія трапляється у 40% випадків [81]. Незадоволеність сном спостерігається у 25% чоловіків і 50% жінок літнього віку. Понад 25% пацієнтів регулярно або досить часто вживають снодійні лікарські засоби [181]. Хоча затвердені в даний час ліки ефективні, вони далеко не задовільні. Бензодіазепіни, антидепресанти, антигістамінні та анксиолітики мають потенціал залежності. Більш того, деякі з цих ліків можуть поступово погіршувати продукцію мелатоніну [182].

Однією із причин порушення сну у літніх людей є втрата нейронів БПЯ гіпоталамуса [62]. Вікові зміни сну включають в себе збільшення часу засинання [183], зниження тривалості нічного сну, збільшення частоти засинання вдень, збільшення кількості нічних пробуджень і часу, проведеного без сну протягом ночі, зниження фази повільнохвильового сну [82] та зменшення відчуття задоволення від сну [43]. Прийом мелатоніну при інсомнії, особливо у літньому віці, коли його секреція закономірно знижується, веде до пришвидшення засинання та поліпшення якості сну, відсутності сонливості на наступний день, зростання якості життя [81].

Зокрема, лікування мелатоніном значно зменшило затримку початку сну на 4,0 хв, підвищення ефективності сну на 2,2% та збільшення загальної тривалості сну на 12,8хв [85]. Екзогенні добавки мелатоніну добре переносяться і не мають явних коротко- або довгострокових побічних ефектів [182]. Мелатонін зберігає фізіологічну структуру сну. При його застосуванні не відбувається пригнічення повільнохвильового глибокого сну [184]. Варто відзначити, що введення екзогенного мелатоніну уповільнює процеси апоптозу пінеалоцитів щурів та посилює біосинтез нейропептидів у ШЗ [120]. Крім літніх людей рівень мелатоніну знижений і у хронічних курців [185].

На час сну та якість сну впливають вік, психологічні та фізіологічні умови, культура та екологічні фактори [187]. Велике значення мають й умови освітлення. Зменшення інтенсивності освітлення вранці та збільшення увечері [38], активність людини в нічний час – найпоширеніші причини порушення ритму сон-неспаня [42], що супроводжуються пригніченням синтезу і секреції мелатоніну [156] та ведуть до розвитку десинхронозу [83].

Десинхроноз – це патологічний стан організму, який виникає при впливі екстремального фактору та характеризується десинхронізацією (порушенням) біоритмів [84]. За деякими дослідженнями, вплив штучного світла вночі за останнє десятиліття збільшився на 3-6% [188] і продовжує зростати більш ніж на 2% щорічного [189]. Благотворний вплив на циркадіанну синхронізацію, якість сну, настрій та пізнавальну діяльність залежить не тільки від спектрального складу світла, а й від часу експозиції та її інтенсивності. Хоча вплив синього кольору важливий для збереження добробуту, пильності та когнітивних функцій організму протягом дня, хронічний вплив синього світла низької інтенсивності безпосередньо перед сном може мати серйозні наслідки для якості сну, циркадіанної фази та тривалості циклу сон-неспаня [126]. Крім того, такі особисті якості, як вік, генотип та хронотип (прояв циркадіанних ритмів) впливають на чутливість до світлового подразника [190].

Отже, не викликає сумніву актуальність проведення гістологічних, морфометричних, гістохімічних, ультрамікроскопічних та імуногістохімічних досліджень одного з ключових елементів у регуляції циклу сон-неспанья – БПЯ гіпоталамуса в умовах модифікації фотоперіоду та вивчення динаміки даних змін у онтогенезі, а також з'ясування впливу на стан вказаного ядра мелатоніну, в якості протективного та біоритморегулювального агента.

Результати досліджень даного розділу висвітлено в наукових працях:

1. Bulyk RYe, Vlasova KV, Kushniryk OV, Yosypenko VR. Oscillations of the melatonin receptors density in the magnocellular neurons of hypothalamic supraoptic nucleus under the condition of altered photoperiod and injections of melatonin. В: Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю Вікові та хронобіологічні аспекти медицини і фармації; 2018 Жов 4-5; Чернівці. Чернівці: БДМУ; 2018, с. 18-9.
2. Йосипенко ВР. Роль вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса в регуляції циклу “сон-неспанья”. ВІМСО Journal. 2019;2019:196.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження виконано на базі кафедри медичної біології та генетики і проблемної науково-дослідної лабораторії Буковинського державного медичного університету. Фрагмент дослідження (електронна мікроскопія) виконана на базі кафедри гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського. Робота є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри медичної біології та генетики “Морфофункціональне і біохімічне обґрунтування дисфункцій нейросекреторних структур головного мозку й ендокринних залоз та гепаторенальної системи щурів при експериментальній патології, у віковому аспекті та шляхи її корекції” (шифр теми: 0119U101346 – фундаментальна).

2.1. Матеріал дослідження

Експерименти проведено на 336 білих нелінійних щурах-самцях, з яких 144 статевозрілих та 192 старих тварин. Досліджували вплив різного режиму освітлення (стандартне освітлення, світлова депривація та світлова стимуляція) на гістологічну, морфометричну, електронномікроскопічну, гістохімічну та імуногістохімічну характеристику БПЯ гіпоталамуса, а також визначали можливу роль екзогенного мелатоніну в якості експериментальної терапії для корекції виявлених відхилень.

Усі етапи експерименту проведено з отриманням згоди комісії з питань біомедичної етики Буковинського державного медичного університету та дотриманням наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р. та законами України, Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 р.), конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях (від 18.03.1986 р.) та основних положень Ухвали Першого національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (2001 р.). Дотримання

зазначених вимог засвідчено висновком комісії з питань біоетики Буковинського державного медичного університету (протокол № 3 від 18 листопада 2021 р.)

Протягом одного місяця до початку та під час проведення експерименту дослідних тварин утримували у віварії за умов сталої температури (18-21⁰С) та вологості повітря (50-55%) в окремих клітках з вільним доступом до води та їжі за стандартного режиму освітлення (світло з 08.00 до 20.00 год за допомогою люмінесцентних ламп). Контроль віку тварин здійснювали користуючись лінійними показниками, що наведені у таблиці 2.1 [191].

Таблиця 2.1 – Характеристика вікових груп білих щурів

Періоди життя		Вік	Маса тіла (г)	Довжина тіла (см)	Довжина хвоста (см)
Молочний період	Вік новонародженості	1-5 днів	4-10	4,8-5,5	1,8-3,6
	Молочний вік	6-21 день	11-35	5,3-9,3	3,6-7
Період статевого дозрівання	Інфантильний вік	22-25 днів	30-110	9,0-14,5	7-12,5
	Ювенільний вік	51-120 днів	90-270	14-19	12-16
Репродуктивний вік	Молодий вік	5-10 міс.	210-340	15-22	16-18,5
	Зрілий вік	11-18 міс.	260-360	21-23	18-19
Період старечих змін	Передстаречий вік	19-23 міс.	280-400	21-24	18-19,5
	Старечий вік	24-30 міс.	320-460	22-25	18-19,5
	Період відмирання	31-40 міс.	300-450	22-25	18-19,5

Всіх дослідних тварини поділено на вісім серій (по дванадцять щурів), кожна з яких, у свою чергу, складалася з двох груп (по шість тварин).

Серія №1 (контроль) – зрілі щури, що знаходились сім діб за умов стандартного режиму освітлення (12.00 годин світла (С) – 12.00 годин темряви (Т)). Люмінесцентні лампи вмикали з 08.00 до 20.00 год, освітленість приміщення на рівні тварин становила 500Лк.

Серія №2 – зрілі щури, що перебували сім діб в умовах постійної темряви (світлова депривація – 00.00С:24.00Т), моделювання гіперфункції шишкоподібної залози. Для годування та проведення маніпуляцій застосовували слабке червоне світло інтенсивністю – 2 Лк впродовж 10-ти хв на добу.

Серія №3 – зрілі щури, що знаходились сім діб при постійному освітленні (світлова стимуляція – 24.00С:00.00Т), моделювання гіпофункції шишкоподібної залози.

Серія №4 – зрілі щури, яким впродовж семи діб на фоні цілодобового освітлення (24.00С:00.00Т) щоденно в кінці світлової фази за 1 годину до настання темного періоду внутрішньоочеревинно вводили екзогенний мелатонін (Sigma, USA) у дозі 0,5 мг/кг маси тіла щура розведений у ізотонічному фізіологічному розчині зі слідами етанолу.

Серія №5 (контроль) – старі щури, яких утримували сім діб за умов стандартного режиму освітлення (12.00С:12.00Т), умови та інтенсивність освітлення ідентичні зрілим щурам.

Серія №6 – старі щури, що сім діб заходилися в умовах постійної темряви (світлова депривація – 00.00С:24.00Т).

Серія №7 – старі щури, які перебували сім діб при постійному освітленні (світлова стимуляція – 24.00С:00.00Т).

Серія №8 – старі щури, яким протягом семи діб на фоні цілодобового освітлення (24.00С:00.00Т) щоденно за 1 годину до настання темного періоду (19.00 год.) внутрішньоочеревинно вводили екзогенний мелатонін

(Sigma, USA) у дозі 0,5 мг/кг маси тіла щура розведений у ізотонічному фізіологічному розчині зі слідами етанолу.

Враховуючи циклічність синтезу мелатоніну, а також для виявлення циркадіанних відмінностей у досліджуваних структурах забір матеріалу здійснювали з 12-годинним інтервалом (о 14.00 та о 02.00 год.), здійснюючи декапітацію під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг, внутрішньоочеревинно).

Вивчали наступні показники:

1. Морфометрія:

- середній об'єм нейронів (мкм^3);
- середній об'єм ядер нейронів (мкм^3);
- ядерно-цитоплазматичне співвідношення в нейронах;
- середня кількість нейронів на стандартній площині гістологічного зрізу ($100 \times 100 \text{ мкм}^2$).

2. Гістохімія:

- оптична густина специфічного забарвлення на тигроїдну субстанцію (од.опт.густини);
- концентрація білків у нейронах БПЯ гіпоталамуса у монохроматичному варіанті при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo (од.опт.густини);
- коефіцієнт R/V при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo, що дозволяє кількісно оцінити співвідношення між карбоксильними та аміногрупами білків.

3. Імуногістохімія:

- оптична густина імуногістохімічного забарвлення на рецептори до мелатоніну типу 1A (в.од.опт.густини);
- оптична густина імуногістохімічного забарвлення на рецептори до мелатоніну типу 1B (в.од.опт.густини).

3. Електронна мікроскопія:

- об'єм та форма ядер нейронів;
- об'єм та форма ядерців нейронів;

- характер ядерної оболонки та міжмембранного простору;
- характер каріоплазми;
- архітектурний стан гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки;
- архітектурний стан комплексу Гольджі;
- архітектурний стан мітохондрій;
- осміюфільні включення.

2.2. Методи дослідження

Перед вирізкою матеріалу видалений головний мозок цілим фіксували 22-24 год. в нейтральному забуференому 10% розчині формаліну. Перед занурюванням у розчин формаліну робили невеликі розрізи у м'якій оболоні мозку для рівномірного і швидшого просякнення тканин мозку формаліном. Така попередня фіксація з одного боку давала можливість вирізати шматочки з мозку без його помітних деформацій, а з іншого боку давала можливість проводити гістологічні, різні гістохімічні та імуногістохімічні дослідження, адже дозволяла зберігати незмінними білки з точки зору їх хімічних та антигенних властивостей.

Далі, з зафіксованої тканини головного мозку одноразовим лезом для гоління стандартно пластинами вирізували шматочки товщиною близько одного міліметра, коли перший зріз проходив через передню частину зорового перехрестя, а другий зріз – через задню частину зорового перехрестя. Вирізані пластини тканини мозку зневоднювали у висхідній батареї спиртів та заливали в парафін при 58°C.

На санному мікроскопі робили серійні гістологічні зрізи товщиною 5 мкм. Після депарафінізації серійних гістологічних зрізів виконували забарвлення гематоксиліном і еозином, інших зрізів – гістохімічним методом за Ніслем з нейтральним червоним (модифікація) на тигроїдну субстанцію нейронів (речовину Нісля) [192], а на інших зрізах застосовували імуногістохімічні методики у відповідності до протоколів, наданих

виробником. Зокрема, провели імуногістохімічні реакції з первинними антитілами проти рецепторів до мелатоніну 1A та 1B (виробництва Abscam). Візуалізацію первинних антитіл здійснювали полімерною системою візуалізації Dako з барвником діамінобензидином (дає коричневе забарвлення місць розташування досліджуваних антигенів). Окрім вищенаведених методів застосовували гістохімічну методику на “кислі” та “основні” білки з бромфеноловим синім за Mikel Calvo [193].

Окрім описового методу гістопатологічного дослідження БПЯ ядра гіпоталамуса щурів застосована комп'ютерна морфометрія, яку проводили на попередньо отриманих цифрових копіях оптичних мікроскопічних зображень тканини (мікроскоп Delta Optical Evolution 100 (планахроматичні об'єктиви відповідно до необхідного оптичного збільшення) та цифрова камера Olympus SP550UZ).

Цифрові копії зображення аналізували за допомогою копії вільної (freeware) спеціалізованої для цифрових гістометричних досліджень комп'ютерної програми ImageJ v1.48 [194]. Зокрема, на зрізах, забарвлених гематоксилином і еозином, проведені планіметричні дослідження (середній об'єм нейронів (мкм^3), середній об'єм ядер нейронів (мкм^3), ядерно-цитоплазматичне співвідношення в нейронах), виконаний скор-тест (безповторний підрахунок, на підставі якого отриманий показник – середня кількість нейронів на стандартній площі гістологічного зрізу ($100 \times 100 \text{ мкм}^2$). На цифрових копіях зображень з гістохімічним та імуногістохімічним забарвленням оцінку інтенсивності забарвлення здійснювали методом комп'ютерної мікроденситометрії. Для цього за допомогою комп'ютерної програми ImageJ v1.48 спочатку мікрозондовим методом отримували комп'ютерну величину яскравості забарвлення у 8-бітній системі аналізу (з градацією від 0 до 255), а потім ці величини шляхом логарифмічного перетворення переводили у величину відносної оптичної густини (у од.опт.густини). Ця величина є зручною для тлумачення, оскільки вона коливається від 0 (абсолютна прозорість) до 1 (абсолютна непрозорість).

Цифрові копії зображень гістохімічних препаратів, пофарбованих бромфеноловим синім за Mikel Salvo, були оброблені методом комп'ютерної мікроспектрофотометрії в середовищі програми ImageJ v1.48. Зокрема, в місцях вимірювань були отримані величини червоного спектру "R" та синього спектру "B" у градаціях від 0 до 255 згідно системи оцінки кольору RGB. Шляхом простого ділення вищезазначених параметрів отримували результативний показник - коефіцієнт R/B, який служив мірою окиснювальної модифікації білків.

Забір матеріалу для електронномікроскопічних досліджень проводили відповідно до загальноприйнятої методики. Маленькі шматочки органу відбирали гострими інструментами, щоб уникнути зайвого пошкодження. Матеріал подрібнювали на кусочки до 1 мм в діаметрі і поміщали у баночку з фіксатором - 2,5% розчин глютаральдегіду, який приготовлений на основі фосфатного буферу Міллоніга із рН середовищем 7,2–7,4. Фіксований матеріал через 50 – 60 хвилин переносили у буферний розчин і промивали протягом 20 – 30 хвилин. Наступну постфіксацію здійснювали у 1% розчині тетраокису осмію на буфері Міллоніга протягом 60 хвилин, далі повторно промивали шматочки тканини у фосфатному буфері. Для повного видалення води із матеріалу та запобігання руйнування клітин його проводили через етиловий спирт зростаючої міцності. Протягом 1 години поміщали у 2% розчин уранілу ацетату. Подальшу дегідратацію проводили у пропіленоксиді та заливали в суміш епоксидних смол. Готовий залитий блок для застигання залишали на 24 години в кімнатних умовах, далі поміщали у термостат при температурах 37°C, 45°C, 56°C для повної полімеризації смоли. Ультратонкі зрізи, виготовлені на ультрамікроскопі LKB-3 контрастували уранілацетатом та цитратом свинцю відповідно до методу Рейнольдса і вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ – 125 К [195].

Алгоритм етапів гістологічного вивчення дослідних структур при проведенні дисертаційного дослідження додатково проілюстровано на рис. 2.1.



Рис. 2.1. Алгоритм етапів гістологічного вивчення дослідних структур при проведенні дисертаційного дослідження.

Отримані цифрові дані оброблено статистично. Зокрема, за допомогою копії вільної (freeware) комп'ютерної програми для статистичних обчислень PAST [196] застосовували попередню перевірку на нормальність розподілу за критерієм Вілкі-Хана-Шапіро. Для всіх вивчених статистичних вибірок згідно з цим критерієм гіпотеза про нормальність розподілу не відхилялася (при $p=0,05$), тому використовували параметричні методи статистичного аналізу: обчислення середньої арифметичної та її похибки, непарний двобічний критерій Стьюдента. Водночас, для підвищення надійності результатів перевірки розбіжностей між групами дослідження у середніх тенденціях, враховуючи порівняно невелику чисельність у статистичних вибірках, додатково застосовували критерій Mann-Whitney.

Результати досліджень даного розділу наведено у двох патентах:

1. Булик РЄ, Кривчанська МІ, Йосипенко ВР, винахідники; Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет»; патентовласник. Спосіб моделювання морфологічних порушень шишкоподібної залози у щурів. Патент України № 143485. 2020 Лип 27.

2. Булик РЄ, Кривчанська МІ, Йосипенко ВР, Махрова ЄГ, винахідники; Буковинський державний медичний університет; патентовласник. Спосіб експериментального порушення циркадіанної організації ренальних функцій у щурів в умовах різної тривалості фотоперіоду. Патент України № 147909. 2021 Чер 17.

РОЗДІЛ 3

ГІСТОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА БІЧНОГО ПЕРЕДЗОРОВОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ТА ГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТИГРОЇДНОЇ СУБСТАНЦІЇ ЙОГО НЕЙРОНІВ ЗА РІЗНИХ УМОВ СВІТЛОВОГО РЕЖИМУ ТА КОРЕКЦІЇ МЕЛАТОНІНОМ

3.1. Особливості гістології та морфометрії нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса за різного режиму освітлення та уведення мелатоніну

При гістологічних дослідженнях БПЯ гіпоталамуса щурів враховували особливості його розташування, розмірів та внутрішньої структури.

Зокрема, при стандартному вирізуванні шматочків головного мозку, коли перший зріз проходив через передню частину зорового перехрестя, а другий зріз – через задню частину зорового перехрестя, в готових гістологічних зрізах завжди спостерігали характерну закономірність: тоді, коли в зріз регулярно потрапляли обидва надзорові ядра, то БПЯ гіпоталамуса в гістологічний зріз потрапляло або одне (праве чи ліве), або було видно одне ядро в зоні його найбільшого діаметру, а інше ядро було розрізано тангенціально. Це означає, що розташування БПЯ не є абсолютно симетричним, хоча обидва ядра без сумніву присутні по одному в кожній півкулі, але одно з них знаходиться трохи попереду іншого.

Складнощі морфологічного визначення локації БПЯ на макроскопічному рівні проілюстровані на рис. 3.1.

БПЯ (його фрагмент) на гістологічних зрізах завжди мало круглясту або овальну форму (рис. 3.2), на відміну від сусіднього надзорового ядра, яке мало полігональну форму (рис. 3.3).

Дистанція між надзоровими ядрами та БПЯ була достатньо великою, щоби не сплутати надзорові ядра та БПЯ між собою, окрім того зовнішній

вигляд нейронів цих ядер суттєво відрізнявся (рис. 3.4), отже сплутати ці ядра було неможливо, хоча вони знаходилися у кожному зрізі.

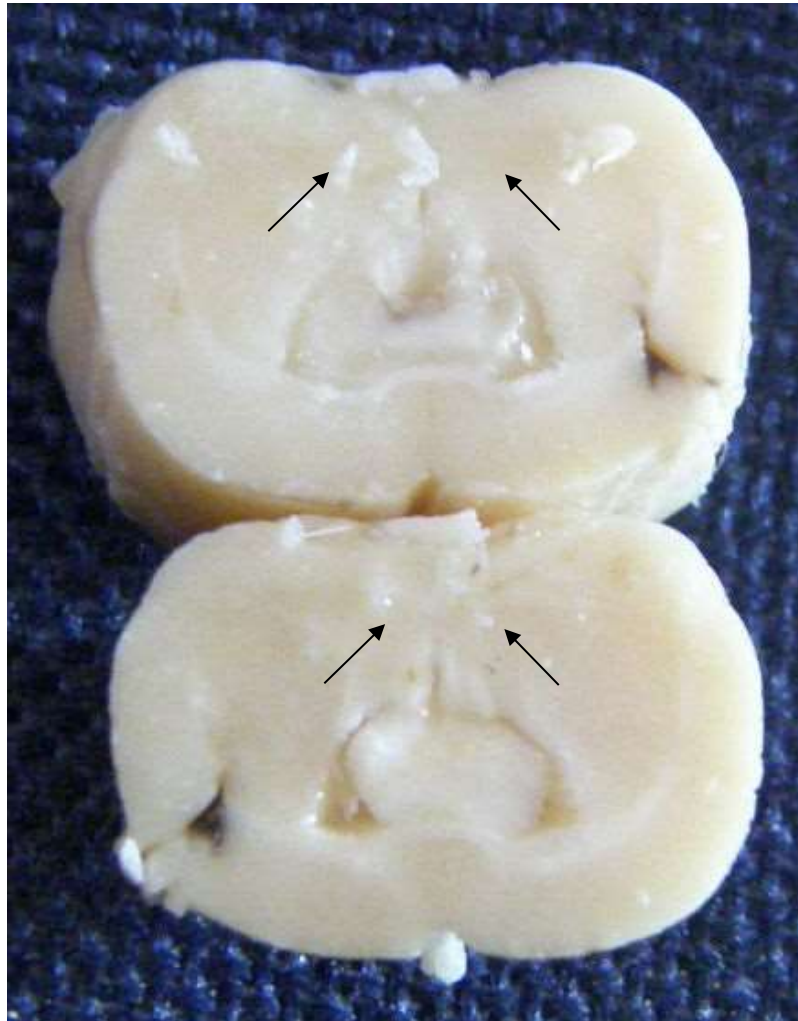


Рис. 3.1. Розрізи великих півкуль мозку, які дозволяють отримати в гістологічних зрізах фрагменти одного (лівого чи правого) або обох (правого та лівого) БПЯ гіпоталамуса. Місця прогнозованих локацій БПЯ гіпоталамуса вказані стрілками. Фото макропрепарату. Оптичне збільшення x5.

Характерною особливістю БПЯ було те, що нейрони цих утворень мали однотипну будову незалежно від того, чи розташовувалися вони на периферії чи в центральних, чи проміжних зонах кожного ядра, отже особливості нейронів можна було вивчати як на зрізах, які пройшли через центр БПЯ гіпоталамуса, так і на тангенціальних зрізах цього ядра.

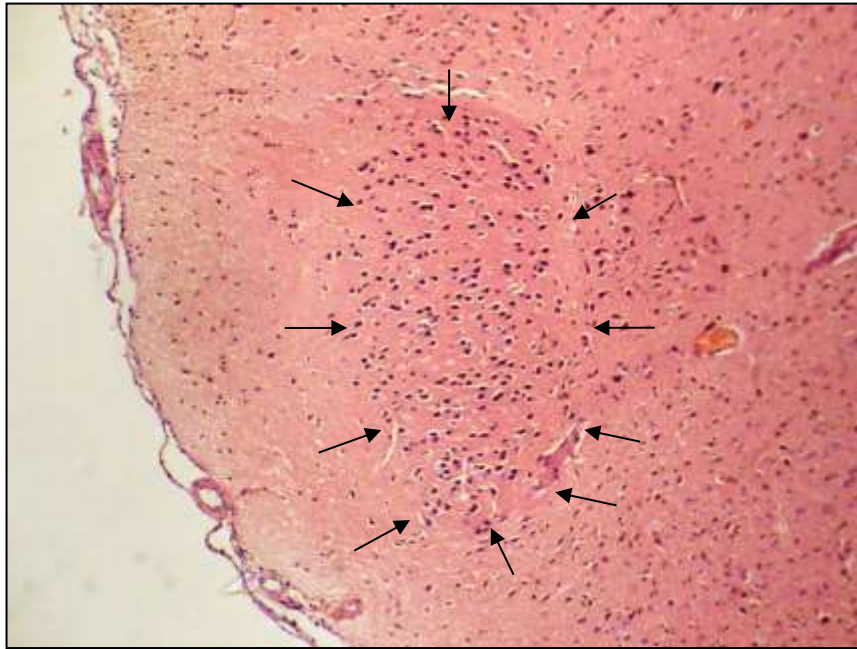


Рис. 3.2. Гістологічний зріз БПЯ гіпоталамуса (контури ядра позначені стрілками) інтактного зрілого щура. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Фото мікропрепарату. Об.10х. Ок.10х (оптичне збільшення x100).

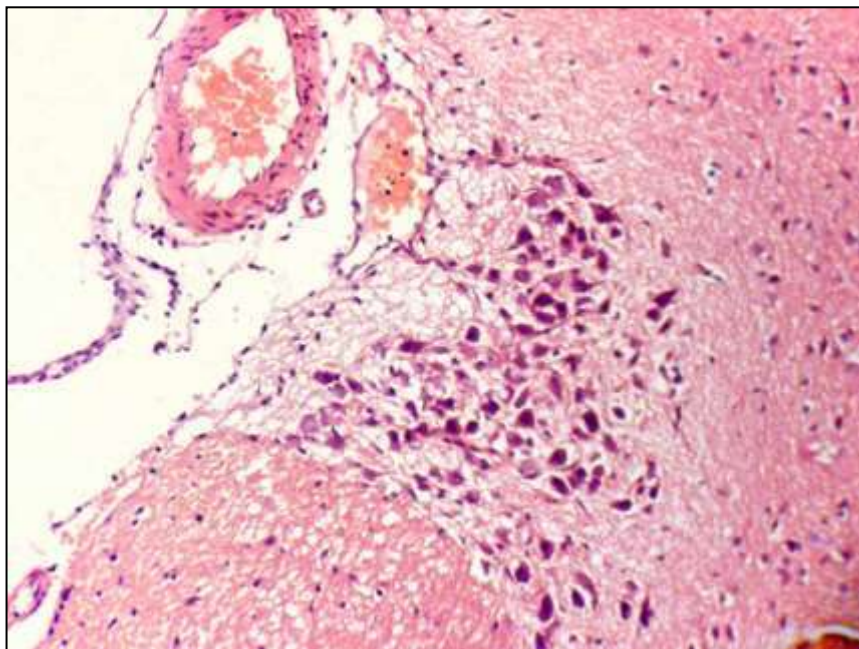


Рис. 3.3. Гістологічний зріз надзорового ядра (надається для порівняння, оскільки знаходиться, як правило, в одній площині зрізу з БПЯ гіпоталамуса) інтактного зрілого щура. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

На великих збільшеннях було добре видно, що при забарвленні гематоксиліном і еозином нейрони БПЯ гіпоталамуса мали темнопофарбоване ядро овальної або полігональної форми, часто з гострими кутами, а цитоплазма, навпаки була світлою, майже прозорою (рис. 3.5).



Рис. 3.4. У полі зору зріз надзорового ядра (ліворуч, біла стрілка) та фрагмента БПЯ гіпоталамуса (праворуч, чорна стрілка) інтактного зрілого щура. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Фото мікропрепарату. Об.10х. Ок.10х (оптичне збільшення x100)

Завдяки таким морфологічним характеристикам нейронів в них легко можна було виміряти такі цитометричні параметри як розміри ядра та клітини в цілому, а також обрахувати похідні параметри, зокрема, ядерно-цитоплазматичне співвідношення.

Окрім того, щільність розташування нейронів в окремо взятому БПЯ гіпоталамуса також була рівномірною, отже, такі вимірювання як кількість нейронів на одиницю площі БПЯ гіпоталамуса можна було вимірювати в будь-якій його ділянці – в центрі чи на периферії.

Отже, враховуючи вищеописані властивості БПЯ гіпоталамуса та його нейронів, найбільш доречним вважали вимірювання об'єму нейрона та його ядра, з наступним обрахуванням ядерно-цитоплазматичного співвідношення, а з урахуванням відмічених особливостей щодо кількості нейронів на одиниці площі БПЯ гіпоталамуса підраховували також і цей показник.

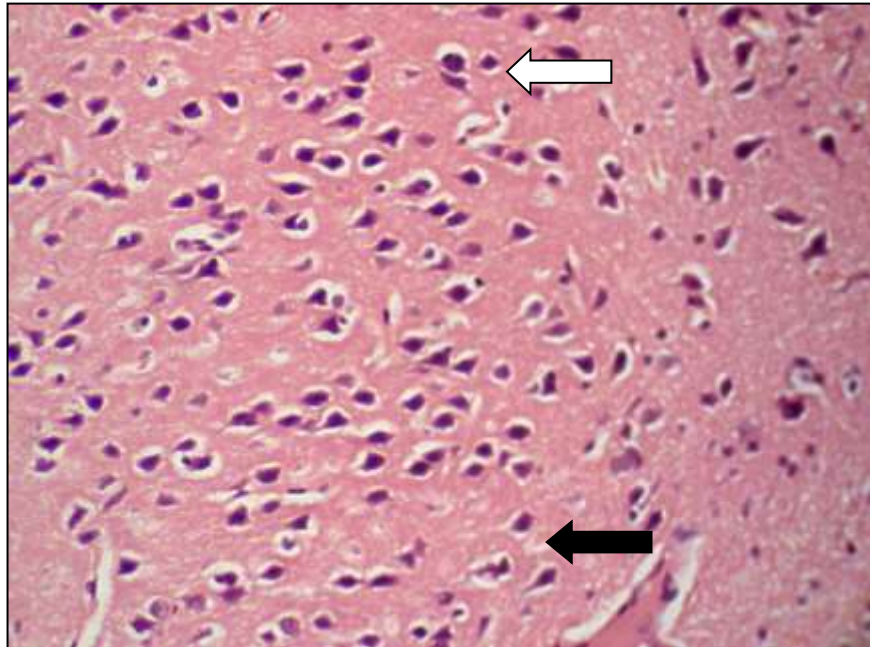


Рис. 3.5. Фрагмент проміжної (зверху, біла стрілка) та периферійної (знизу, чорна стрілка) частини БПЯ гіпоталамуса інтактного зрілого щура. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Фото мікропрепарату. Об.40х. Ок.10х (оптичне збільшення x400).

Середні дані (середня арифметична та її похибка) щодо вказаних морфометричних показників за стандартних умов освітлення наведені в таблиці 3.1.

З наведених у таблиці 3.1 даних видно, що при стандартному режимі освітлення в різні години доби експерименту по зазначених показниках розбіжностей у середніх тенденціях не виявлено.

Водночас, звертає на себе увагу те, що існує вірогідна різниця між зрілими та старими щурами, за виключенням середнього об'єму ядер. Зокрема, у старих щурів у середньому зменшується загальний об'єм нейронів,

за рахунок чого зростає ядерно-цитоплазматичне співвідношення.

Таблиця 3.1 – Окремі морфометричні показники БНЯ гіпоталамуса щурів за стандартного світлового режиму

Показник	Години доби	Зрілі щури	Старі щури
Середній об'єм нейронів (мкм ³)	14.00	1148±12,9	1007±11,6 p<0,001
	02.00	1151±12,1	1011±10,2 p<0,001
Середній об'єм ядер нейронів (мкм ³)	14.00	424±10,2	422±10,7
	02.00	426±10,0	425±10,2
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення в нейронах	14.00	0,369±0,0028	0,419±0,0031 p<0,001
	02.00	0,370±0,0025	0,420±0,0034 p<0,001
Середня кількість нейронів на стандартній площині гістологічного зрізу (100x100 мкм ²)	14.00	24±0,3	16±0,2 p<0,001
	02.00	23±0,4	16±0,3 p<0,001

Примітка: p – вірогідність різниці між групами зрілих та старих щурів.

Таку тенденцію видно навіть без морфометрії, якщо візуально порівнювати відповідні зображення на рисунках 3.5 та 3.6.

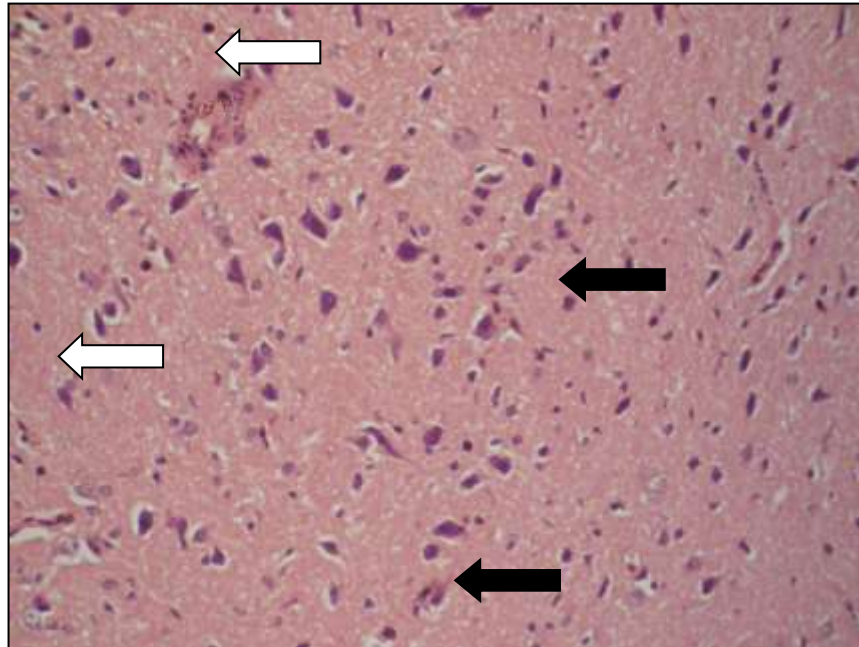


Рис. 3.6. Фрагмент проміжної (білі стрілки) та периферійної (чорні стрілки) частини БПЯ гіпоталамуса інтактного старого щура. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Фото мікропрепарату. Об.40х. Ок.10х (оптичне збільшення x400).

Разом з тим, необхідно вказати на суттєве зниження (близько 30%) в старих щурів у порівнянні зі зрілими щурами середньої кількості нейронів на одиниці площі 10 000 мкм² гістологічного зрізу (100x100 мкм²). Цікавим є те, що середнє зниження об'єму нейронів та їхньої кількості на одиниці площі БПЯ в старих щурів було нерівномірним, тобто в окремих позиціях в ядрі нейрони мали «нормальні» морфометричні параметри, іноді «нормальною» була й їхня кількість на одиниці площі гістологічного зрізу.

За умов світлової депривації всі тенденції, які описані для щурів, яких утримували за звичайного світлового режиму збереглися (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Окремі морфометричні показники БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової депривації

Показник	Години доби	Зрілі щури	Старі щури
Середній об'єм нейронів (мкм ³)	14.00	1143±12,6	1002±11,1 p<0,001
	02.00	1145±12,4	1010±10,3 p<0,001
Середній об'єм ядер нейронів (мкм ³)	14.00	423±10,5	420±10,9
	02.00	424±10,3	423±10,5
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення в нейронах	14.00	0,370±0,0027	0,419±0,0032 p<0,001
	02.00	0,370±0,0026	0,419±0,0029 p<0,001
Середня кількість нейронів на стандартній площині гістологічного зрізу (100x100 мкм ²)	14.00	22±0,6	15±0,3 p<0,001
	02.00	22±0,5	16±0,4 p<0,001

Примітка: p – вірогідність різниці між групами зрілих та старих щурів.

Розбіжностей у середніх тенденціях у щурів за умов світлової депривації у порівнянні зі щурами, яких утримували за звичайного світлового режиму не виявлено (p>0,05).

Так само вказані тенденції збереглися і за умов світлової стимуляції (табл. 3.3) та за умов світлової стимуляції й уведення мелатоніну (табл. 3.4).

Таблиця 3.3 – Окремі морфометричні показники БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції

Показник	Години доби	Зрілі щури	Старі щури
Середній об'єм нейронів (мкм ³)	14.00	1152±12,7	1006±11,0 p<0,001
	02.00	1150±12,7	1004±10,9 p<0,001
Середній об'єм ядер нейронів (мкм ³)	14.00	422±10,6	423±10,0
	02.00	425±10,3	424±10,6
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення в нейронах	14.00	0,366±0,0029	0,420±0,0021 p<0,001
	02.00	0,369±0,0021	0,422±0,0022 p<0,001
Середня кількість нейронів на стандартній площині гістологічного зрізу (100x100 мкм ²)	14.00	25±0,5	15±0,4 p<0,001
	02.00	23±0,3	17±0,4 p<0,001

Примітка: p – вірогідність різниці між групами зрілих та старих щурів.

Таблиця 3.4 – Окремі морфометричні показники БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну

Показник	Години доби	Зрілі щури	Старі щури
Середній об'єм нейронів (мкм ³)	14.00	1149±12,7	1009±11,2 p<0,001
	02.00	1150±11,9	1008±10,4 p<0,001
Середній об'єм ядер нейронів (мкм ³)	14.00	424±10,2	421±10,2
	02.00	426±10,0	423±10,0
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення в нейронів	14.00	0,369±0,0024	0,417±0,0028 p<0,001
	02.00	0,370±0,0027	0,419±0,0022 p<0,001
Середня кількість нейронів на стандартній площині гістологічного зрізу (100x100 мкм ²)	14.00	26±0,4	16±0,4 p<0,001
	02.00	25±0,5	15±0,6 p<0,001

Примітка: p – вірогідність різниці між групами зрілих та старих щурів.

У нейронах БПЯ гіпоталамуса проводили спроби з'ясувати особливості розподілу хроматину клітинних ядер, але жодних розбіжностей між різними групами дослідження виявлено не було, що в принципі відповідає даним про відсутність у середньому змін об'єму клітинних ядер нейронів залежно від часу доби, віку щурів або умов освітлення чи корекції змін мелатоніном.

Отже, проведені гістологічні дослідження БПЯ гіпоталамуса показали, що у старих щурів у порівнянні зі зрілими щурами зменшується кількість

нейронів на одиницю площі гістологічного зрізу, знижується об'єм нейронів за рахунок зменшення об'єму їх цитоплазми з відповідним зростанням ядерно-цитоплазматичного співвідношення (ядерно-цитоплазматичного коефіцієнту). Водночас, зазначені показники не реагували ні на умови освітлення, ні на час доби, коли моделювалися відповідні умови експерименту. Результати цих досліджень диктують пошуки інших морфологічних методів дослідження, які здатні виявити реакцію нейронів БПЯ гіпоталамуса на зміни режиму освітлення.

3.2 Гістохімічні особливості тигроїдної субстанції нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса за різних умов світлового режиму та корекції мелатоніном

Далі наведені результати гістохімічного забарвлення на тигроїдну субстанцію нейронів БПЯ гіпоталамуса за методом Нісля в модифікації, яка полягала у застосуванні у якості барвника нейтрального червоного у кислому забуференому середовищі.

В усіх спостереженнях тигроїдна субстанція розташовувалася у цитоплазмі нейронів БПЯ гіпоталамуса у вигляді окремих гранулярних утворень різних розмірів та форми. Розташування субстанції по цитоплазмі могло бути як рівномірним, так і з більшою асиметричною концентрацією в певних місцях, іноді навколо клітинного ядра. Інтенсивність забарвлення як окремих гранул, так і цитоплазми в цілому досить сильно варіювала, тому для відтворюваності результатів був застосований метод комп'ютерної мікроденситометрії. Кінцевим результатом таких вимірювань була величина середньої арифметичної відносної оптичної густини по окремій тварині, а з цих результатів отримані й середні арифметичні відносної оптичної густини по кожній окремій групі дослідження.

Узагальнені результати вимірювань відносної оптичної густини специфічного забарвлення нейронів БПЯ гіпоталамуса наведені у табл. 3.5-3.8.

Зокрема, у таблиці 3.5 подані результати, які стосуються експериментальних тварин, яких утримували за стандартних умов освітлення. Так, видно, що за стандартного освітлення оптична густина забарвлення на тигроїдну субстанцію нейронів БПЯ гіпоталамуса суттєво є вищою у зрілих щурів, ніж у старих щурів. Водночас, слід відмітити, що не знайдено статистично вірогідної розбіжності між періодами спостереження о 14.00 год. та 02.00 год., як для зрілих, так і для старих щурів.

Таблиця 3.5 – Оптична густина специфічного забарвлення на тигроїдну субстанцію у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за стандартного світлового режиму

Години доби	Оптична густина гістохімічного забарвлення на тигроїдну субстанцію (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,258±0,0019	0,214±0,0017 p<0,001
02.00	0,263±0,0017	0,216±0,0018 p<0,001

Примітка: p – вірогідність різниці між групами зрілих та старих щурів.

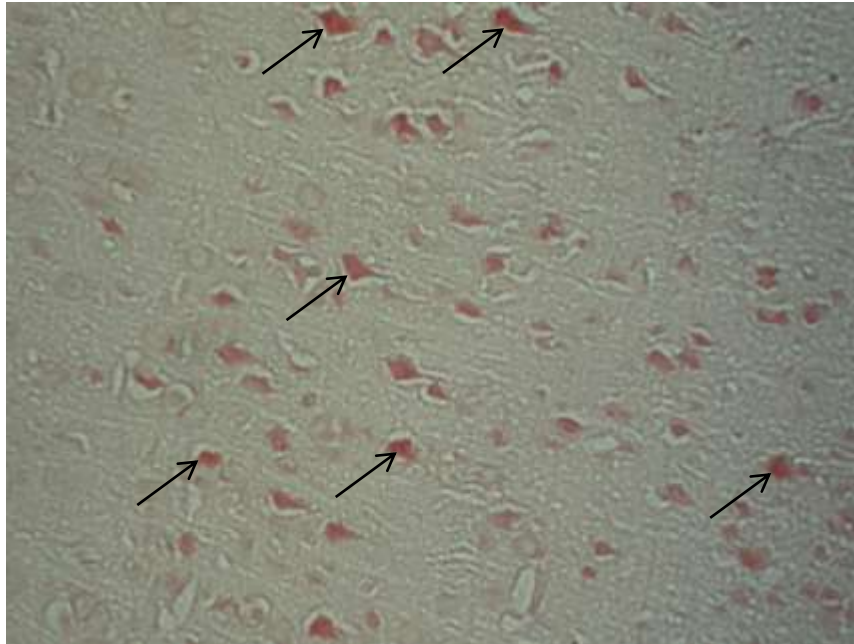


Рис. 3.7. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура о 14.00 год. при застосуванні гістохімічної методики на тигроїдну субстанцію за Ніслем з використанням барвника нейтрального червоного. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Наведені дані дозволяють вважати, що кількість речовини тигроїдної субстанції нейронів БПЯ гіпоталамуса у зрілих щурів є більшою, ніж у старих щурів, при цьому як в одних так і в інших щурів кількість цієї речовини не залежить від часу доби. Власне, ця тенденція (менша кількість речовини тигроїдної субстанції нейронів БПЯ гіпоталамуса та відсутність значимої реакції на період доби) спостерігалася і за умов світлової депривації, світлової стимуляції та при уведенні мелатоніну (таблиці 3.6-3.7). Це добре видно на рисунках 3.7-3.8.

Однак, слід відмітити, що різні умови експерименту суттєво вплинули на кількість речовини тигроїдної субстанції нейронів БПЯ гіпоталамуса у старих щурів (рис. 3.9-3.10), тоді, коли цього не спостерігалася у зрілих щурів.

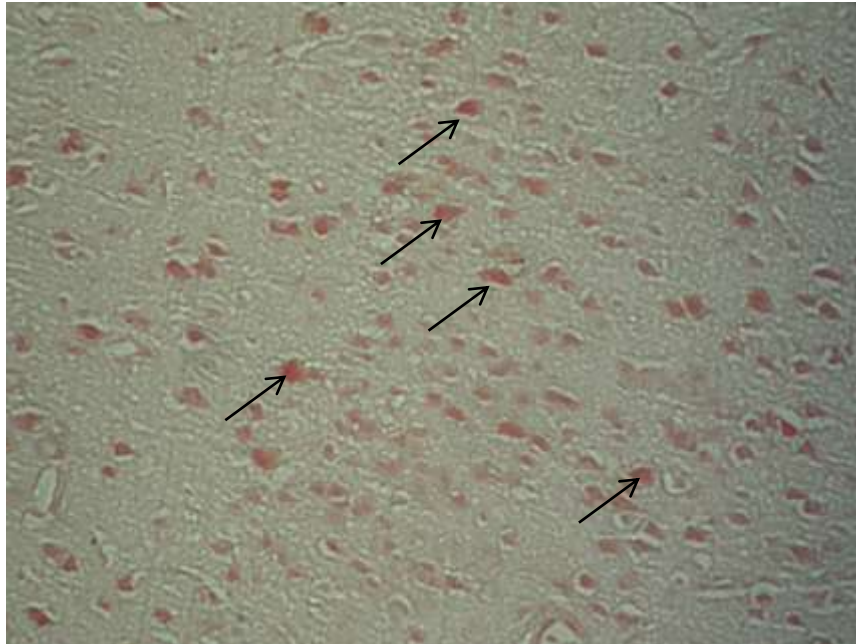


Рис. 3.8. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура о 02.00 год. при застосуванні гістохімічної методики на тигроїдну субстанцію за Ніслем з використанням барвника нейтрального червоного. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

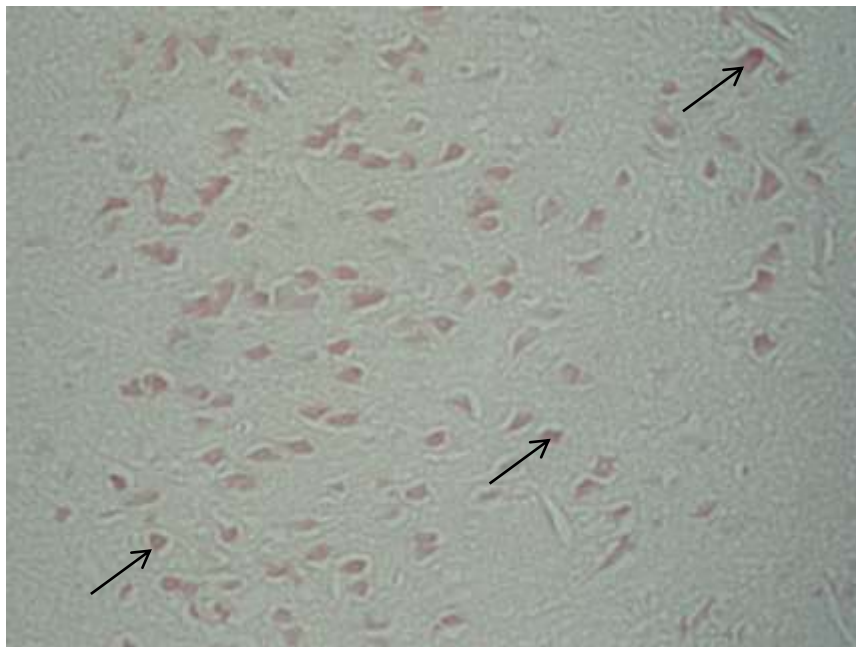


Рис. 3.9. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура о 14.00 год. при застосуванні гістохімічної методики на тигроїдну субстанцію за Ніслем з використанням барвника нейтрального червоного. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

За умов світлової депривації (табл. 3.6) оптична густина специфічного гістохімічного забарвлення на тигроїдну субстанцію у нейронах БПЯ гіпоталамуса суттєво зросла, а за умов світлової стимуляції (табл. 3.7) навпаки суттєво знизилася.

Таблиця 3.6 – Оптична густина специфічного забарвлення на тигроїдну субстанцію у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової депривації

Години доби	Оптична густина гістохімічного забарвлення на тигроїдну субстанцію (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,257±0,0022	0,234±0,0021 p ₂ <0,001
02.00	0,264±0,0021 p ₁ <0,05	0,253±0,0024 p ₁ <0,001, p ₂ <0,001

Примітки: p₁ – вірогідність різниці порівняно з попереднім часовим інтервалом у межах однієї серії; p₂ – вірогідність різниці порівняно з старими щурами.

При цьому на великому збільшенні (об'єktiv x100, масляна імерсія) було видно, що за умов світлової стимуляції гранули тигроїдної субстанції ставали дрібнішими, тоді, коли за умов світлової депривації розміри їх помітно не змінювалися.

Введення екзогенного мелатоніну щурам, які знаходилися за умов світлової стимуляції помітно покращили стан тигроїдної субстанції нейронів БПЯ гіпоталамуса (табл. 3.8), зокрема відмічали суттєве зростання оптичної густини гістохімічного забарвлення на тигроїдну субстанцію у нейронах БПЯ у середньому майже до рівня, який відмічався у щурів, яких утримували за звичайних умов освітлення.

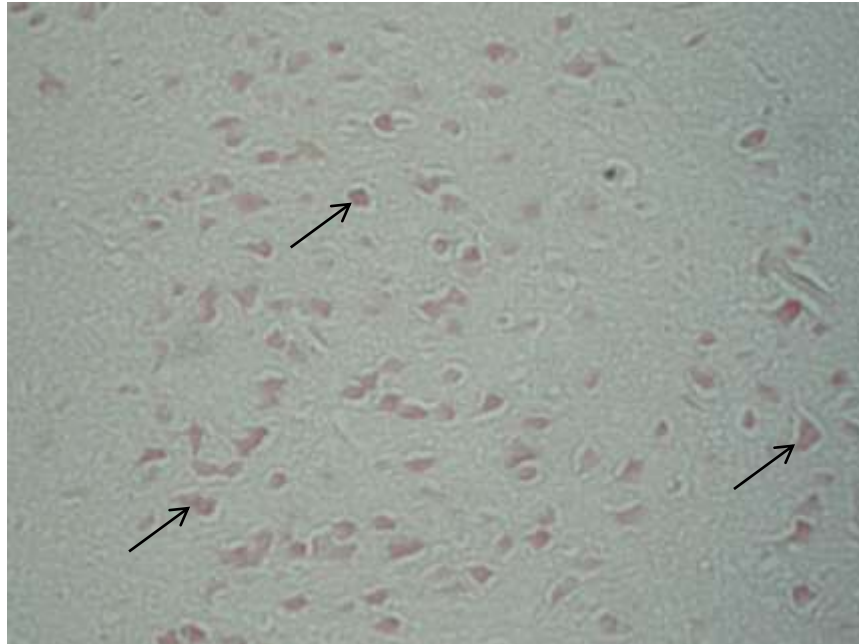


Рис. 3.10. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура о 02.00 год. при застосуванні гістохімічної методики на тигроїдну субстанцію за Ніслем з використанням барвника нейтрального червоного. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Таблиця 3.7 – Оптична густина гістохімічного забарвлення на тигроїдну субстанцію у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції

Години доби	Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на тигроїдну субстанцію (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,252±0,0020	0,183±0,0018 $p_2 < 0,001$
02.00	0,259±0,0023 $p_1 < 0,05$	0,192±0,0019 $p_1 < 0,05, p_2 < 0,001$

Примітки: p_1 – вірогідність різниці порівняно з попереднім часовим інтервалом у межах однієї серії; p_2 – вірогідність різниці порівняно з старими щурами.

Таблиця 3.8 – Оптична густина гістохімічного забарвлення на тигроїдну субстанцію у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну

Години доби	Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на тигроїдну субстанцію (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,259±0,0023	0,209±0,0019 p<0,001
02.00	0,262±0,0019	0,211±0,0022 p<0,001

Примітка: p – вірогідність різниці між групами зрілих та старих щурів.

При цьому на великому збільшенні мікроскопа було видно, що при введенні мелатоніну гранули тигроїдної субстанції були таких же розмірів, як і гранули у щурів, яких утримували за звичайних умов освітлення. Щільність їх розташування у цитоплазми і локалізація в різних ділянках цитоплазми була також дуже подібна до щурів, яких утримували за звичайних умов освітлення. Так само було видно, що різні нейрони забарвлюються то менш, то більш інтенсивно.

Отже, кількість тигроїдної субстанції у зрілих щурів у середньому є вищою, ніж у старих щурів. Водночас, у зрілих щурів вона не реагує на зміни режиму освітлення, однак, у старих щурів вона характерно змінюється, що додатково проілюстровано на рис. 3.11.

Зокрема, згідно даних до оптичної густини забарвлення при виконанні методики за Ніслем за умов світлової депривації вона зростає, а при світовій стимуляції – знижується.

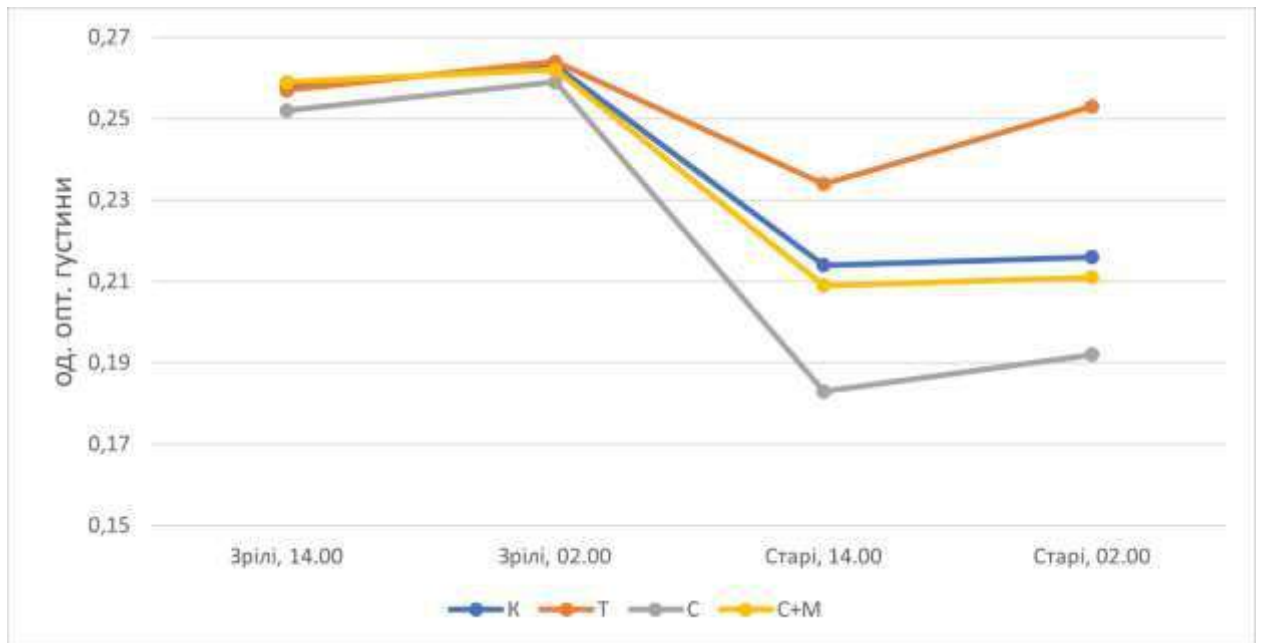


Рис. 3.11. Оптична густина специфічного забарвлення на тигроїдну субстанцію у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів за стандартного та зміненого світлового режиму і корекції мелатоніном.

Важливим є те, що мелатонін здатний підвищувати кількість тигроїдної субстанції у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів, яких утримували за умов світлової стимуляції майже до рівня, який властивий щурфм, які перебували за стандартних умов освітлення.

Результати досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Морфометрична характеристика вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса зрілих щурів за модифікації фотоперіоду. Буковинський медичний вісник. 2020;24(2):9-14. doi: [10.24061/2413-0737.XXIV.2.94.2020.36](https://doi.org/10.24061/2413-0737.XXIV.2.94.2020.36)

2. Булик РЄ, Йосипенко ВР, Власова КВ. Вікові особливості морфометричного стану бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів на тлі різної тривалості фотоперіоду. Вісник проблем біології і медицини. 2021;2:197-200. doi: [10.29254/2077-4214-2021-2-160-197-200](https://doi.org/10.29254/2077-4214-2021-2-160-197-200)

3. Bulyk RYe, Yosypenko VR, Kryvchanska MI, Vlasova KV, Lukan YR. Age changes in the tigroid substance of neurons of the lateral preoptic nucleus of hypothalamus under different light modes. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021;11(10): 269-74. doi: [10.12775/JEHS.2021.11.10.025](https://doi.org/10.12775/JEHS.2021.11.10.025)

4. Bulyk RYe, Yosypenko VR. Age characteristics of morphometric changes of the anterior-lateral preoptic nucleus of the hypothalamus of rats. In: *Natural Science Readings*; 2020 May 28-30; Bratislava. Bratislava; 2020, p. 35-3.

5. Bulyk RYe, Yosypenko VR. Influence of light stimulation on age features of the anterior-lateral preoptic nucleus of the hypothalamus. In: *Proceedings of the 1st International scientific and practical conference Actual trends of modern scientific research*; 2020 Jul 19-21; Munich, Germany. Munich: MDPC Publishing; 2020, p. 46-8.

6. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Вікові морфометричні зміни нейронів передньо-бічного передзорового ядра гіпоталамуса за умов світлової депривації. В: *Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. Вітчизняна та світова медицина: вимоги сьогодення*; 2020 Жов 9-10; Дніпро. Дніпро: Організація наукових медичних досліджень «Salutem»; 2020, с. 5-8.

7. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Гістохімічні особливості тигроїдної субстанції нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса зрілих і старих щурів за умови світлової стимуляції. В: *Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. Нові досягнення у галузі медичних та фармацевтичних наук*; 2020 Лис 20-21; Одеса. Одеса: Південна фундація медицини; 2020, с. 80-3.

8. Йосипенко ВР. Вплив мелатоніну на щільність тигроїдної субстанції бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів. *VIMCO Journal*. 2021;2021:117.

РОЗДІЛ 4

ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ БІЧНОГО ПЕРЕДЗОРОВОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ЗА РІЗНИХ УМОВ СВІТЛОВОГО РЕЖИМУ ТА КОРЕКЦІЇ МЕЛАТОНІНОМ

У цьому розділі послідовно викладені детальні результати імуногістохімічних досліджень на мелатонінові рецептори (MP) типу 1A та 1B в нейронах БПЯ гіпоталамуса. Спочатку систематично наводяться описові дані та результати кількісних показників із статистичною обробкою щодо MP типу 1A в нейронах БПЯ гіпоталамуса, а потім – MP типу 1B в цих же клітинах.

Систематичність подання матеріалу передбачала наступний порядок наведення результатів:

1. Спочатку наведені результати щодо експериментальних тварин, яких утримували за звичайних умов освітлення (контроль – К).
2. Потім надані дані про експериментальних тварин, які перебували в умовах світлової депривації (цілодобова темрява – Т).
3. Далі викладені результати щодо експериментальних тварин, яких утримували за умов світлової симуляції (цілодобове освітлення – С).
4. І зрештою подані дані експерименту, де за допомогою введення екзогенного мелатоніну (Sigma, USA) намагалися корегувати стан тварин, які перебували в умовах світлової стимуляції (цілодобове освітлення + мелатонін – С + М).

Відповідно до вищенаведеної схеми подання результатів, констатовано, що імуногістохімічні дослідження нейронів БПЯ гіпоталамуса виявили низку відмінностей у реакціях цих клітин на різні умови експерименту. Кількісні відмінності виявляли відповідно до інтенсивності специфічного (імуногістохімічного) забарвлення, яке визначали методом комп'ютерної мікроденситометрії у відносних одиницях оптичної густини в діапазоні від «0» (абсолютна прозорість) до «1» (абсолютна непрозорість).

Середні показники оптичної густини забарвлення на МР типу 1А в нейронах БПЯ гіпоталамуса о 14.00 та 02.00 год. вказані у таблиці 4.1.

Таблиця 4.1 – Оптична густина специфічного забарвлення на МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за стандартного світлового режиму

Години доби	Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на рецептори до мелатоніну типу 1А (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,248±0,0018	0,211±0,0014 ($p_2 < 0,001$)
02.00	0,264±0,0016 ($p_1 < 0,001$)	0,216±0,0013 ($p_1 < 0,05$) ($p_2 < 0,001$)

Примітки: p_1 – вірогідність різниці порівняно з попереднім часовим інтервалом у межах однієї серії; p_2 – вірогідність різниці порівняно з старими щурами.

Специфічне імуногістохімічне забарвлення на МР типу 1А можна було спостерігати у всіх нейронах БПЯ гіпоталамуса незалежно від їхньої локалізації по ядру. Забарвлення носило переважно дрібногранулярний або майже дифузний характер і охоплювало оболонку нейронів та їхню цитоплазму.

Зображення нейронів БПЯ гіпоталамуса при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А надано на рис. 4.1-4.4.



Рис. 4.1. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Спостерігаючи інтенсивність імуногістохімічного забарвлення від одного нейрона до іншого, можна констатувати, що вона мала різну силу як щодо оболонки, так і щодо цитоплазми. Були нейрони як і з сильним забарвленням, так і з помірним або навіть слабким. Іноді складалося враження, що позитивне забарвлення мало місце і в ядрах нейронів, але така ситуація була нерегулярною, тому всі вимірювання оптичної густини специфічного забарвлення на МР типу 1А в нейронах БПЯ гіпоталамуса виконували на цитоплазмі цих клітин, де забарвлення носило стабільний характер.

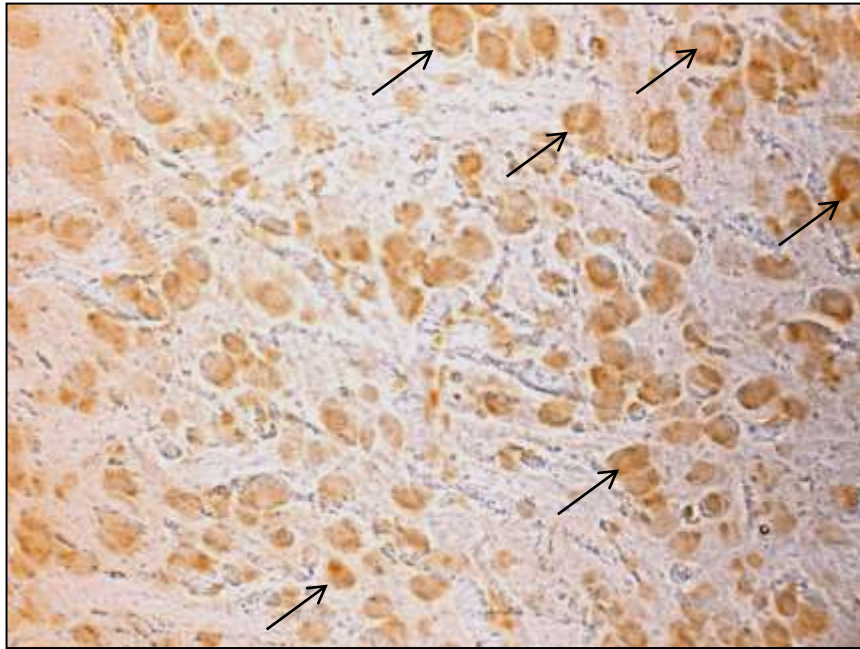


Рис. 4.2. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

З даних таблиці 4.1 видно, що оптична густина забарвлення на МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів завжди більша (рис. 4.1-4.2), ніж у старих щурів (рис. 4.3-4.4). При цьому в зрілих щурів оптична густина забарвлення на МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса о 02.00 год. у середньому є вищою, ніж на 14.00 год., тоді коли у старих щурів така закономірність не відмічена. Однак, у старих щурів, незважаючи на нижчі середні показники оптичної густини специфічного забарвлення на МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса, все ж в окремих нейронах можна було помітити достатньо інтенсивне забарвлення (рис. 4.3-4.4).

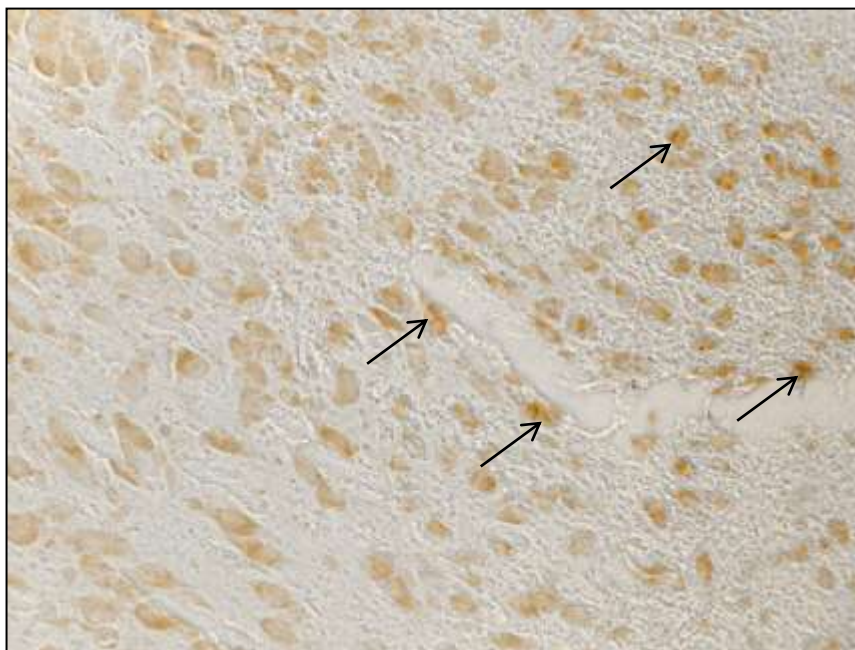


Рис. 4.3. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

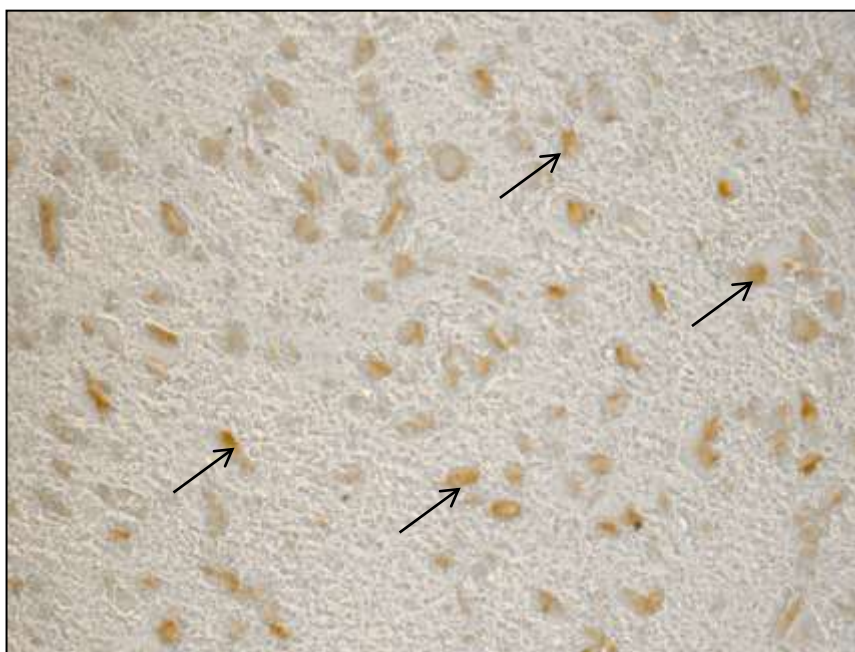


Рис. 4.4. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

За умов світлової депривації виявлено найбільш високі середні цифри оптичної густини специфічного забарвлення на МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса, особливо це було помітно у зрілих щурів (табл. 4.2). Максимальні цифри оптичної густини забарвлення виявлено о 02.00 год. експерименту.

Таблиця 4.2 – Оптична густина специфічного забарвлення на МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової депривації

Години доби	Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на рецептори до мелатоніну 1А (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,280±0,0019	0,234±0,0010 ($p_2 < 0,001$)
02.00	0,298±0,0017 ($p_1 < 0,001$)	0,267±0,0016 ($p_1 < 0,001$) ($p_2 < 0,001$)

Примітки: p_1 – вірогідність різниці порівняно з попереднім часовим інтервалом у межах однієї серії; p_2 – вірогідність різниці порівняно з старими щурами.

При цьому у зрілих щурів серед клітин БПЯ гіпоталамуса іноді траплялися нейрони з особливо інтенсивним забарвленням, у таких випадках воно було нерівномірним, а носило характерний асиметричний характер – найбільша інтенсивність забарвлення відмічалася в одному з полюсів клітини (рис. 4.5-4.6).

У старих щурів за умов світлової депривації встановлено підвищення інтенсивності оптичної густини специфічного забарвлення на МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса порівнюючи зі щурами, яких утримували за звичайного світлового режиму. При цьому оптична густина специфічного забарвлення на МР типу 1А була вищою о 02.00 год. ніж, о 14.00 год. (табл. 4.2, рис. 4.7-4.8).

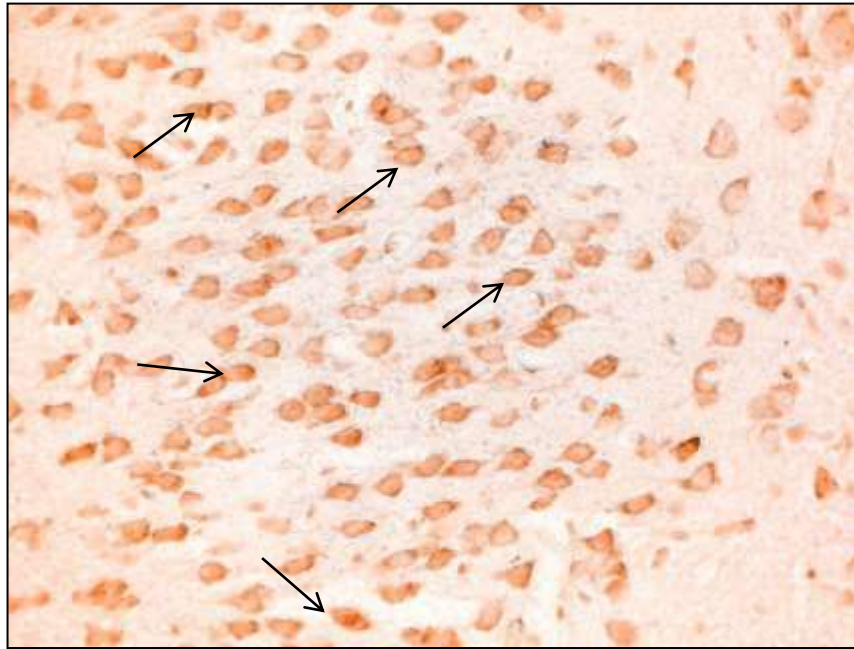


Рис. 4.5. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової депривації о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

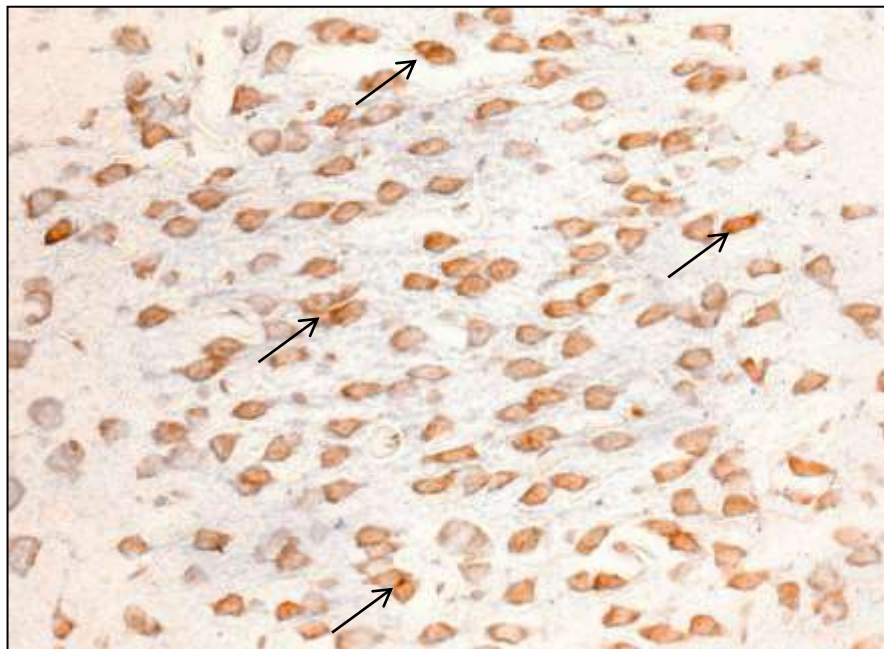


Рис. 4.6. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової депривації о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

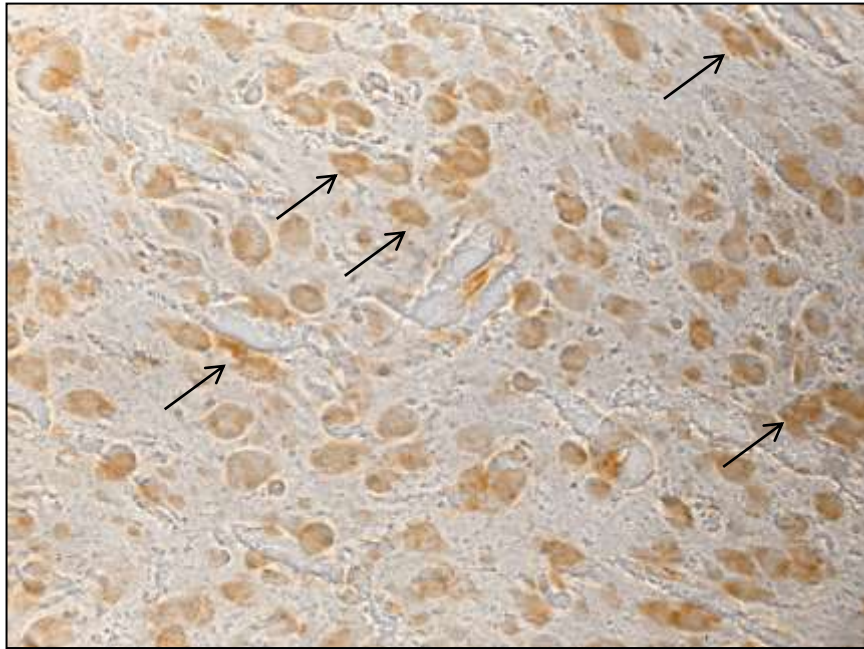


Рис. 4.7. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової депривації о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

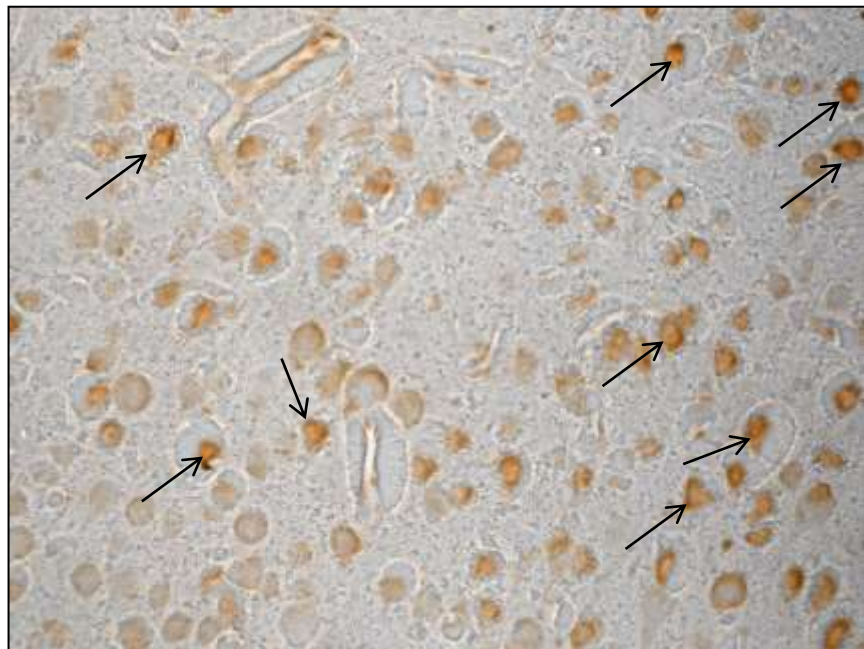


Рис. 4.8. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової депривації о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Варто відмітити, що о 02.00 год. у старих щурів оптична густина специфічного забарвлення на МР типу 1А в нейронах БПЯ гіпоталамуса досягла середніх цифр, що були характерні для зрілих щурів о 02.00 год., яких утримували за звичайного режиму освітлення (табл. 4.1). У старих щурів о 02.00 год. в окремих нейронах БПЯ гіпоталамуса інтенсивність специфічного забарвлення особливо виражена, хоча були і слабкозабарвлені нейрони (рис. 4.8).

За умов світлової стимуляції інтенсивність оптичної густини специфічного забарвлення на МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса різко знижувалася, що було видно по оптичній густині забарвлення (табл. 4.3).

Таблиця 4.3 – Оптична густина специфічного забарвлення на МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції

Години доби	Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на рецептори до мелатоніну 1А (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,180±0,0018	0,148±0,0013 ($p_2 < 0,001$)
02.00	0,182±0,0017	0,132±0,0012 ($p_1 < 0,001$) ($p_2 < 0,001$)

Примітки: p_1 – вірогідність різниці порівняно з попереднім часовим інтервалом у межах однієї серії; p_2 – вірогідність різниці порівняно з старими щурами.

Зниження оптичної густини специфічного забарвлення на МР 1А у нейронах БПЯ відбувалося як у зрілих так, і у старих щурів, в останніх зниження було особливо значущим. Варто зазначити, що у зрілих щурів не зареєстровано відмінності у середніх тенденціях між оптичною густиною специфічного забарвлення в нейронах БПЯ гіпоталамуса між періодами

дослідження о 02.00 та о 14.00 год., тоді, коли в старих щурів, інтенсивність о 02.00 год. є парадоксально меншою, ніж о 14.00 год.

Вказані особливості специфічного забарвлення на МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса за умов світлової стимуляції проілюстровані рис. 4.9-4.12.

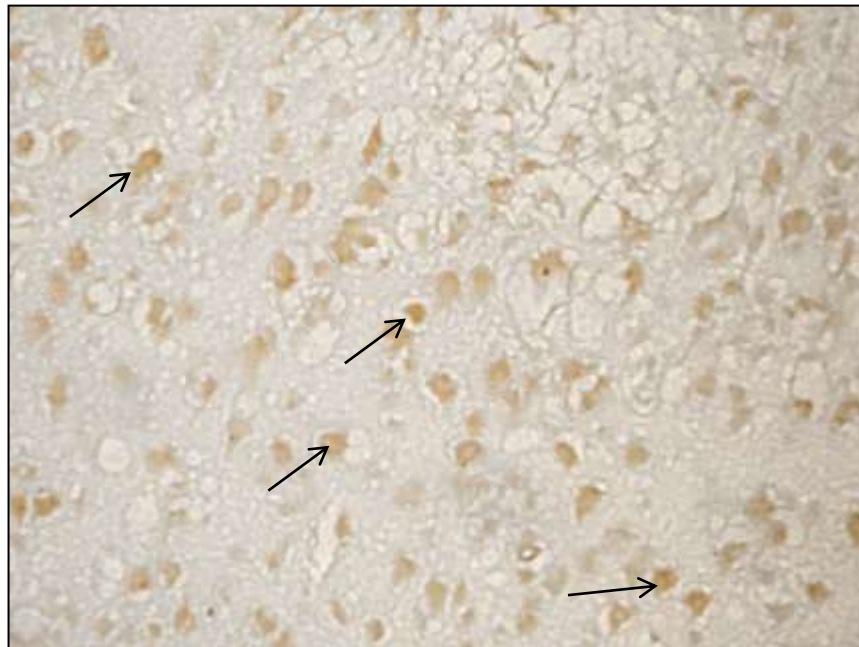


Рис. 4.9. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової стимуляції о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Уведення екзогенного мелатоніну (Sigma, USA) в дозі 0,5 мг/кг маси тіла щурам, яких утримували за умов світлової стимуляції призвело до підвищення середніх величин оптичної густини специфічного забарвлення на МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса о 02.00 год. та 14.00 год. як у зрілих, так і у старих щурів (табл. 4.4).

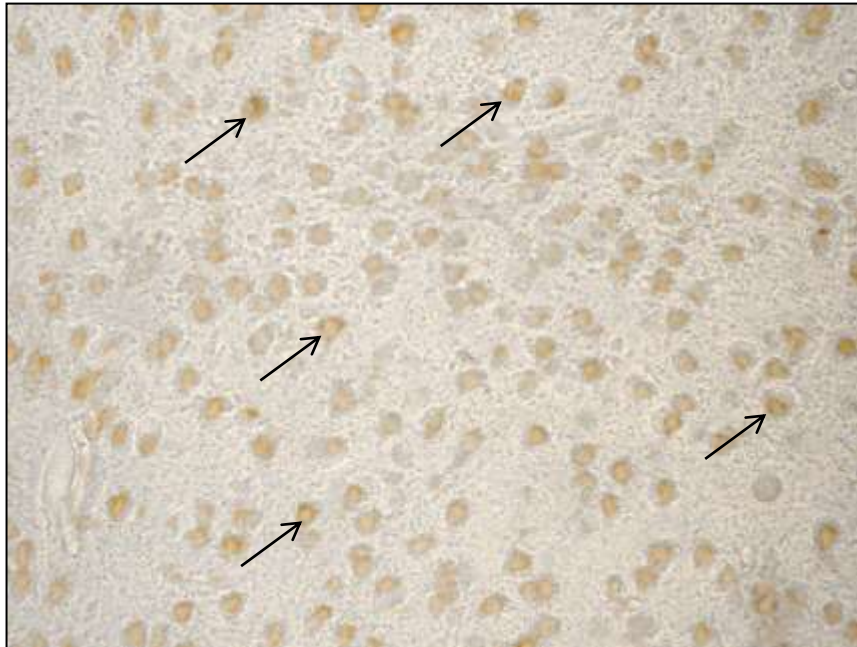


Рис. 4.10. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової стимуляції о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

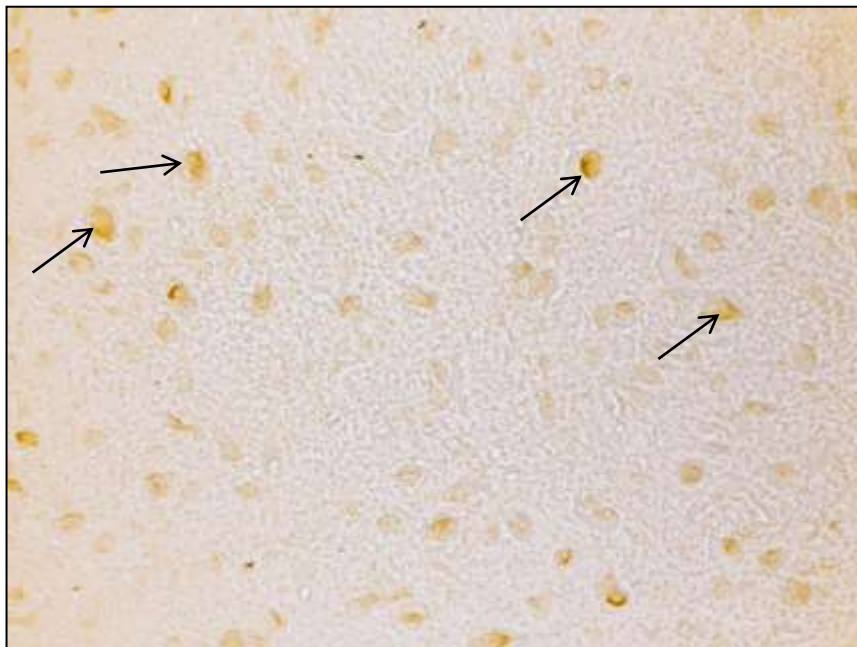


Рис. 4.11. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової стимуляції о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).



Рис. 4.12 Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової стимуляції о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

Таблиця 4.4 – Оптична густина специфічного забарвлення на МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну

Години доби	Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на рецептори до мелатоніну 1А (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,249±0,0017	0,198±0,0013 ($p_2 < 0,001$)
02.00	0,275±0,0015 ($p_1 < 0,001$)	0,141±0,0010 ($p_1 < 0,001$), ($p_2 < 0,001$)

Примітки: p_1 – вірогідність різниці порівняно з попереднім часовим інтервалом у межах однієї серії; p_2 – вірогідність різниці порівняно з старими щурами.

Більш суттєво оптична густина зросла в зрілих щурів, зокрема, о 14.00 год. (рис. 4.13) – до рівня щурів, яких утримували за стандартного світлового режиму, а о 02.00 год. (рис.4.14) – навіть вище показників щурів, яких утримували за стандартного світлового режиму.

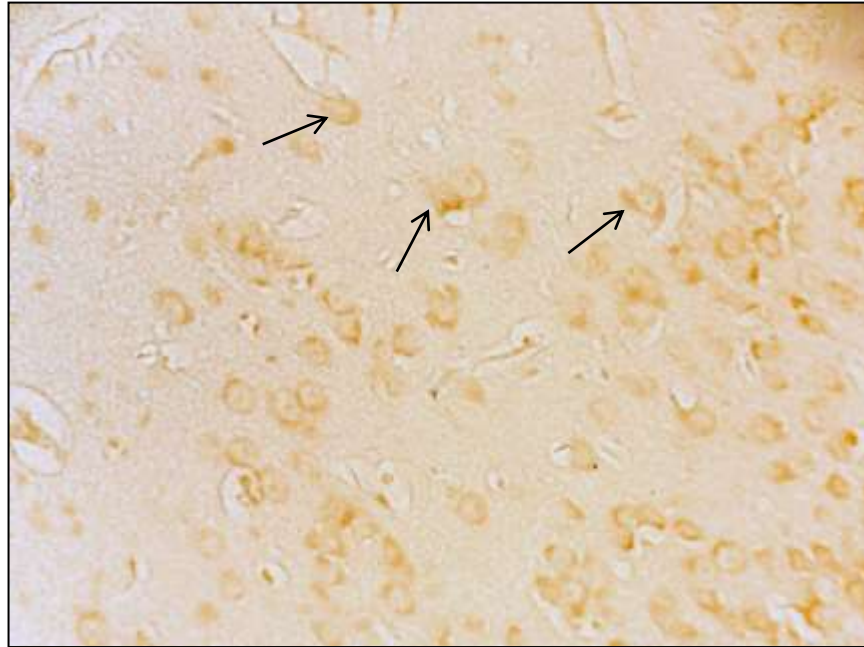


Рис. 4.13. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

У старих щурів зростання середньої величини оптичної густини специфічного забарвлення на мелатонінові рецептори типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса було вірогідним ($p < 0,001$), але середнього рівня щурів, яких утримували за стандартного світлового режиму не вдалося досягти ні о 14.00 год. (рис. 4.15), ні о 02.00 год. (рис. 4.16).

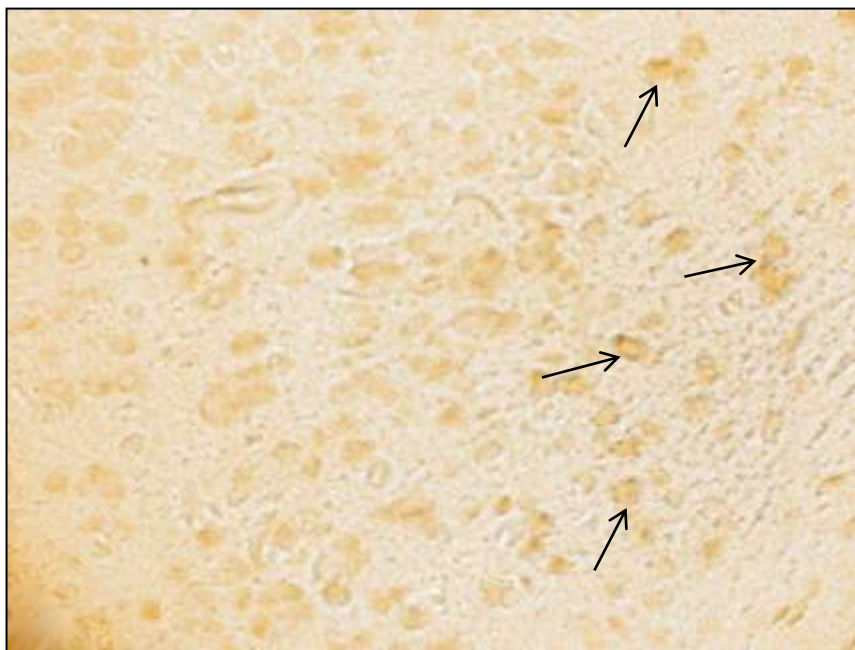


Рис. 4.14. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

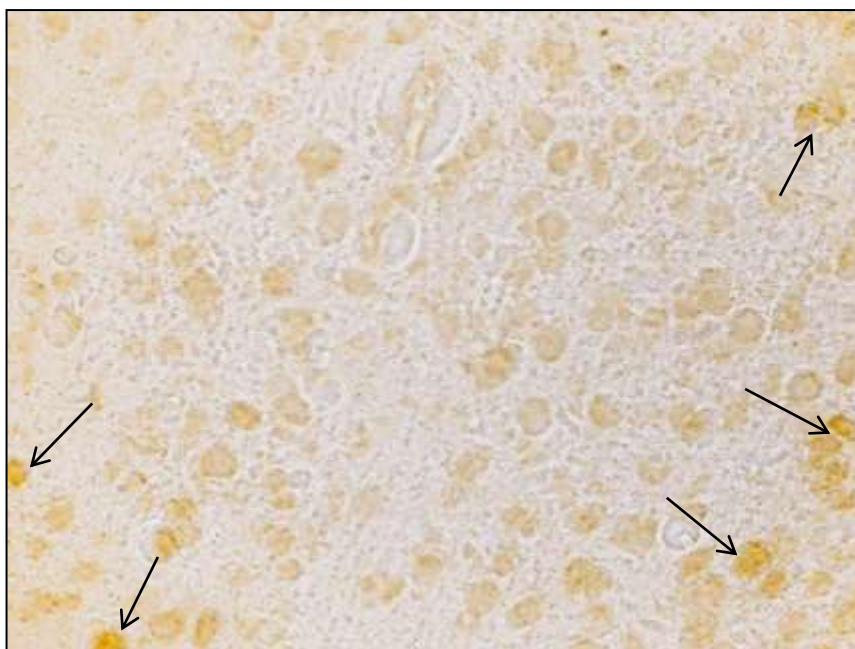


Рис. 4.15. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

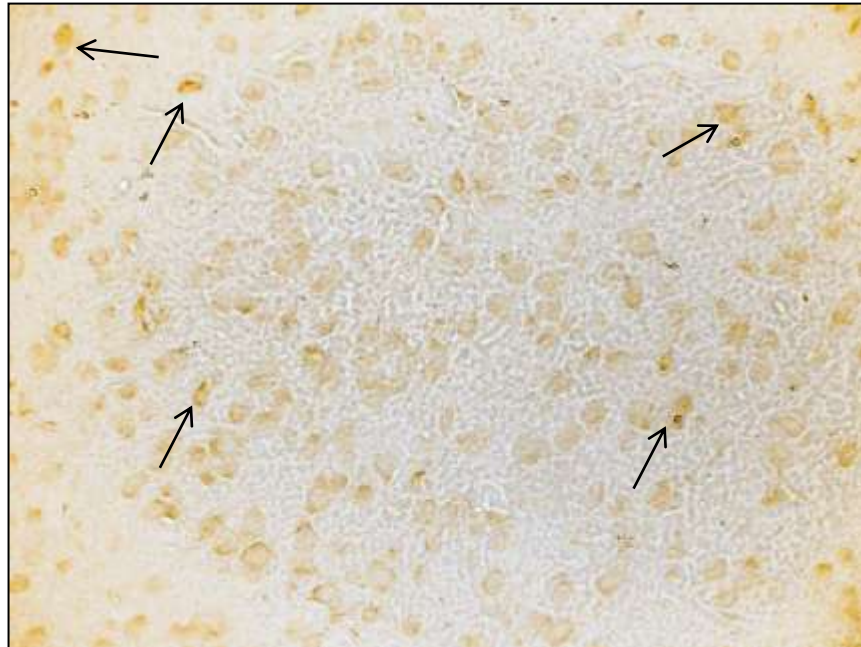


Рис. 4.16. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1А. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Таким чином, добові коливання оптичної густини (щільності) МР типу 1А в нейронах БПЯ гіпоталамуса характеризуються чітким циркадіанним ритмом, з найвищими показниками о 02.00 год., тоді як о 14.00 год. вона знижується. У старих щурів щільність МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса є нижчою, ніж у зрілих тварин.

Різні режими освітлення істотно впливають на показники оптичної густини МР типу 1А в нейронах БПЯ гіпоталамуса, що схематично зображено на рис. 4.17.

Зокрема, світлова депривація веде до зростання середнього рівня величин досліджуваних структур, як у зрілих, так і у старих щурів. Водночас, світлова стимуляція призводить до зниження щільності МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих та старих щурів. Однак, якщо циркадіанний ритм досліджуваних структур за умов світлової стимуляції

зберігається у зрілих щурів, то інтенсивність щільності МР типу 1А в старих щурів о 02.00 год. є парадоксально меншою, ніж о 14.00 год.

При введенні екзогенного мелатоніну на тлі постійного освітлення спостерігали вірогідне підвищення середніх величин щільності МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса. Однак, у старих щурів досягти рівня тварин, що утримувалися за стандартного режиму освітлення не вдалося ні о 02.00 ні о 14.00 год.

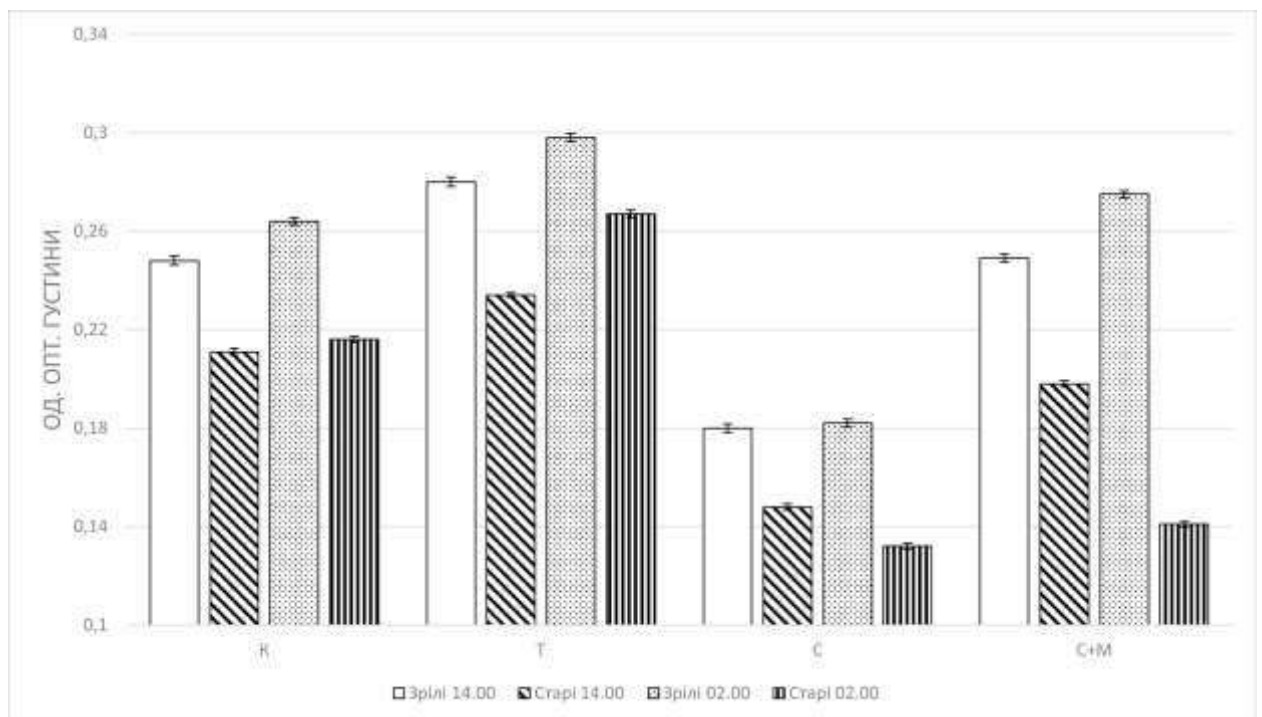


Рис. 4.17. Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів за різного режиму освітлення та уведення мелатоніну (в од.опт.густини).

При постановці імуногістохімічної методики на МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів було встановлено, що позитивне забарвлення охоплювало оболонку, цитоплазму та ядро нейронів, як за звичайних умов освітлення (рис. 4.18-4.21), так за інших умов експерименту (рис. 4.22-4.29).

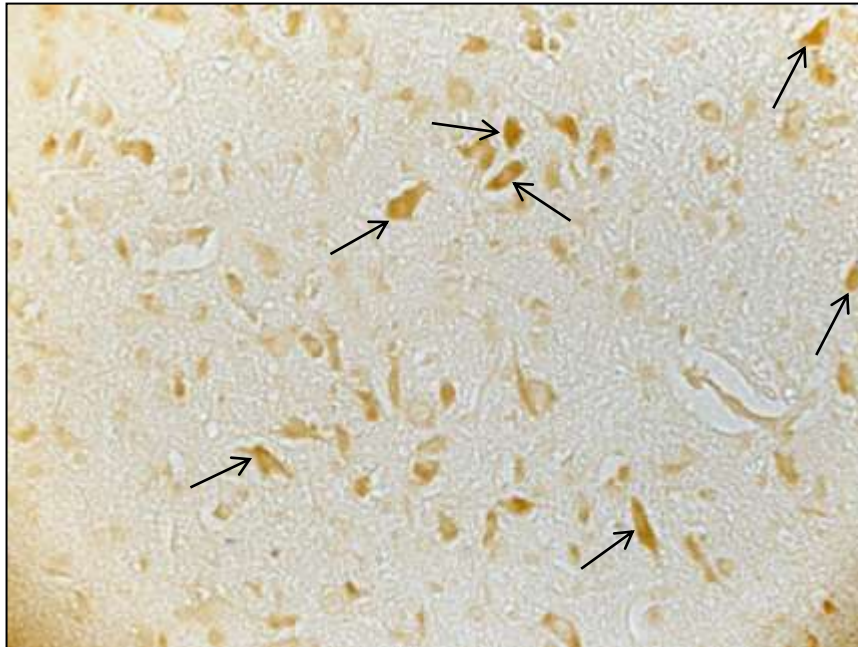


Рис. 4.18. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)



Рис. 4.19. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

Забарвлення носило дрібногранулярний характер і його особливістю у порівнянні з забарвленням на МР типу 1А було те, що воно було дуже нерівномірним від нейрона до нейрона (рис. 4.18-4.21).

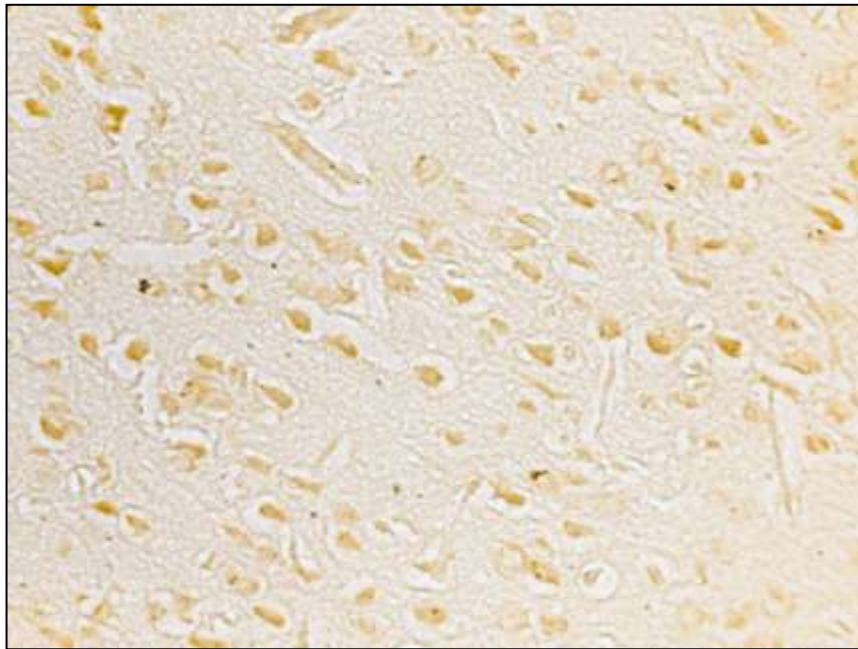


Рис. 4.20. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

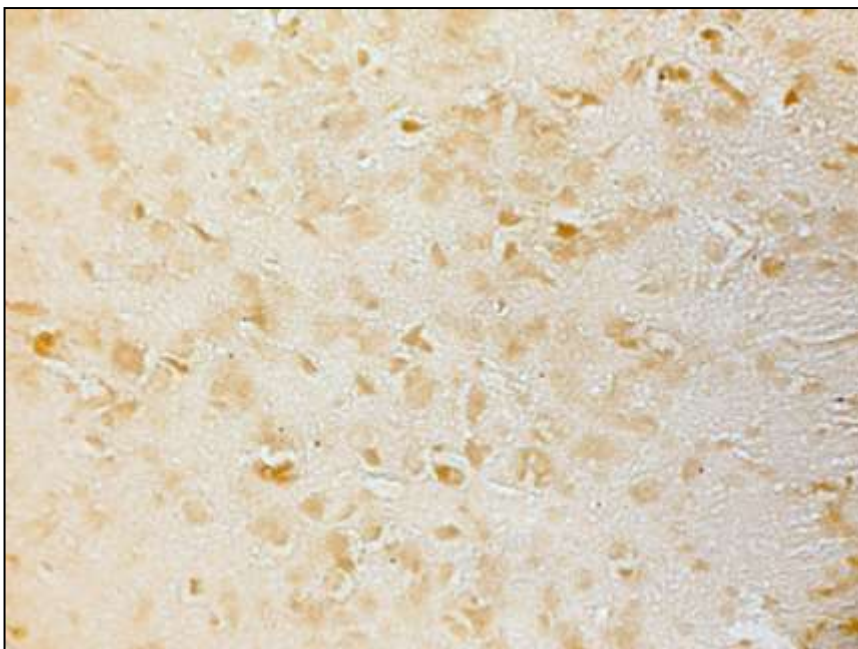


Рис. 4.21. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура о 02.00 при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Мікроденситометричні вимірювання проводили стандартно в цитоплазмі нейронів БПЯ гіпоталамуса. Середні величини вимірених величин представлені у табл. 4.5.

Таблиця 4.5 – Оптична густина специфічного забарвлення на МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за стандартного світлового режиму

Години доби	Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на рецептори до мелатоніну типу 1В (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,246±0,0017	0,202±0,0010 ($p_2 < 0,001$)
02.00	0,263±0,0016 ($p_1 < 0,001$)	0,218±0,0015 ($p_1 < 0,001$) ($p_2 < 0,001$)

Примітка: p_1 - вірогідність різниці порівняно з попереднім часовим інтервалом у межах однієї серії; p_2 - вірогідність різниці порівняно з старими щурами.

З наведених у таблиці даних видно, що як у зрілих так і в старих щурів за умов стандартного світлового режиму оптична густина специфічного забарвлення на МР типу 1В є вищою на 02.00 год. у порівнянні з 14.00 год. При цьому, середні показники у зрілих щурів є вищими, ніж у старих щурів.

За умов світлової депривації (рис. 4.22-4.25) оптична густина специфічного забарвлення на МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса у щурів помітно зростала (табл. 4.6) в порівнянні зі щурами, яких утримували за звичайних умов освітлення.



Рис. 4.22. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової депривації о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

Таблиця 4.6 – Оптична густина специфічного забарвлення на МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової депривації

Години доби	Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на рецептори до мелатоніну типу 1В (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,266±0,0017	0,212±0,0013 ($p_2 < 0,001$)
02.00	0,289±0,0018 ($p_1 < 0,001$)	0,239±0,0011 ($p_1 < 0,001$) ($p_2 < 0,001$)

Примітки: p_1 – вірогідність різниці порівняно з попереднім часовим інтервалом у межах однієї серії; p_2 – вірогідність різниці порівняно з старими щурами.

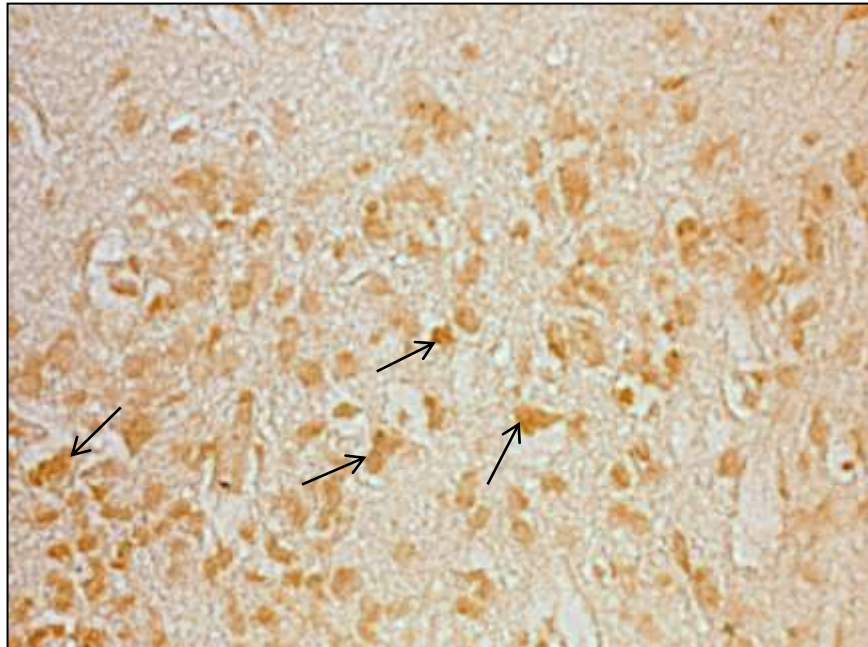


Рис. 4.23. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової депривації о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

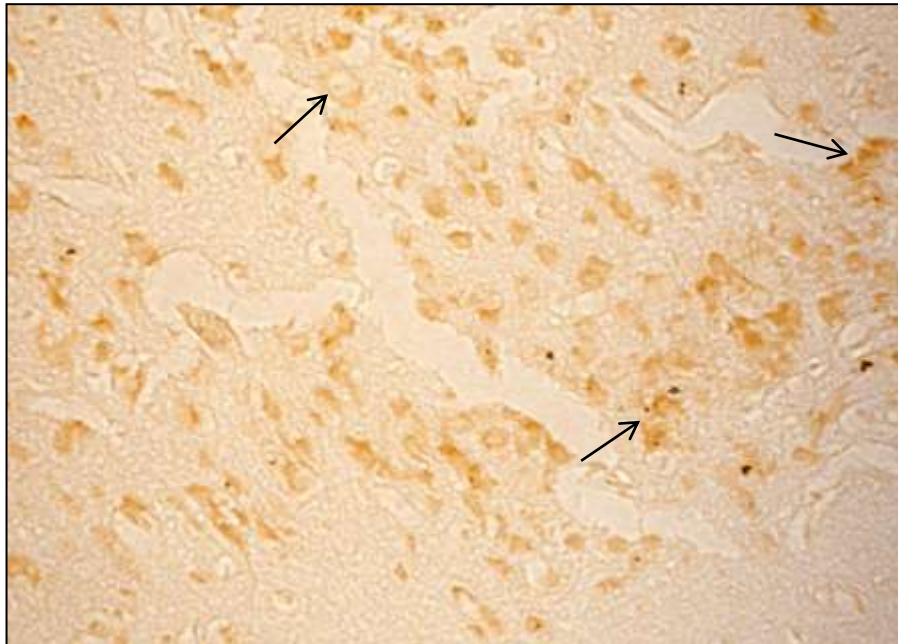


Рис. 4.24. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової депривації о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

При цьому, середні показники були вищими в зрілих щурів у порівнянні зі старими щурами, а о 02.00 год. середні величини оптичної густини забарвлення перевищували середні показники о 14.00 год. як у зрілих, так і у старих щурів. Якщо оцінювати інтенсивність специфічного забарвлення на МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової депривації від одного нейрона до іншого, то його особливістю було те, що воно було значно більш рівномірним (рис. 4.22-4.25) у порівнянні зі щурами, яких утримували за звичайних умов освітлення (рис. 4.18-4.21).

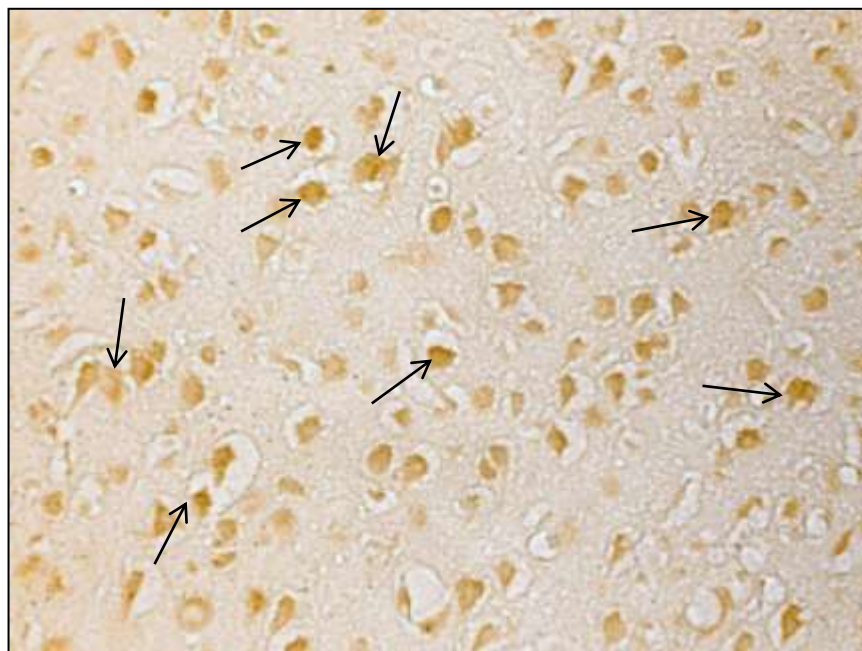


Рис. 4.25. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової депривації о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

За умов світлової стимуляції (рис. 4.26-4.29) оптична густина специфічного забарвлення на МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів була значно нижчою в порівнянні зі щурами, яких утримували за звичайного світлового режиму (табл. 4.7). У старих щурів зниження було більш помітним, ніж у зрілих щурів.

Різниця між середніми величинами в періоди дослідження о 02.00 год. та 14.00 год. була статистично невірогідною ($p > 0,05$) в старих щурів.



Рис. 4.26. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової стимуляції о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення $\times 200$)

Таблиця 4.7 – Оптична густина специфічного забарвлення на МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції

Години доби	Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на рецептори до мелатоніну типу 1В (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	$0,169 \pm 0,0017$	$0,133 \pm 0,0015$ ($p_2 < 0,001$)
02.00	$0,162 \pm 0,0019$ ($p_1 < 0,05$)	$0,134 \pm 0,0010$ ($p_2 < 0,001$)

Примітки: p_1 – вірогідність різниці порівняно з попереднім часовим інтервалом у межах однієї серії; p_2 – вірогідність різниці порівняно з старими щурами.

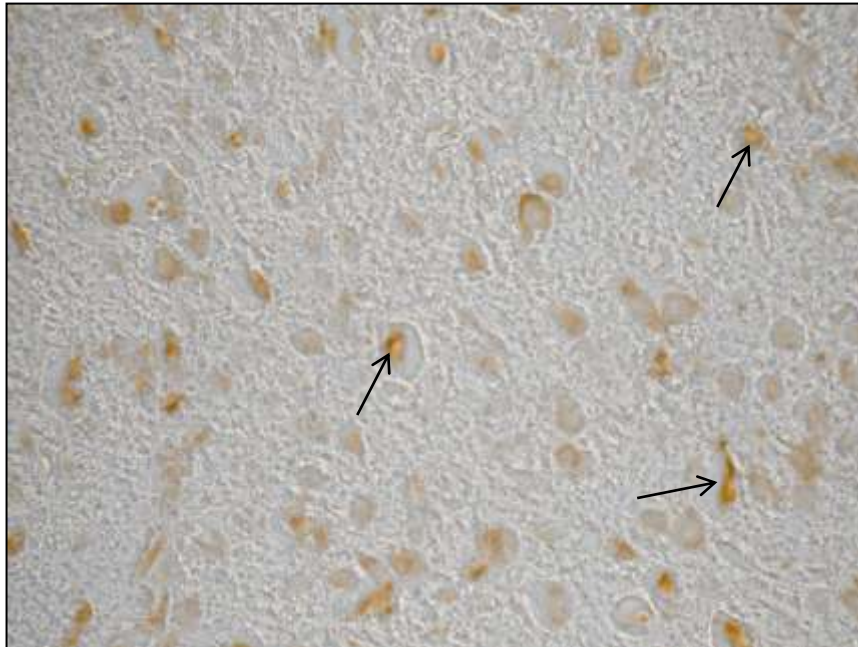


Рис. 4.27. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової стимуляції о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

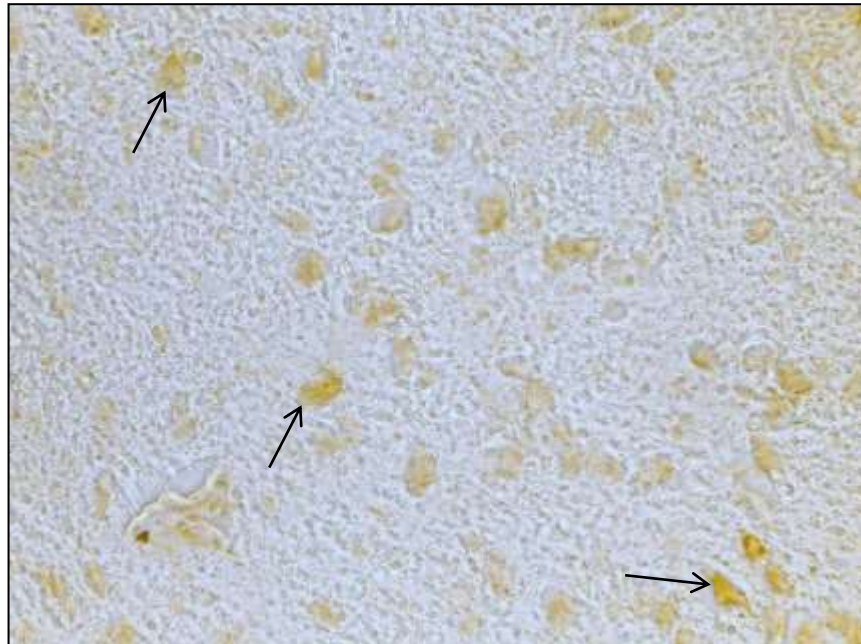


Рис. 4.28. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової стимуляції о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

Особливістю забарвлення на МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції було те, що в окремих нейронах воно настільки слабке, що воно ледве помітно, причому таке спостерігалось як у зрілих (рис. 4.26-4.27), так і старих (рис.4.28-4.29) щурів.

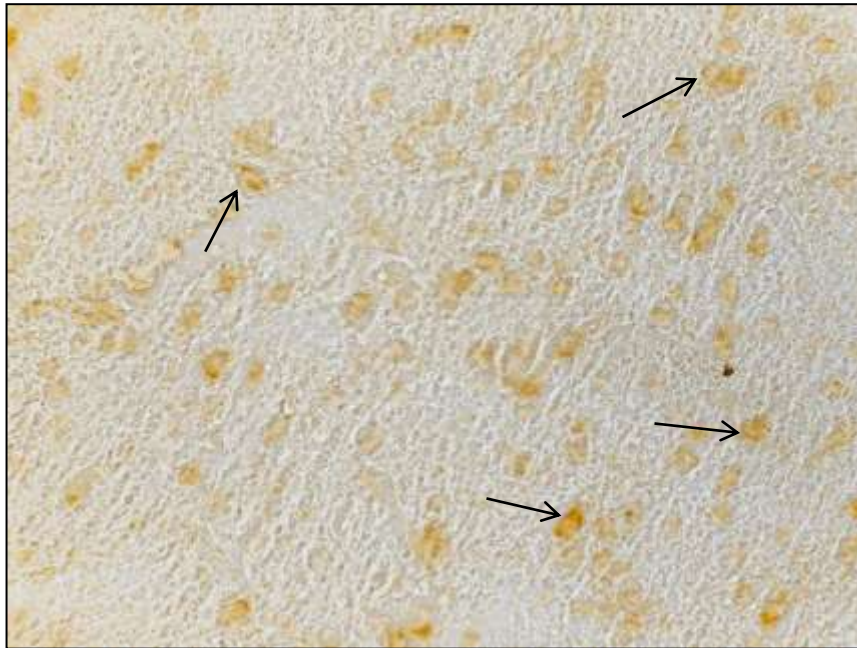


Рис. 4.29. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової стимуляції о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

За умов світлової стимуляції та введення екзогенного мелатоніну у всіх групах дослідження відмічено зростання оптичної густини МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів (табл. 4.8) у порівнянні зі щурами, яких утримували за умов світлової стимуляції без ін'єкції мелатоніном.

У зрілих щурів середня величина оптичної густини специфічного забарвлення на МР типу 1В як о 02.00 год. так і о 14.00 год. досягли середніх цифр, як у щурів, яких утримували за стандартних умов освітлення (табл. 4.5).

Водночас, у старих щурів даний показник у нейронах БПЯ гіпоталамуса не досяг того рівня, що спостерігали у старих щурів, яких утримували за умов стандартного освітлення. Вказані закономірності проілюстровані на рис. 4.30-4.33.

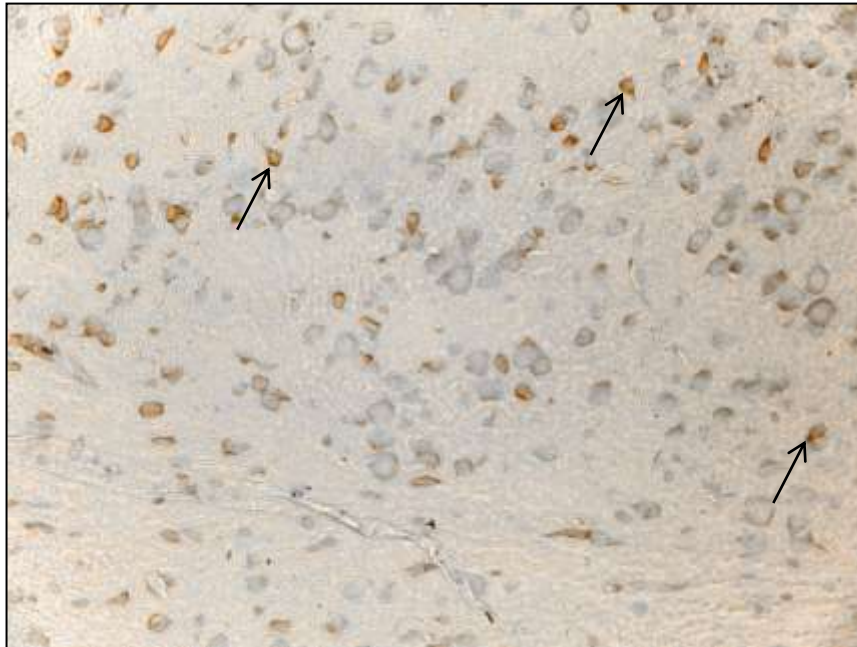


Рис. 4.30. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну о 14.00 при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

Таблиця 4.8 – Оптична густина специфічного забарвлення на МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну

Години доби	Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на рецептори до мелатоніну типу 1В (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,240±0,0016	0,145±0,0012 ($p_2 < 0,001$)
02.00	0,262±0,0014 ($p_1 < 0,001$)	0,167±0,0012 ($p_1 < 0,001$) ($p_2 < 0,001$)

Примітки: p_1 – вірогідність різниці порівняно з попереднім часовим інтервалом у межах однієї серії; p_2 – вірогідність різниці порівняно з старими щурами.

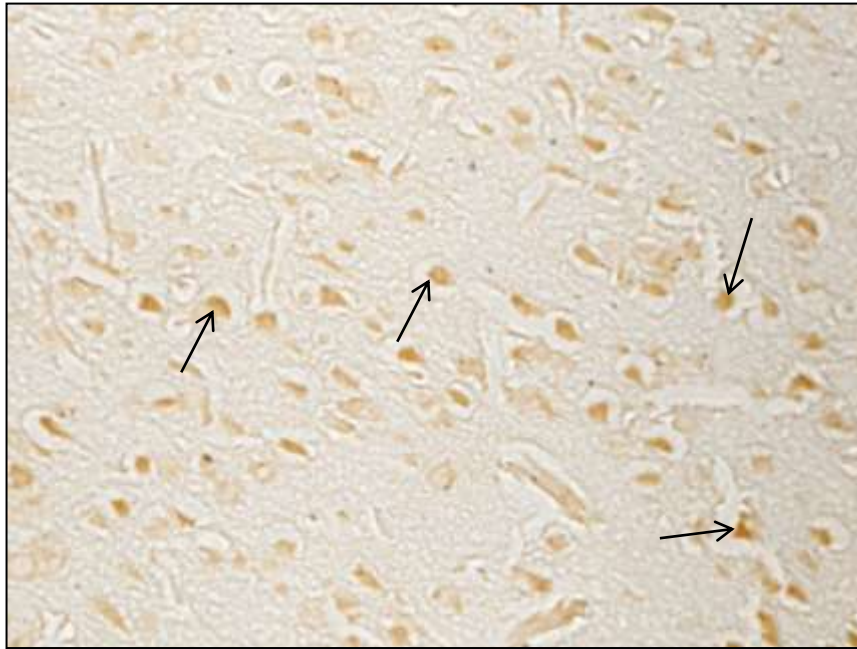


Рис. 4.31. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

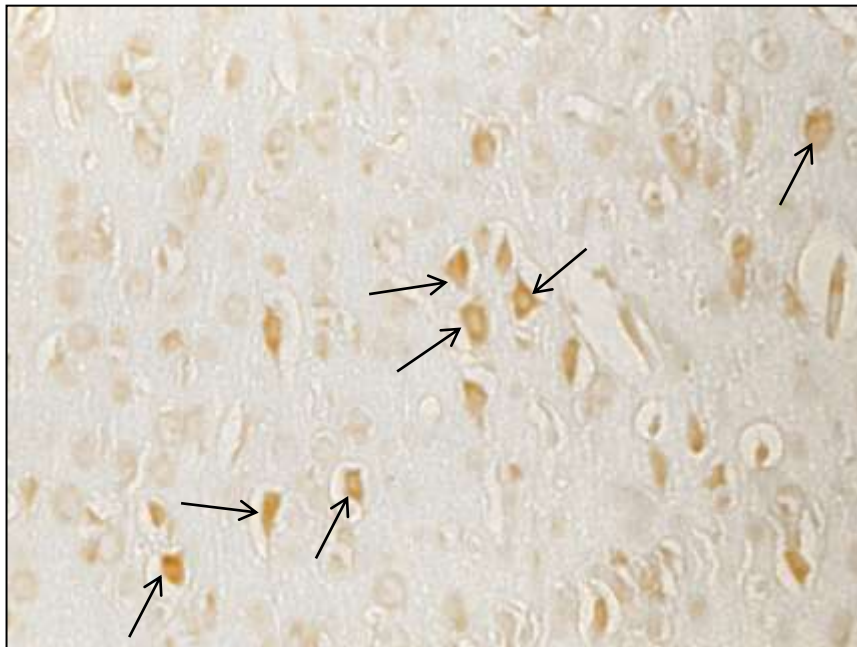


Рис. 4.32. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну о 14.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

Таким чином, добові коливання оптичної густини (щільності) МР типу 1В в нейронах БПЯ гіпоталамуса чітко підпорядковуються циркадіанним ритмам. Найвищі показники зареєстровані о 02.00 год., тоді як о 14.00 год. вони знижуються. Онтогенетичною особливістю оптичної густини специфічного забарвлення на МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса є те, що у старих щурів даний показник є нижчим, ніж у зрілих тварин.

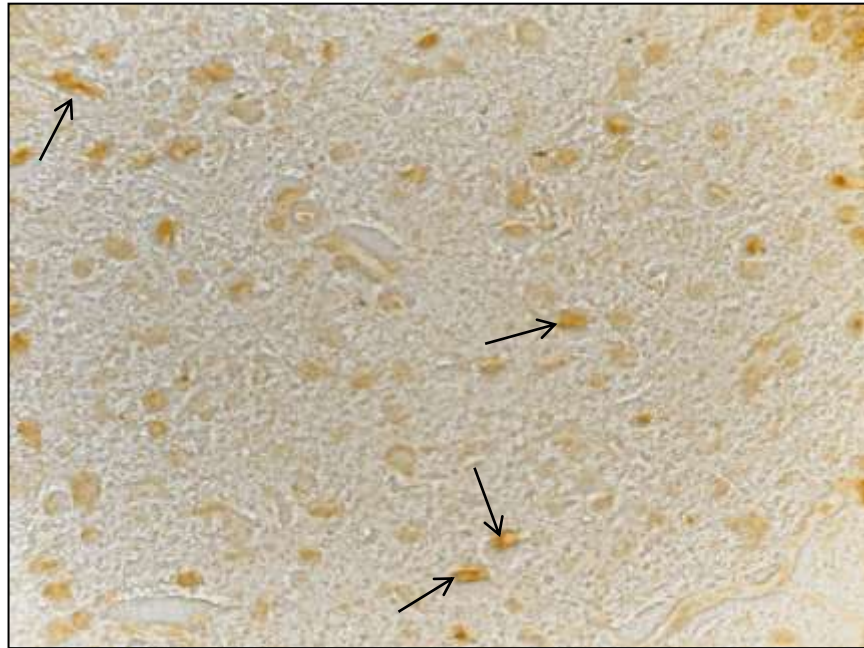


Рис. 4.33. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну о 02.00 год. при застосуванні імуногістохімічної методики на МР типу 1В. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

Зміна режиму освітлення суттєво впливає на показники оптичної густини МР типу 1В в нейронах БПЯ гіпоталамуса, що схематично зображено на рис. 4.34.

Цілодобова темрява (світлова депривація) призводить до підвищення середнього рівня оптичної густини (щільності) МР типу 1В в нейронах БПЯ як у зрілих, так і у старих щурів.

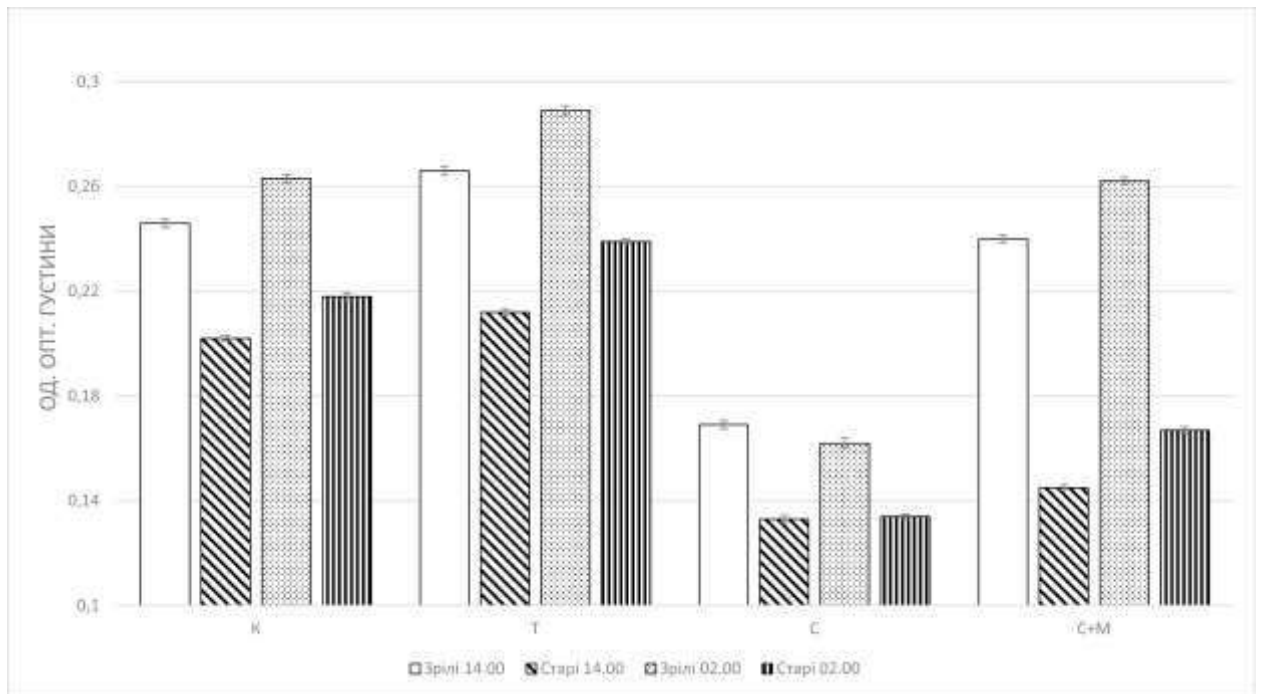


Рис. 4.34. Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на рецептори до мелатоніну типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів за різного режиму освітлення та уведення мелатоніну (в од.опт.густини).

Водночас, цілодобове освітлення (світлова стимуляція) сприяє зниженню щільності МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих та старих щурів. Цікавим є той факт, що у зрілих щурів циркадіанний ритм досліджуваних структур за умов світлової стимуляції зберігається, а вірогідної різниці в інтенсивності щільності МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса в старих щурів нами не виявлено.

Введення екзогенного мелатоніну за умови постійного освітлення веде до підвищення середніх величин щільності МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса. Однак, у старих щурів досягти рівня тварин, що утримувалися за стандартного режиму освітлення не вдалося ні о 02.00 ні о 14.00 год.

Отже, проведені імуногістохімічні дослідження, щодо густини (щільності) МР у нейронах БПЯ гіпоталамуса, дозволили дійти висновку, що МР типу 1А та 1В в нейронах БПЯ гіпоталамуса проявляють в основному подібні тенденції щодо реакції на умови освітлення. Зокрема, як у зрілих, так

і у старих щурів підвищується інтенсивність специфічного імуногістохімічного забарвлення на МР типу 1А та 1В за умов світлової депривації, але знижується за умов світової стимуляції. Оптична густина МР типу 1А та 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса підпорядковується циркадіанним ритмам, та є завжди вищою у темновий період доби (о 02.00 год.), порівняно з денним періодом (14.00 год.). У старих щурів інтенсивність імуногістохімічного забарвлення МР типу 1А та 1В в нейронах БПЯ гіпоталамуса завжди є нижчою, ніж у зрілих щурів.

Уведення екзогенного мелатоніну (0,5 мг/кг маси тіла) підвищує інтенсивність імуногістохімічного забарвлення МР типу 1А та 1В в нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих та старих щурів. Однак, у старих щурів досягти рівня показника тварин контрольної групи не вдалося ні о 02.00, ні о 14.00 год.

Результати досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Аналіз щільності мелатонінових рецепторів типу 1А у нейронах передньо-бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів за різного світлового режиму. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2020. № 3. С. 45-49. doi: [10.11603/1811-2471.2020.v.i3.11581](https://doi.org/10.11603/1811-2471.2020.v.i3.11581)

2. Bulyk RYe, Yosyenko VR, Vlasova KV. Ontogenetic aspects of melatonin receptors 1A density in the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus under various light conditions. Wiad Lek. 2021;74(9 Cz 1):2202-6. doi: [10.36740/WLek202109131](https://doi.org/10.36740/WLek202109131) (Індексується у наукометричній базі Scopus)

3. Bulyk RYe, Yosyenko VR. Effect of melatonin on daily oscillations of the density of melatonin receptors 1A in neurons of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus in rats under different light mode. Deutscher Wissenschaftsherold. German Science Herald. 2021;1:32-5. doi: [10.19221/202117](https://doi.org/10.19221/202117)

4. Bulyk RYe, Yosyenko VR. Characteristics of density of melatonin receptors of type 1B in neurons of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus under different light modes. Proceedings of the 9th International Scientific and

Practical Conference Challenges in Science of Nowadays; 2021 Jul 16-18; Washington, USA. InterConf. 2021;66:344-9.

5. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Онтогенетичні особливості щільності мелатонінових рецепторів у нейронах вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса. В: Матеріали міжнар. наук-практ. конф. Охорона та захист здоров'я людини в умовах сьогодення; 2019 Лис 1-2; Київ. Київ: Київський медичний науковий центр; 2019, с. 10-1.

6. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Імуногістохімічні особливості вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса щурів на фоні постійного освітлення та уведення мелатоніну. In: Proceedings of IV International Scientific and Practical Conference Priority directions of science development; 2020 Feb 3-4; Lviv, Ukraine. Lviv; 2020, p. 84-5.

7. Yosyenko VR. Age characteristics of the density of melatonin receptors in the neurons of the ventrolateral preoptic nucleus of the hypothalamus under the light stimulation. В: Бойчук ТМ, Іващук ОІ, Безрук ВВ, редактори. Матеріали 101-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»; 2020 Лют 10, 12, 17; Чернівці. Чернівці; 2020, с. 66.

8. Йосипенко ВР. Порівняльна характеристика щільності рецепторів 1А до мелатоніну в нейронах вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса за умов світлової стимуляції. ВІМСО Journal. 2020;2020:181.

9. Yosyenko VR. Correction of immunohistochemical disorders of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus of mature rates caused by constant lighting. В: Бойчук ТМ, Іващук ОІ, Безрук ВВ, редактори. Матеріали підсумкової 102-ї наук.-практ. конф. з міжнар. участю професорсько-викладацького персоналу Буковинського державного медичного університету; 2021 Лют 08, 10, 15; Чернівці. Чернівці: Медуніверситет; 2021, с. 66-7.

10. Potdar M, Yosyenko VR. The role of melatonin in sleep regulation. ВІМСО Journal. 2021;2021:115.

11. Йосипенко ВР, Булик РЄ. Вікові відмінності щільності мелатонінових рецепторів типу 1В у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса. В: Матеріали VII Національного конгресу геронтологів і геріатрів України; 2021 Жов 6-8; Київ. Київ; 2021, с. 21.

РОЗДІЛ 5

ГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПРОТЕЇНІВ НЕЙРОНІВ БІЧНОГО ПЕРЕДЗОРОВОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ЗА РІЗНИХ УМОВ СВІТЛОВОГО РЕЖИМУ ТА КОРЕКЦІЇ МЕЛАТОНІНОМ

5.1. Особливості оптичної густини специфічного забарвлення на білок у монохроматичному варіанті при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за модифікованого світлового режиму та уведення мелатоніну

Гістохімічні дослідження протеїнів БПЯ гіпоталамуса щурів проведені за допомогою гістохімічного забарвлення бромфеноловим синім на білки за методом Mikel Calvo. Цей гістохімічний метод вигідний тим, що дозволяє кількісно оцінити два важливих параметри протеїнів, залежно від способу знімання показників.

Перший спосіб отримання показників полягає в тому, що цифрові копії зображень гістохімічних препаратів, що забарвлені за Mikel Calvo, цифровими інструментами перетворюються на монохроматичні зображення, які виглядають як зображення сірого кольору з 256-и градаціями його відтінків. Метод комп'ютерної мікроденситометрії на таких зображеннях дозволяє кількісно оцінити інтенсивність забарвлення (оптичну густину) на білок, що по суті дозволяє об'єктивно судити про концентрацію протеїну в певних локаціях.

Другий спосіб одержання показників полягає в тому, що без будь-якої попередньої обробки цифрових зображень методом комп'ютерної мікроспектрофотометрії аналізуються кольорові копії зображень гістохімічних препаратів, які забарвлені за Mikel Calvo. Результатом таких вимірювань є показник “Коефіцієнт R/B”, який дозволяє кількісно оцінити співвідношення між карбоксильними та аміно-групами білків, що в свою чергу дає змогу дійти висновку про інтенсивність окиснювальної модифікації білків, суть якої

полягає в окисненні аміногруп білків, що змінює співвідношення між карбоксильними та аміно-групами білків у бік карбоксильних груп.

Отже, одні й ті ж гістохімічні препарати дозволяли паралельно дійти висновку щодо концентрації протеїнів та інтенсивності їх окиснювальної модифікації. Саме тому в цьому розділі подаються як монохроматичні (з градацією сірого кольору) копії зображень та ті ж самі, але оригінальні кольорові зображення. Це дозволяє порівняти їх між собою, щоб скласти повне уявлення про досліджені властивості білків.

У табл. 5.1 подані результати вимірювання оптичної густини специфічного забарвлення на білок у монохроматичному варіанті при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих та старих щурів за звичайного режиму освітлення.

Таблиця 5.1 – Оптична густина специфічного забарвлення на білок у монохроматичному варіанті при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за стандартного світлового режиму

Години доби	Оптична густина гістохімічного забарвлення на білок (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,274±0,0017	0,222±0,0014 (p<0,001)
02.00	0,271±0,0016	0,221±0,0013 (p<0,001)

Примітка: p – вірогідність різниці порівняно з зрілими щурами.

Перед тлумаченням вказаних в табл. 1 показників спочатку слід відмітити, що у всіх щурів, незалежно від їхнього віку, нейрони БПЯ гіпоталамуса при застосуванні методики Mikel Calvo завжди забарвлювалися дуже чітко, їх межі були ясними (рис. 5.1-5.4). Забарвлення носило

поліморфний характер – дрібні або великі гранули та дифузний фон, що віддзеркалює особливості розподілу білків в органелах та цитозолі цих клітин.

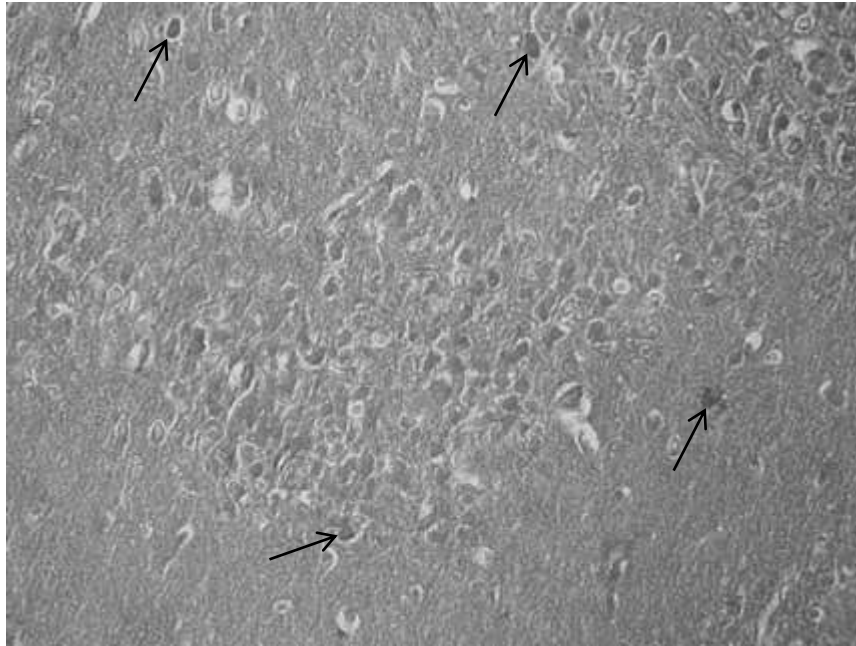


Рис. 5.1. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура о 14.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білок в монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20x. Ок.10x (оптичне збільшення x200).

Із наведених у табл. 1 даних видно, що згідно оптичної густини забарвлення концентрація білків у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів у середньому суттєво перевищує показники старих щурів. Водночас, необхідно відмітити, що в обох вікових категоріях немає різниці між різними періодами доби (14.00 та 02.00 год.).

Якщо оцінювати інтенсивність забарвлення нейронів у різних зонах БПЯ гіпоталамуса (центр чи периферія), то варто відзначити, що в зрілих щурів (рис. 5.1-5.2) нейрони центральної зони ядра були забарвлені так само інтенсивно, як і нейрони периферичних відділів ядра. Розподіл гранулярного

та дифузного матеріалу також не залежав від того, в якій зоні БПЯ гіпоталамуса розташовувалися нейрони.

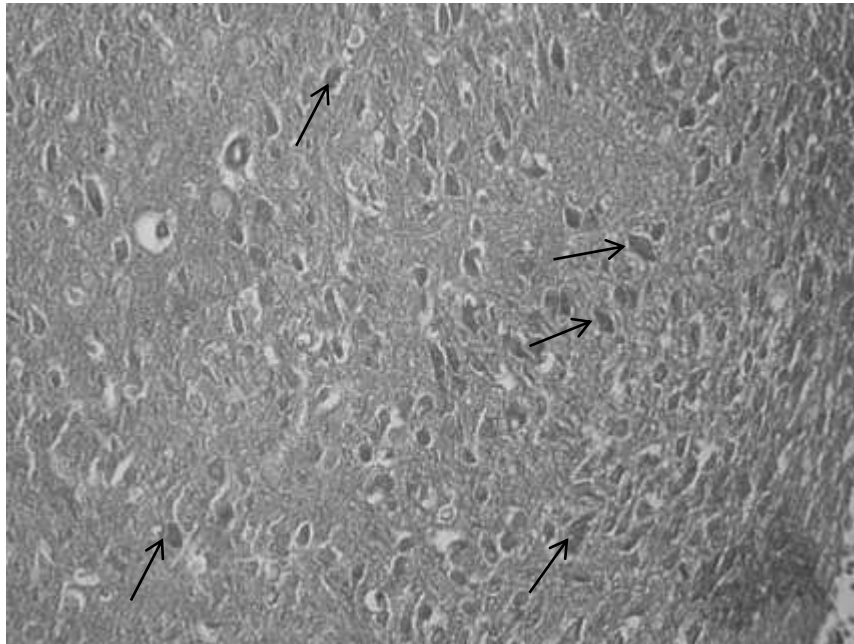


Рис. 5.2. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура о 02.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білок у монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Особливістю інтенсивності забарвлення на білок у старих щурів було те, що деякі нейрони забарвлювалися так само інтенсивно, як більшість нейронів у зрілих щурів (рис. 5.3-5.4). Причому необхідно відзначити, що нейрони з більш інтенсивним забарвленням на білок виявлялися переважно в центральних відділах БПЯ гіпоталамуса, хоча вони там були нерівномірно “перемішані” із нейронами зі слабкою інтенсивністю забарвлення на білок.

Отже, в нормі є суттєва різниця в особливостях розподілу білкової маси в нейронах БПЯ гіпоталамуса між зрілими та старими щурами.

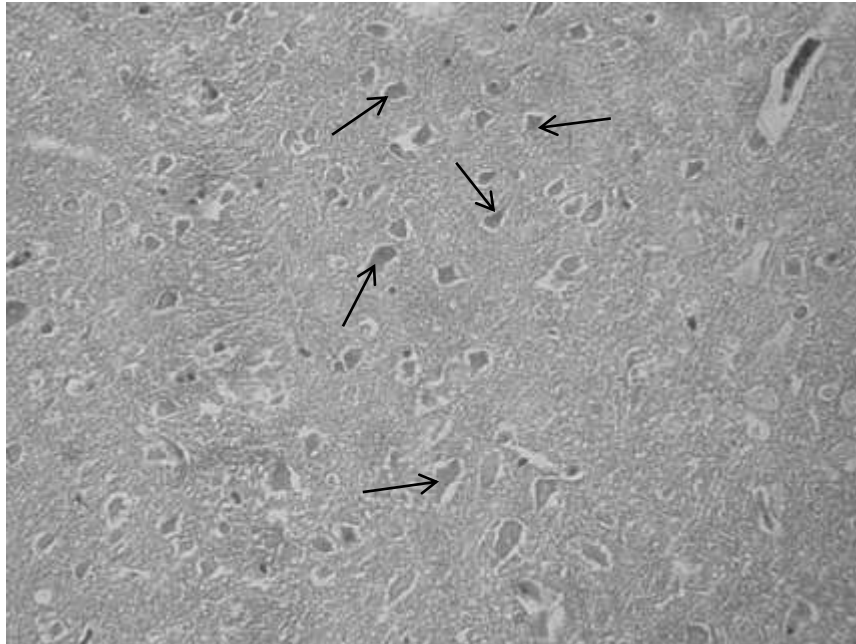


Рис.5.3. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура о 14.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білок у монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

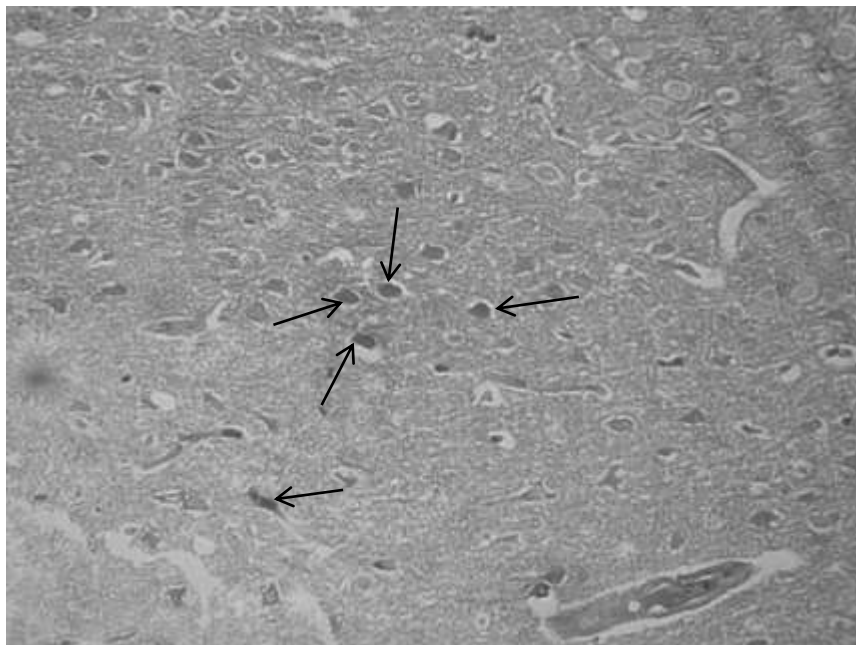


Рис. 5.4. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура о 02.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білок у монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Дані про оптичну густина специфічного забарвлення на білок у монохроматичному варіанті при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової депривації наведені у табл. 5.2.

Таблиця 5.2 – Оптична густина специфічного забарвлення на білок в монохроматичному варіанті при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової депривації

Години доби	Оптична густина гістохімічного забарвлення на білок (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,273±0,0018	0,208±0,0016 (p<0,001)
02.00	0,276±0,0015	0,214±0,0015 (p<0,001)

Примітка: p - вірогідність різниці порівняно з зрілими щурами.

З поданих даних видно, що згідно оптичної густини (інтенсивності) забарвлення на білок, відносна концентрація протеїнів у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів у середньому не змінюється незалежно від періоду доби (рис. 5.5-5.6), тоді, коли у старих щурів у середньому інтенсивність забарвлення на білок в нейронах БПЯ гіпоталамуса суттєво знижується (рис. 5.7-5.8).

У той же час, необхідно відмітити, що якщо у зрілих щурів, о 02.00 год. нейрони були забарвлені однорідно по різним зонам ядра (рис. 5.6), то о 14.00 год. навпаки відмічалася неоднорідність інтенсивності забарвлення від нейрона до нейрона (рис. 5.5).

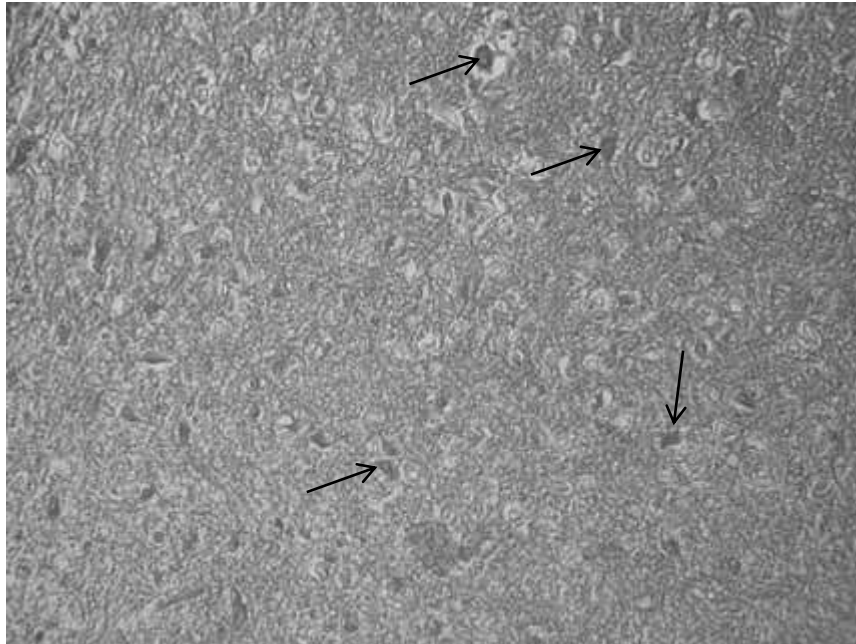


Рис. 5.5. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура о 14.00 год. за умов світлової депривації при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo на білок у монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

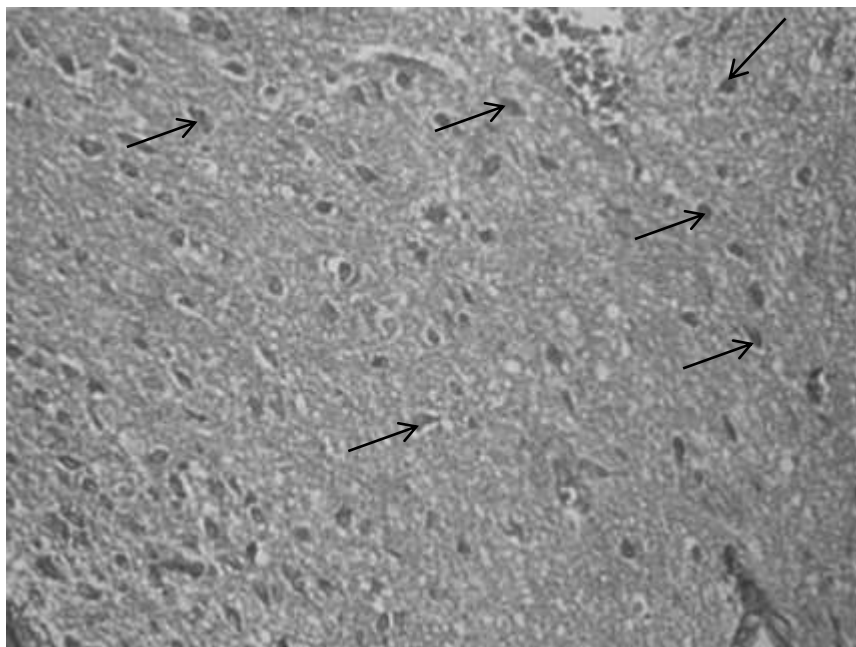


Рис. 5.6. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура о 02.00 год. за умов світлової депривації при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo на білок у монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Як було вказано вище, у старих щурів інтенсивність забарвлення на білок в нейронах БПЯ гіпоталамуса за умов світлової депривації у середньому суттєво знижується, причому, що особливо сильно помітно о 14.00 год., у порівнянні з 02.00 год.

Окрім того, необхідно відмітити, що за умов світлової депривації о 14.00 год. у старих щурів нейрони БПЯ гіпоталамуса були забарвлені доволі одноманітно (рис. 5.7), тоді, коли на 02.00 год. навпаки відмічалася суттєва гетерогенність інтенсивності забарвлення нейронів, хоча, варто зазначити, що це не залежало від того, яка це зона ядра, центральна чи периферійна.

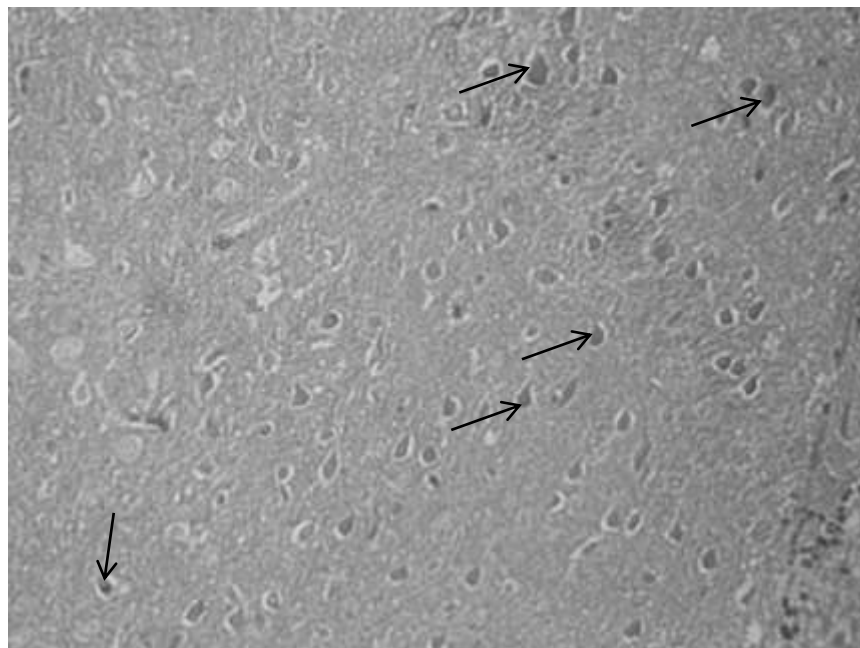


Рис. 5.7. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура о 14.00 год. за умов світлової депривації при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo на білок у монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

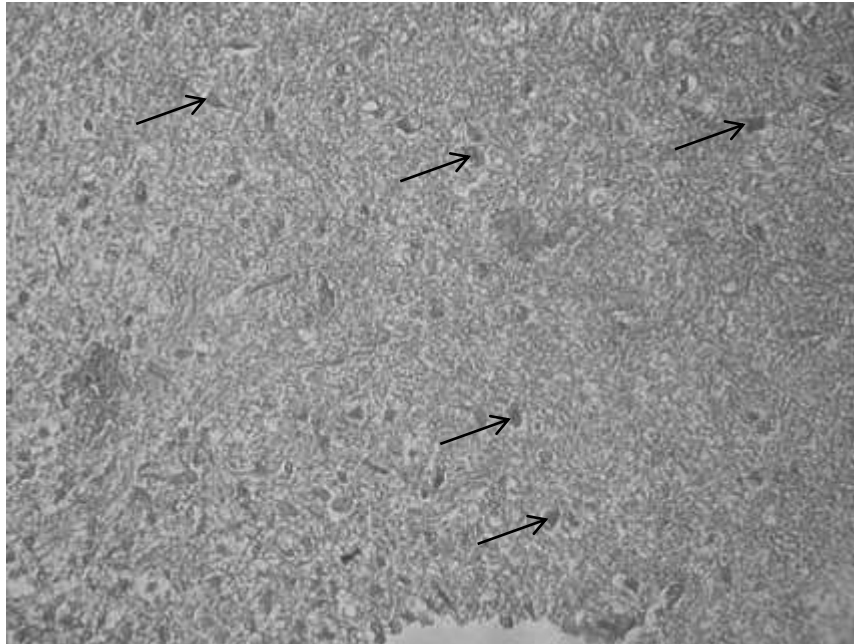


Рис. 5.8. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура о 02.00 год. за умов світлової депривації при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білок в монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

У табл. 5.3 подані результати досліджень вимірювання оптичної густини специфічного забарвлення на білок у монохроматичному варіанті при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів за умов світлової стимуляції.

З поданих у табл. 3 даних видно різну реакцію щурів на зміну режиму освітлення залежно від віку. Зокрема, у зрілих щурів мало місце зростання середньої інтенсивності забарвлення на білок (рис.5.9-5.10) в нейронах БПЯ гіпоталамуса, тоді, коли у старих щурів, навпаки, відмічено зниження середньої інтенсивності забарвлення на білок (рис.5.11-5.12) в нейронах БПЯ гіпоталамуса.

Таблиця 5.3 – Оптична густина специфічного забарвлення на білок в монохроматичному варіанті при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції

Години доби	Оптична густина гістохімічного забарвлення на білок (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,321±0,0017	0,198±0,0016 (p<0,001)
02.00	0,326±0,0014	0,196±0,0017 (p<0,001)

Примітка: p – вірогідність різниці порівняно з зрілими щурами.

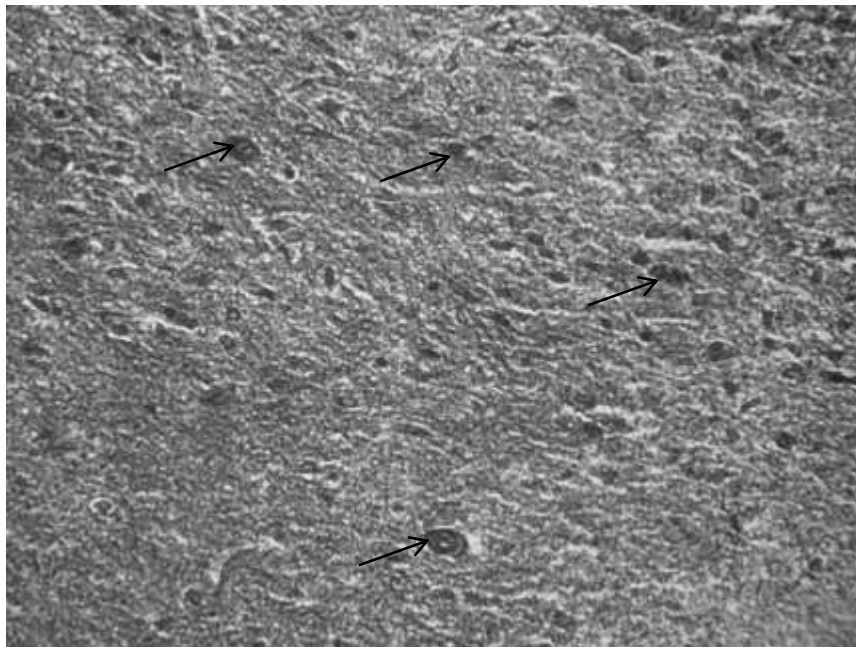


Рис. 5.9. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура о 14.00 год. за умов світлової стимуляції при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo на білок в монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

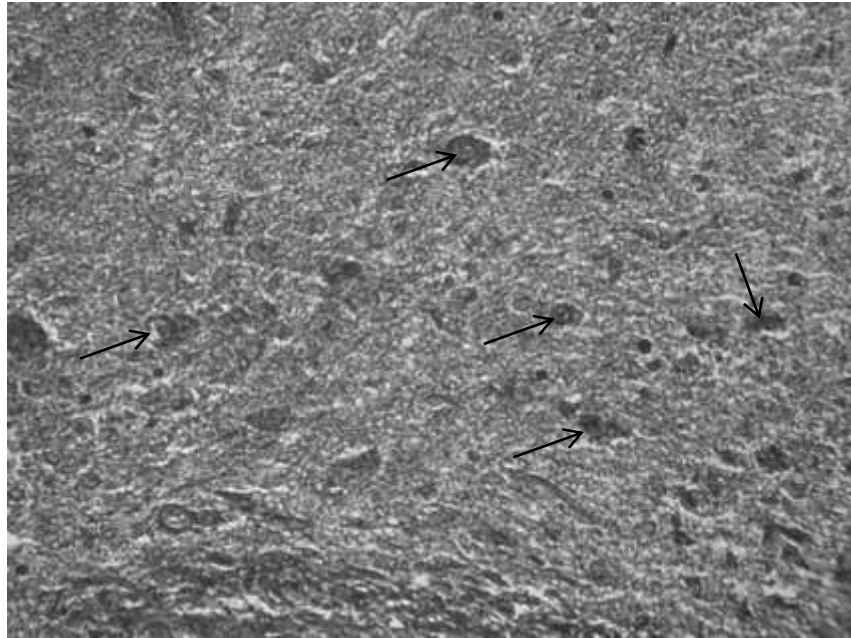


Рис. 5.10. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура о 02.00 год. за умов світлової стимуляції при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo на білок у монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

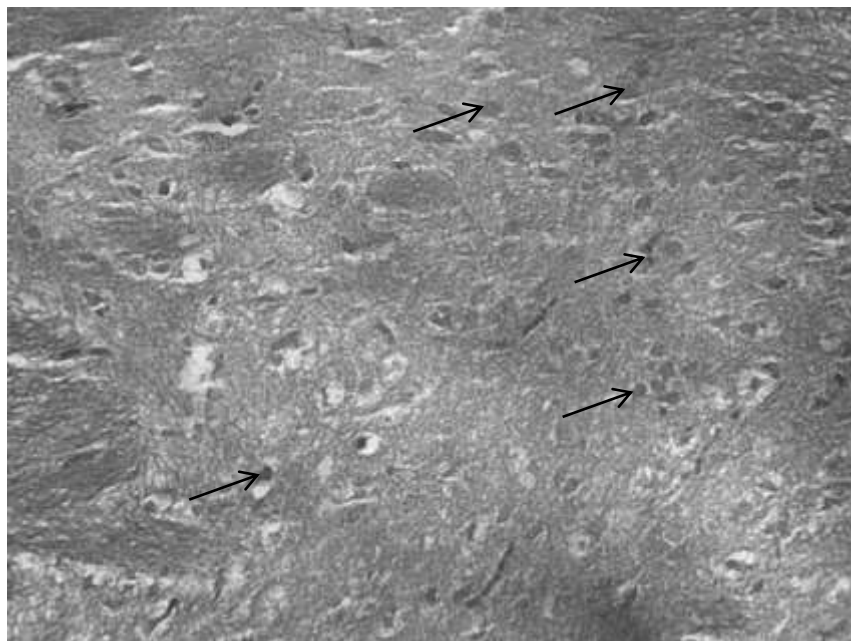


Рис.5.11. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура о 14.00 год. за умов світлової стимуляції при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo на білок у монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

При цьому варто відзначити, що у зрілих щурів нейрони на білок були забарвлені рівномірно по центральним та периферичним зонам БПЯ гіпоталамуса на обидва періоди доби.

Водночас, у старих щурів відчалася деяка нерівномірність забарвлення нейронів БПЯ гіпоталамуса о 14.00 год. (рис. 5.11), але такого феномену не було відмічено о 02.00 год. (рис. 5.12).

Отже, на світлову стимуляцію зрілі та старі щури реагують кардинально протилежно щодо відносної концентрації протеїнів у нейронах БПЯ гіпоталамуса.

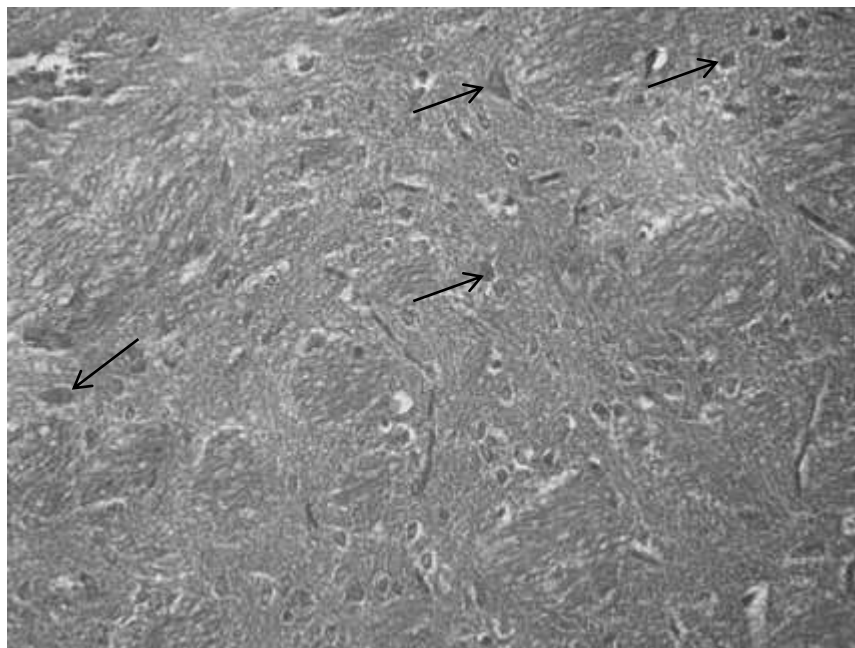


Рис. 5.12. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура о 02.00 год. за умов світлової стимуляції при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білок у монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200)

У табл. 5.4 наведені дані, які дозволяють оцінити вплив внутрішньоочеревинного уведення мелатоніну (0,5 мг/кг маси тіла, Sigma, США) на інтенсивність оптичної густини специфічного забарвлення білків у

нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих та старих щурів, які утримувалися в умовах світлової стимуляції.

Таблиця 5.4 – Оптична густина специфічного забарвлення на білок у монохроматичному варіанті при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну

Години доби	Оптична густина гістохімічного забарвлення на білок (в од.опт.густини)	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	0,272±0,0019	0,220±0,0016 (p<0,001)
02.00	0,269±0,0020	0,218±0,0015 (p<0,001)

Примітка: p – вірогідність різниці порівняно з зрілими щурами.

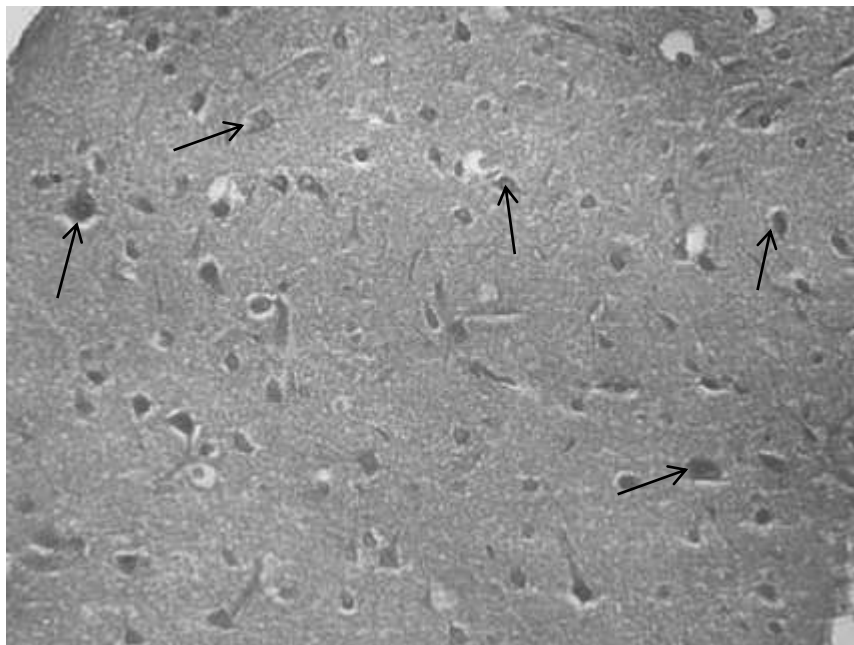


Рис.5.13. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура о 14.00 год. за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білок у монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

З даних табл. 5.4 можна дійти висновку, що уведення мелатоніну суттєво покращує процеси накопичення протеїнів у нейронах БПЯ гіпоталамуса як зрілих так і старих щурів, причому це не залежить від періоду доби.

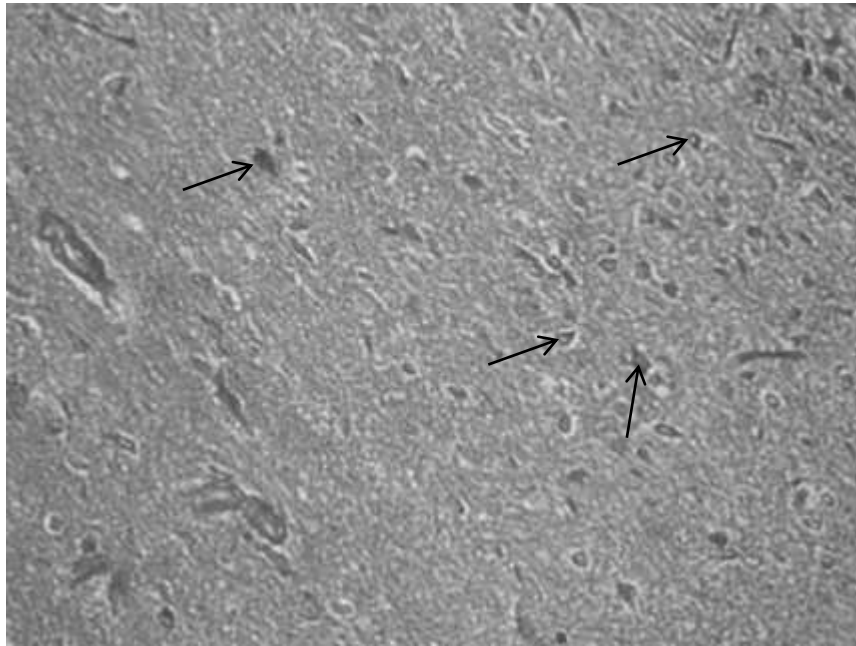


Рис. 5.14. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура о 02.00 год. за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo на білок в монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Зокрема, оптична густина специфічного забарвлення на білок у монохроматичному варіанті при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів повернулася до рівня норми як у зрілих (рис. 5.13-5.14), так і у старих щурів (рис. 5.15-5.16). Хоча, слід вказати на те, що у старих щурів о 02.00 год. відмічалася нерівномірність забарвлення нейронів (рис. 5.16).

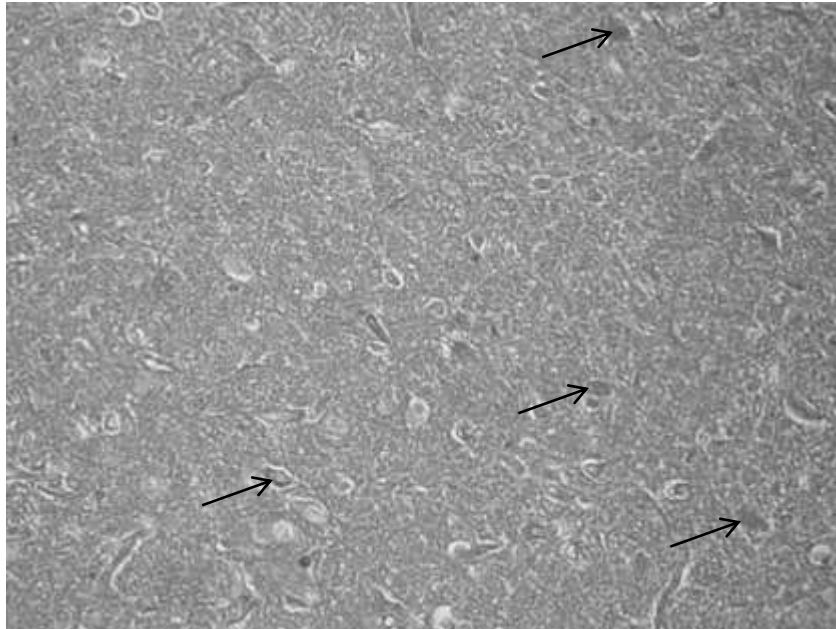


Рис. 5.15. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура о 14.00 год. за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo на білок в монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

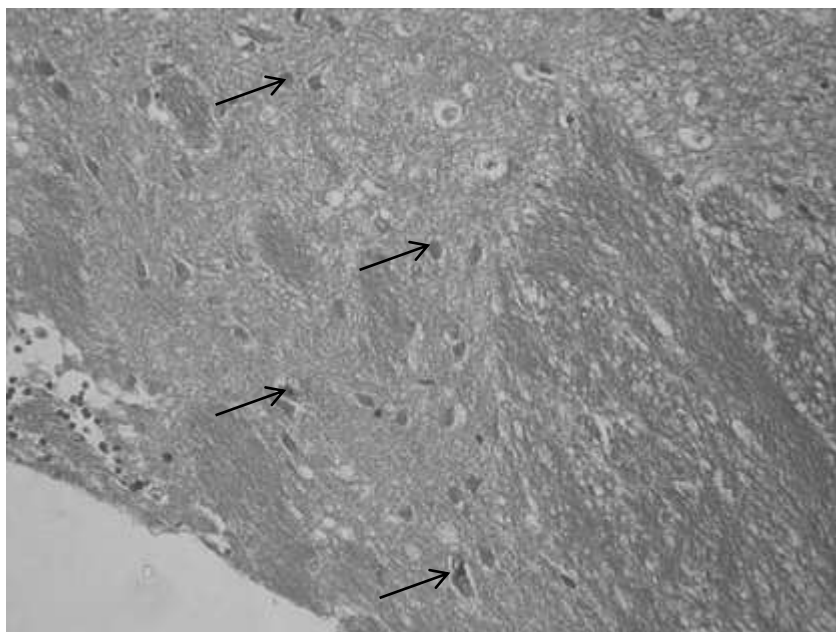


Рис. 5.16. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура о 02.00 год. за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo на білок в монохроматичному варіанті. Нейрони з найбільш вираженим забарвленням позначені стрілками. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Таким чином, оптична густина специфічного забарвлення на білок при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo в монохроматичному варіанті у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів у зрілих щурів у середньому суттєво перевищує показники старих щурів.

Різні режими освітлення по-різному впливають на показники оптичної густини специфічного забарвлення на білок при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo в монохроматичному варіанті у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів, що схематично зображено на рис. 5.17.

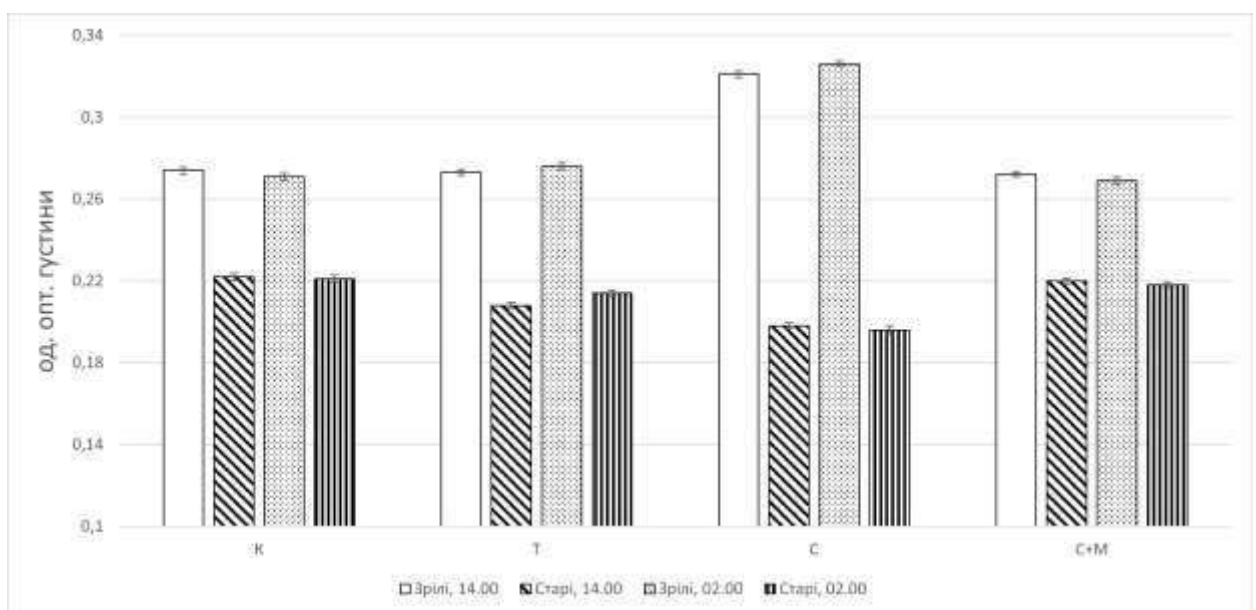


Рис. 5.17. Оптична густина специфічного забарвлення на білок в монохроматичному варіанті при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за різного режиму освітлення (в од. опт. густини).

Зокрема, за умов світлової депривації, оптична густина специфічного забарвлення на білок у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів у середньому не змінюється незалежно від періоду доби, тоді, коли у старих щурів у середньому інтенсивність забарвлення на білок в нейронах БПЯ гіпоталамуса знижується. Водночас, світлова стимуляція веде до зростання середньої інтенсивності забарвлення на білок в нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих

щурів, тоді, коли у старих щурів, навпаки, спостерігається зниження середньої інтенсивності забарвлення на білок в досліджуваних структурах.

Введення екзогенного мелатоніну на тлі постійного освітлення веде до нормалізації оптичної густини специфічного забарвлення на білок у нейронах БПЯ гіпоталамуса, як зрілих так і старих щурів.

5.2. Коефіцієнт R/B при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за різного світлового режиму та уведення мелатоніну

На цих же цифрових зображеннях, але без монохроматичного перетворення була здійснена комп'ютерна мікроспектрофотометрія, яка дозволила отримати показник “Коефіцієнт R/B”, що дозволяє кількісно оцінити співвідношення між карбоксильними та аміногрупами білків.

Середні дані коефіцієнту R/B у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих та старих щурів за звичайного режиму освітлення викладені у табл. 5.5.

Таблиця 5.5 – Коефіцієнт R/B (комп'ютерна мікроспектрофотометрія) при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за стандартного світлового режиму

Години доби	Коефіцієнт R/B	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	1,24±0,005	1,09±0,007 (p<0,001)
02.00	1,26±0,006	1,17±0,004 (p<0,001)

Примітка: p – вірогідність різниці порівняно з зрілими щурами.

З наведених у табл. 5.5 даних видно, що коефіцієнт R/V в нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів у середньому є значно вищим (рис. 5.18-5.19), ніж у старих щурів (рис. 5.20-5.21).

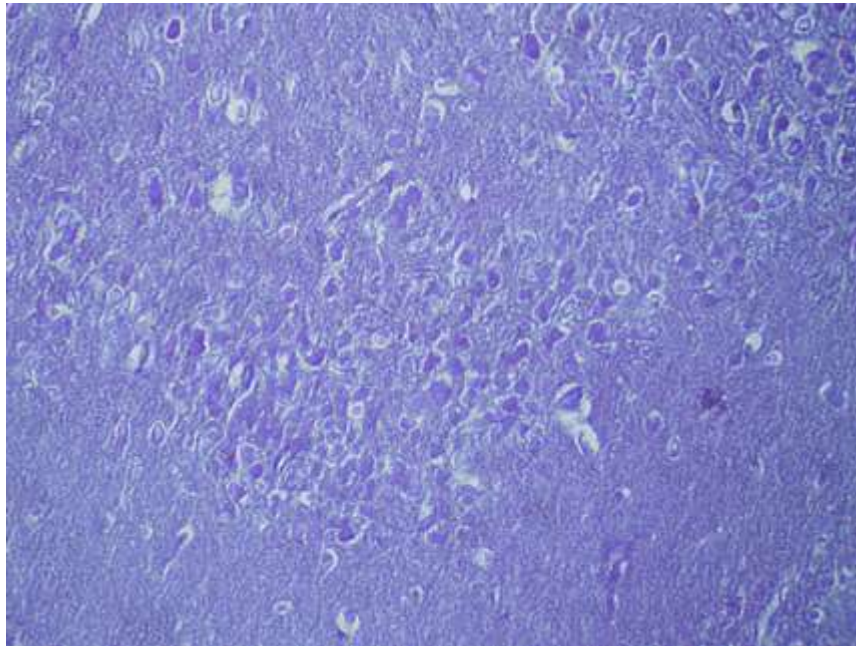


Рис. 5.18. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за стандартного світлового режиму о 14.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

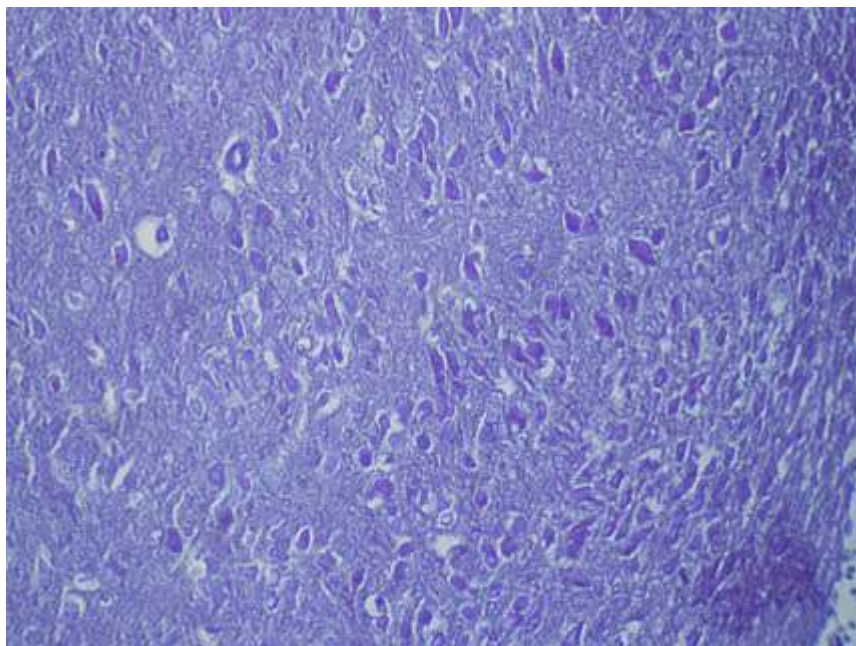


Рис. 5.19. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за стандартного світлового режиму о 02.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Отже, білки нейронів БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів мають в своєму складі білки, які більше збагачені на карбоксильні групи, ніж у старих щурів.

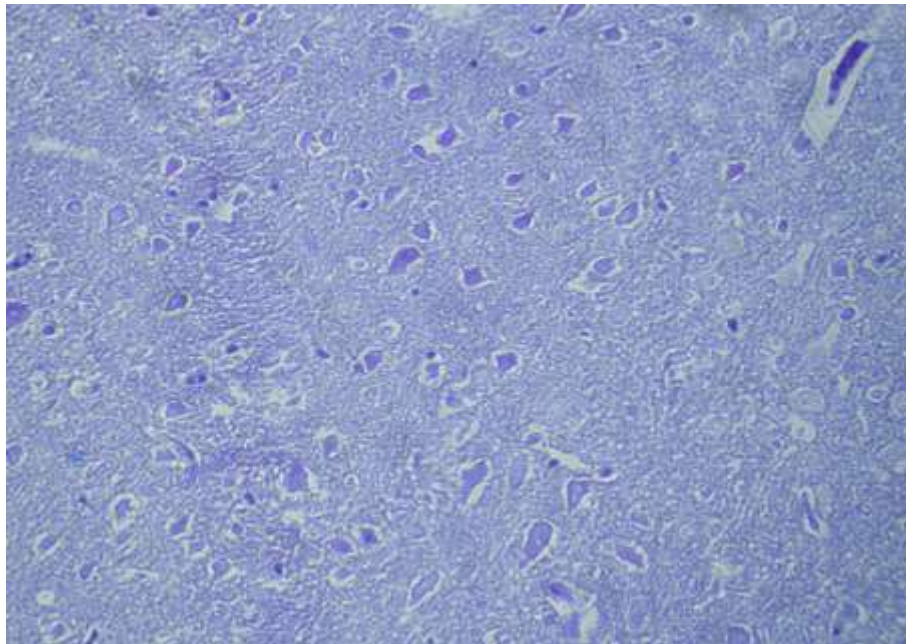


Рис. 5.20. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за стандартного світлового режиму о 14.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

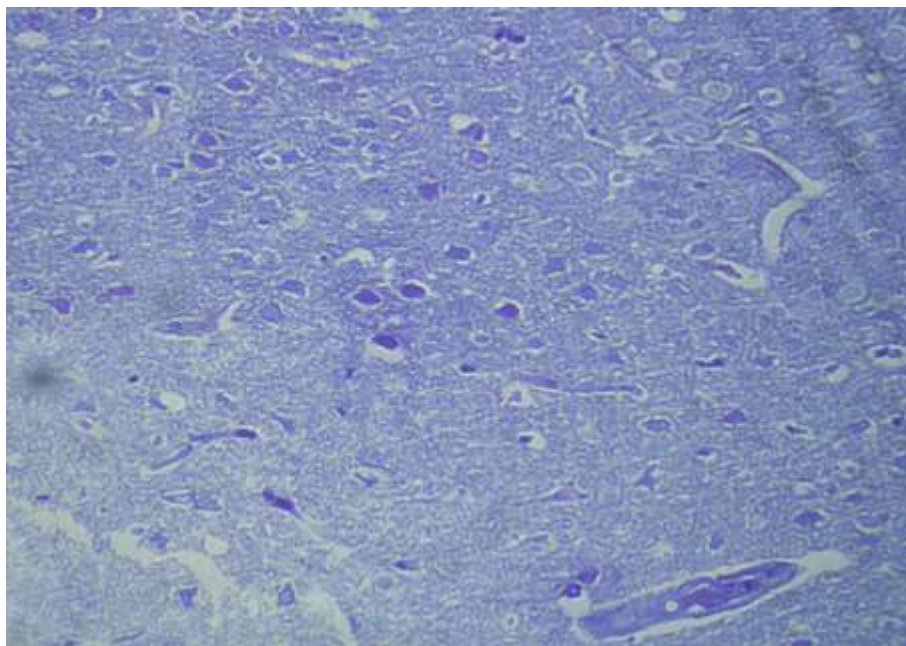


Рис. 5.21. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за стандартного світлового режиму о 02.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Це може свідчити про більшу інтенсивність обміну білків у зрілих щурів у порівнянні зі старими щурами, а саме - більшу інтенсивність окиснювальної модифікації білків.

При цьому варто вказати на те, що у старих щурів о 02.00 год. у порівнянні з 14.00 год. коефіцієнт R/B є вищим. Для тлумачення такої розбіжності в подальшому варто буде провести додаткові дослідження.

Результати середніх значень коефіцієнту R/B при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих та старих щурів за умов світлової депривації подані у табл. 5.6.

Таблиця 5.6 – Коефіцієнт R/B (комп'ютерна мікроспектрофотометрія) при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової депривації

Години доби	Коефіцієнт R/B	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	1,26±0,007	1,11±0,009 (p<0,001)
02.00	1,28±0,009	1,18±0,007 (p<0,001)

Примітка: p – вірогідність різниці порівняно з зрілими щурами.

Як можна побачити з наведених у табл. 5.6 даних, середні значення коефіцієнту R/B при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів за умов світлової депривації у середньому не змінився ані о 14.00 год., ані о 02.00 год. (рис. 5.22-5.23).

Так само можна констатувати, що і в старих щурів світлова депривація суттєво не вплинула на середні значення коефіцієнту R/B у нейронах БПЯ гіпоталамуса при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo (рис. 5.24-5.25).

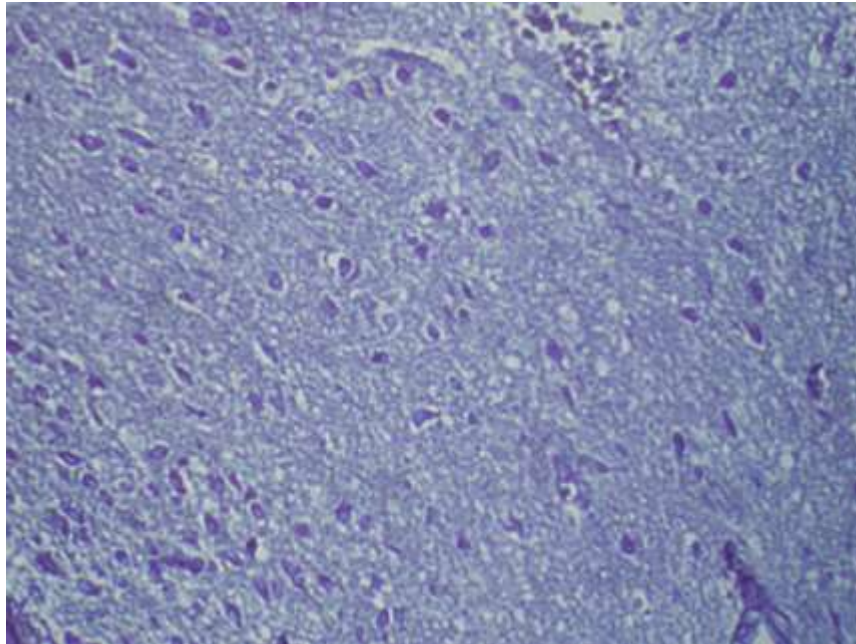


Рис. 5.22. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової депривації о 14.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

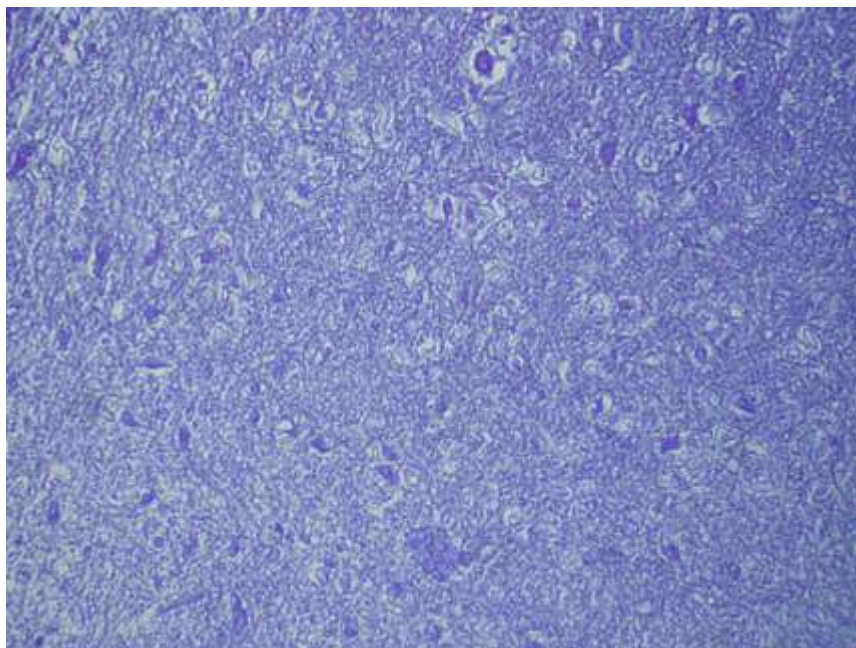


Рис. 5.23. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової депривації о 02.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Однак, варто відзначити, що за умов світлової депривації величини коефіцієнту R/B коливалися від нейрона до нейрона, що особливо було помітно у старих щурів о 02.00 год., а також у зрілих щурів о 02.00 год.

Інша ситуація з властивостями білків у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів відбувається за умов світлової стимуляції (табл.7).

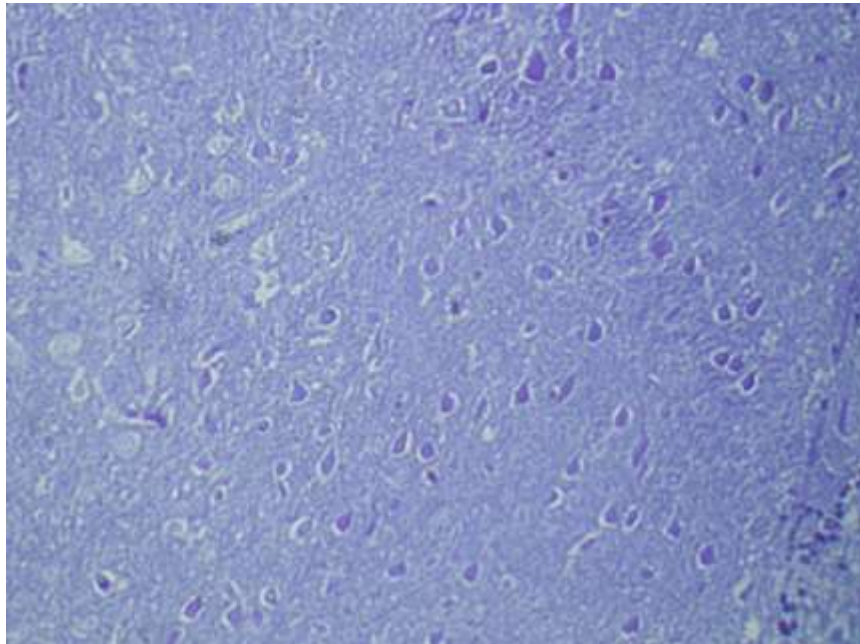


Рис. 5.24. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової депривації о 14.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

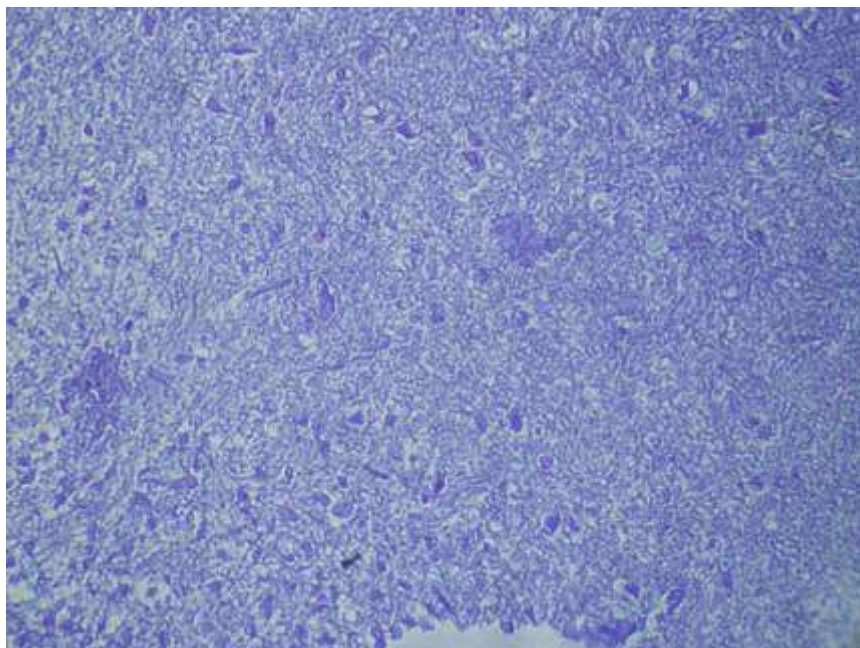


Рис. 5.25. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової депривації о 02.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Таблиця 5.7 – Коефіцієнт R/B (комп'ютерна мікроспектрофотометрія) при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції

Години доби	Коефіцієнт R/B	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	1,48±0,008	1,24±0,007 (p<0,001)
02.00	1,39±0,009	1,19±0,008 (p<0,001)

Примітка: p – вірогідність різниці порівняно з зрілими щурами.

Як це видно з даних вказаної таблиці, за умов світлової стимуляції коефіцієнт R/B різко зростає у зрілих щурів як о 14.00 год., так і о 02.00 год. При цьому має місце нерівномірність цього процесу серед різних нейронів, яка особливо помітна в центральних зонах БПЯ гіпоталамуса (рис. 5.26-5.27).

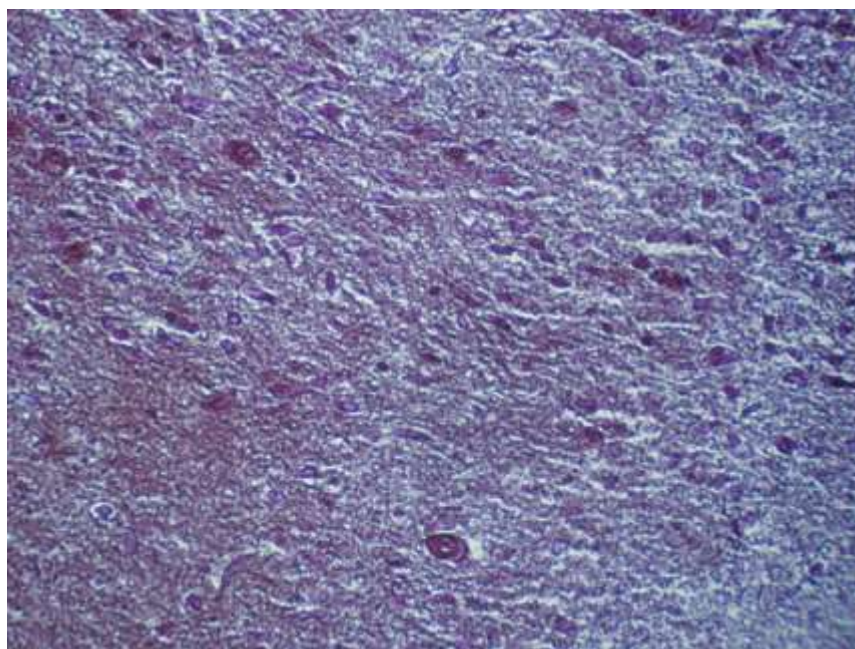


Рис. 5.26. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової стимуляції о 14.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

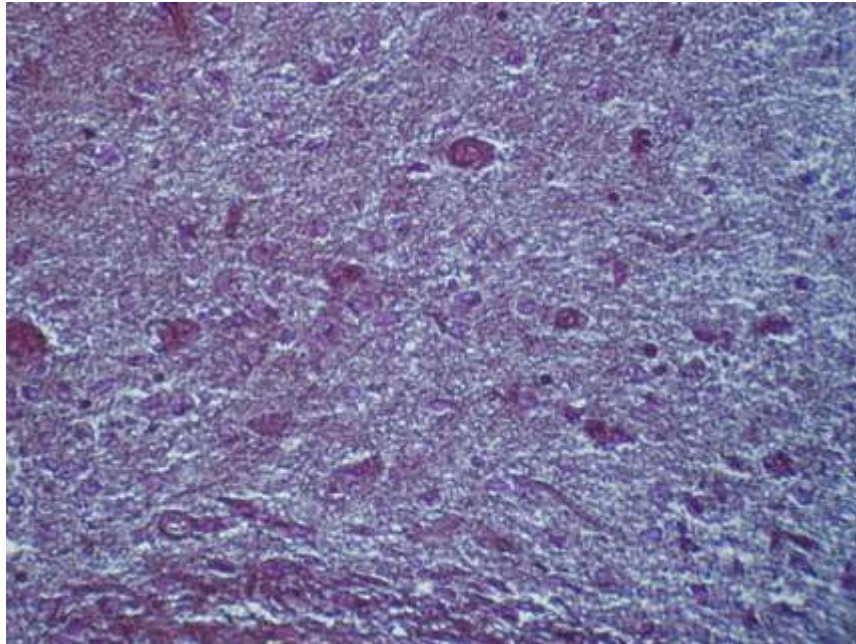


Рис. 5.27. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової стимуляції о 02.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Вказані цифри можна тлумачити як зростання інтенсивності процесів окиснювальної модифікації білків у нейронах БПЯ.

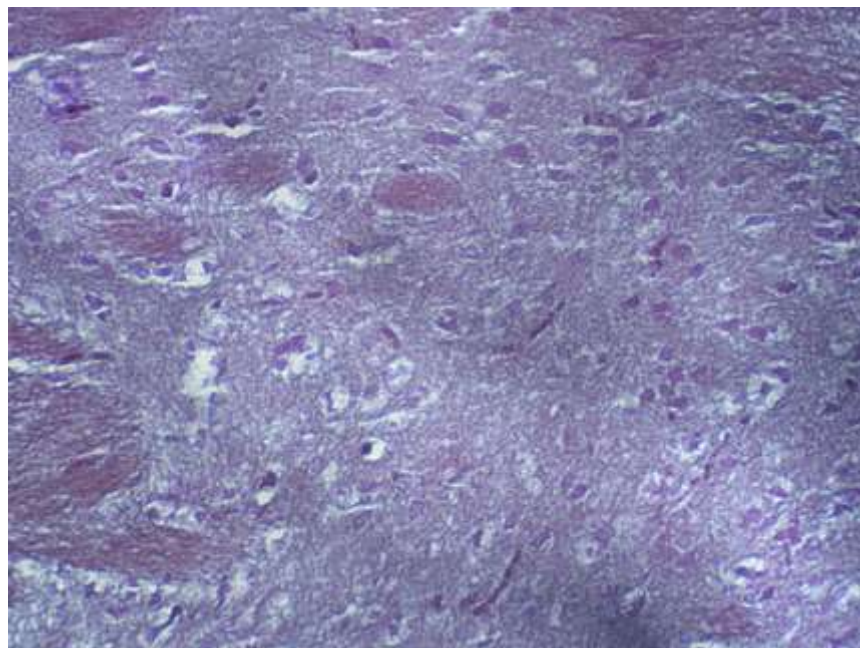


Рис. 5.28. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової стимуляції о 14.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Таку ж реакцію нейронів БПЯ гіпоталамуса, як у зрілих щурів, показали нейрони старих щурів, але лише о 14.00 год. Водночас, слід вказати на те, що у старих щурів серед нейронів БПЯ гіпоталамуса відмічалася нерівномірність величини коефіцієнту R/B, причому це не залежало від приналежності нейронів до центральних чи периферичних зон ядра (рис. 5.28-5.29).

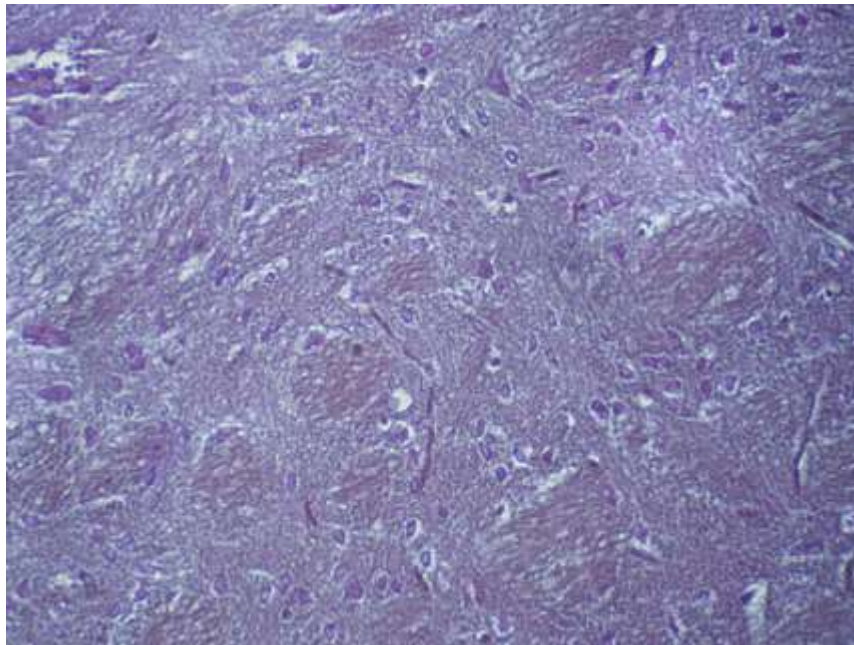


Рис. 5.29. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової стимуляції о 02.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Отже, на світлову депривацію з точки зору окиснювальної модифікації білків так чи інакше зреагували нейрони БПЯ гіпоталамуса всіх щурів.

У табл. 5.8 подані середні значення коефіцієнту R/B у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих та старих щурів за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну.

Наведені середні значення дозволяють констатувати, що уведення мелатоніну суттєво впливає на окиснювальну модифікацію білків у нейронах БПЯ гіпоталамуса, що видно по наближенню цифр коефіцієнту R/B до нормальних величин.

Таблиця 5.8 – Коефіцієнт R/B (комп'ютерна мікроспектрофотометрія) при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну

Години доби	Коефіцієнт R/B	
	Зрілі щури	Старі щури
14.00	1,32±0,006	1,08±0,007 (p<0,001)
02.00	1,30±0,008	1,16±0,004 (p<0,001)

Примітка: p – вірогідність різниці порівняно з старими щурами.

Цей ефект більш помітний для старих щурів (рис. 5.32-5.33), у яких відбулася повна нормалізація середніх значень коефіцієнту R/B в нейронах БПЯ гіпоталамуса, але менш помітний для зрілих щурів (рис. 5.30-5.31).

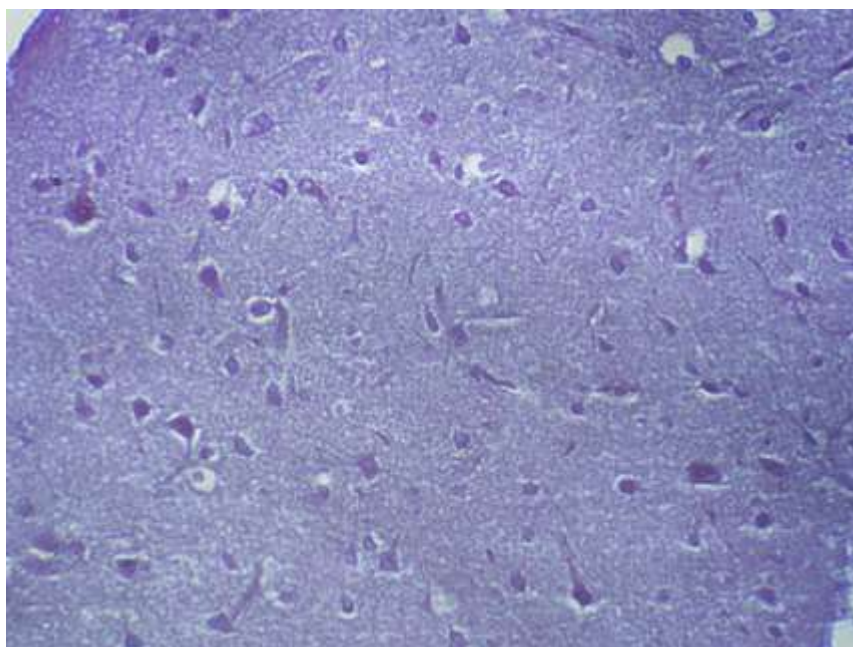


Рис. 5.30 Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну о 14.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

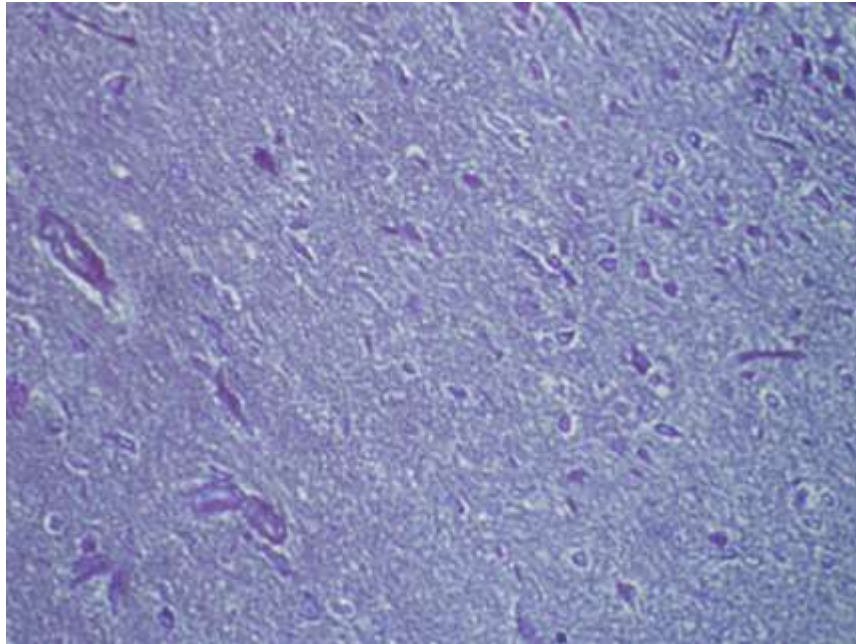


Рис. 5.31. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у зрілого щура за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну о 02.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Мікел Салво на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

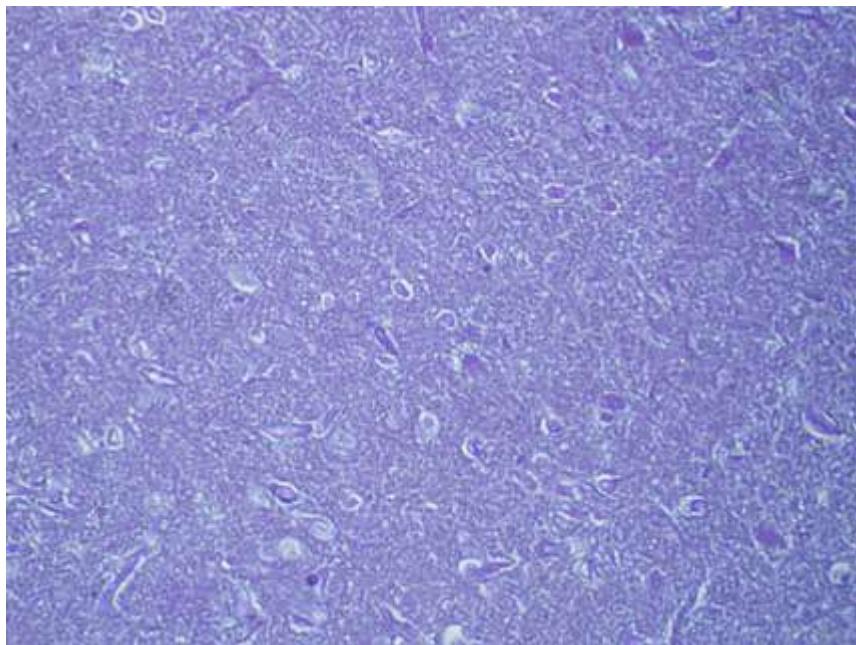


Рис. 5.32. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну о 14.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Мікел Салво на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Однак, якщо у старих щурів відзначається нерівномірність величин коефіцієнту R/V серед нейронів БПЯ гіпоталамуса як о 14.00 год., так і о 02.00 год., то в зрілих щурів, навпаки, значення коефіцієнту R/V серед нейронів БПЯ гіпоталамуса є досить рівномірними, що слід розцінити як результат позитивної дії уведення мелатоніну.

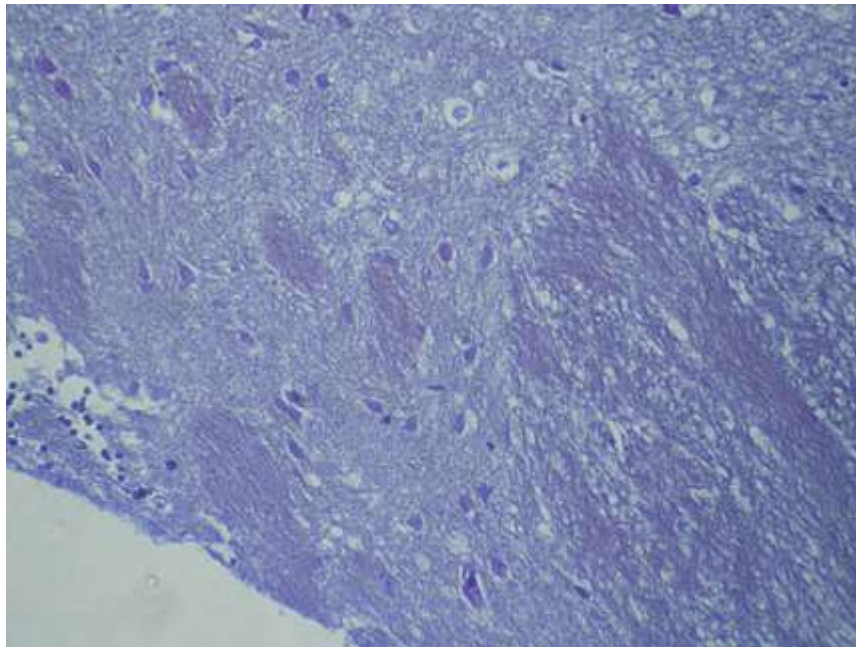


Рис. 5.33. Нейрони БПЯ гіпоталамуса у старого щура за умов світлової стимуляції та уведення мелатоніну о 02.00 год. при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo на білки. Фото мікропрепарату. Об.20х. Ок.10х (оптичне збільшення x200).

Таким чином, коефіцієнт R/V при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів у середньому суттєво перевищує показники старих щурів. Це може свідчити про більш виражені процеси окиснювальної модифікації білків у старих щурів.

Зміна режиму освітлення по-різному впливає на показники коефіцієнту R/V при застосуванні гістохімічної методики Mikel Salvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів, що схематично зображено на рис. 5.34.

Зокрема, за умов світлової депривації, коефіцієнт R/V у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів у середньому не змінюється. Водночас,

світлова стимуляція веде до зростання коефіцієнту R/B в нейронах БПЯ гіпоталамуса і у зрілих, і у старих щурів. Отримані результати можна тлумачити як зростання інтенсивності процесів окиснювальної модифікації білків у нейронах БПЯ гіпоталамуса у відповідь на зміну режиму освітлення.

Ін'єкція екзогенного мелатоніну на тлі постійного освітлення веде до нормалізації коефіцієнту R/B у нейронах БПЯ гіпоталамуса, як зрілих так і старих щурів.

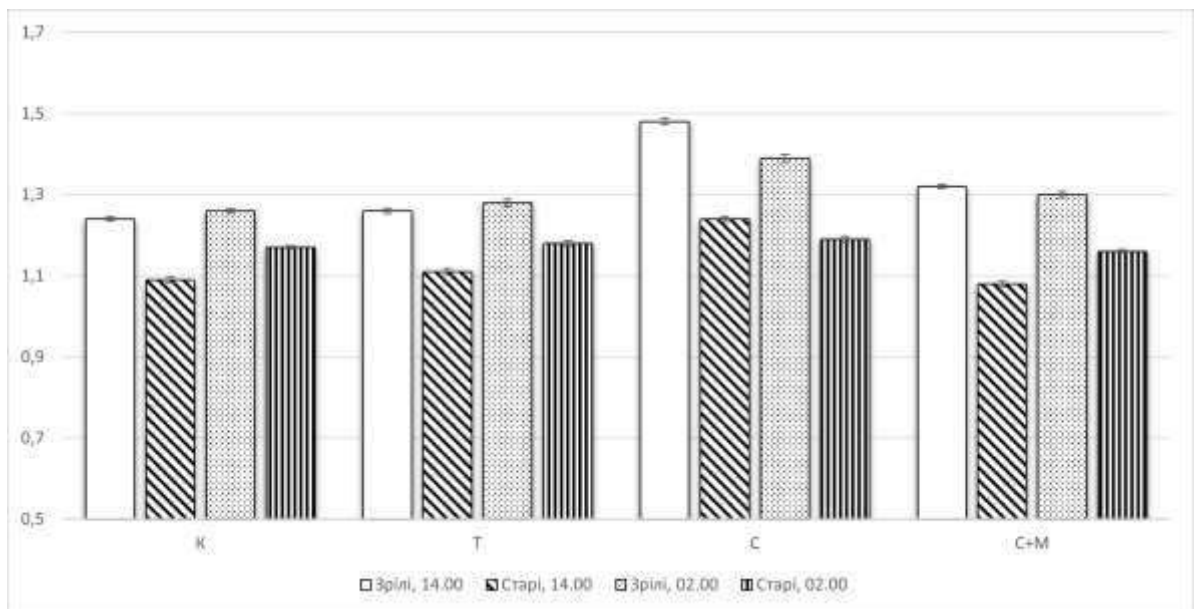


Рис. 5.34. Коефіцієнт R/B (комп'ютерна мікроспектрофотометрія) при застосуванні гістохімічної методики Mikel Calvo у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів за різного режиму освітлення.

Отже, проведені гістохімічні особливості протеїнів нейронів БПЯ гіпоталамуса дозволяють дійти висновку, що концентрація білків у зрілих щурів у середньому є вищою, ніж у старих щурів, а у їх складі переважають карбоксильні групи, що свідчить про високу інтенсивність обміну білків. Водночас, зміна режиму освітлення веде до порушення накопичення протеїнів та зміни у співвідношенні карбоксильних та аміногруп білків у нейронах БПЯ гіпоталамуса.

Зокрема, при світловій депривації у зрілих щурів концентрація білків та співвідношення між їх функціональними групами у середньому не змінюється,

однак у старих щурів має місце зниження кількості протеїнів у БПЯ гіпоталамуса. За умов світлової стимуляції у зрілих щурів спостерігається зростання концентрації білків та їх інтенсивності окиснювальної модифікації. Заразом, у старих щурів цілодобове освітлення веде до зниження концентрації протеїнів, однак спостерігається зростання коефіцієнту R/B, що можна тлумачити, як підвищення інтенсивності окиснювальної модифікації білків у нейронах БПЯ гіпоталамуса.

Введення екзогенного мелатоніну на тлі постійного освітлення веде до нормалізації концентрації білків та співвідношення карбоксильних та аміногруп білків у нейронах БПЯ гіпоталамуса.

Результати досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Булик РЄ, Йосипенко ВР, Волошин ВЛ. Особливості вікових змін окиснювальної модифікації білків у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів при цілодобовому освітленні. В: Матеріали міжнар. наук-практ. конф. Актуальні досягнення медичних наукових досліджень в Україні та країнах ближнього зарубіжжя; 2021 Жов 1-2; Київ. Київ: Київський медичний науковий центр; 2021, с. 5-7.

2. Булик РЄ, Йосипенко ВР, Кривчанська МІ. Показники окисної модифікації білків у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів при світловій стимуляції. In: Proceedings of 3rd International scientific and practical conference Topical issues of modern science, society and education; 2021 Oct 3-5; Kharkiv, Ukraine. Kharkiv: SPC-Sci-conf.com.ua; 2021, p. 135-6.

3. Bulyk R, Yosypenko V, Vlasova K, Voloshyn H. Effect of melatonin on indicators of oxide modification of proteins in neurons of the lateral preoptic nuclei of rat hypothalamus under light stress. In: Proceedings of XIV International Scientific and Practical Conference Theoretical foundations in practice and science; 2021 Dec 21-24; Bilbao, Spain. Bilbao; 2021, p. 257-9.

РОЗДІЛ 6

УЛЬТРАСТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ НЕЙРОНІВ БІЧНОГО ПЕРЕДЗОРОВОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА СТАРИХ ЩУРІВ ЗА РІЗНОГО РЕЖИМУ ОСВІТЛЕННЯ ТА ЗА УМОВ КОРЕКЦІЇ МЕЛАТОНІНОМ

У цьому розділі викладені результати електронномікроскопічного дослідження нейронів БПЯ гіпоталамуса за стандартного, зміненого режиму освітлення та уведення гормону ШЗ – мелатоніну. Критерієм активності нейронів БПЯ на морфологічному рівні є такі показники, як об'єм та форма ядер і ядерець, характер ядерної оболонки та міжмембранного простору, характер каріоплазми, стан органел, агранулярної та гранулярної ендоплазматичної сітки, комплексу Гольджі, мітохондрій та осміофільні включення.

Проведене електронномікроскопічне вивчення БПЯ гіпоталамуса експериментальних тварин контрольної групи о 14.00 год. виявило, що клітини містять ядра округлої або еліпсоїдної форми з чіткими контурами мембран каріолеми, що може утворювати неглибокі інвагінації, перинуклеарний простір не розширений. Каріоплазма електронноосвітла, містить невеликі грудки гетерохроматину та переважно одне невелике ядерце. В цитоплазмі містяться помірно розвинені каналці гранулярної ендоплазматичної сітки і цистерни комплексу Гольджі. Наявні мітохондрії із чітко контурованими кристами та помірно осміофільним матриксом (рис. 6.1). Визначаються рибосоми та полісоми в електронноосвітлій гіалоплазмі та секреторні гранули.

Досліджена ультраструктура нейронів БПЯ гіпоталамуса свідчить про їх помірний функціональний стан.

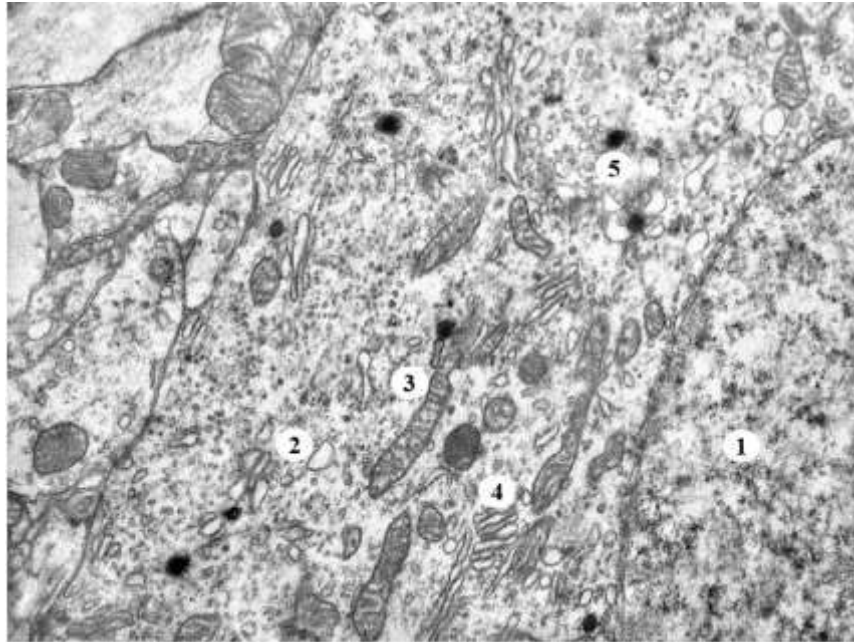


Рис. 6.1. Субмікроскопічний стан нейрона БПЯ гіпоталамуса старого щура за стандартного режиму освітлення о 14.00 год. Ядро (1), каналці ендоплазматичної сітки (2), мітохондрії (3), цистерни комплексу Гольджі (4), секреторні гранули (5). Електронна мікрофотографія. Оптичне збільшення $\times 14\ 000$

Вивченням субмікроскопічного стану БПЯ гіпоталамуса за стандартного режиму освітлення о 02.00 год., доведено, що нейрони містять ядра з нерівними контурами, інколи з досить глибокими вп'ячуваннями. Каріоплазма містить переважно еухроматин, біля каріолеми наявні невеликі грудки осміофільного гетерохроматину. Ядерця досить об'ємні, каріоплазма має гранули рибосомального типу. Нейроплазма містить добре розвинені каналці гранулярної ендоплазматичної сітки з фіксованими на їх мембранах рибосомами. Цистерни комплексу Гольджі перинуклеарно локалізовані, невеликі, проте виявляється багато везикул та мікропухирців, що характеризує процес синтезу секрету (рис. 6.2). Осміофільні секреторні гранули розміщені поодинокі в нейроплазмі. Мітохондрії округлі, невеликі, з помірно вираженими кристами. Вказана архітектоніка нейронів БПЯ гіпоталамуса свідчить про їх активацію у темний період доби.

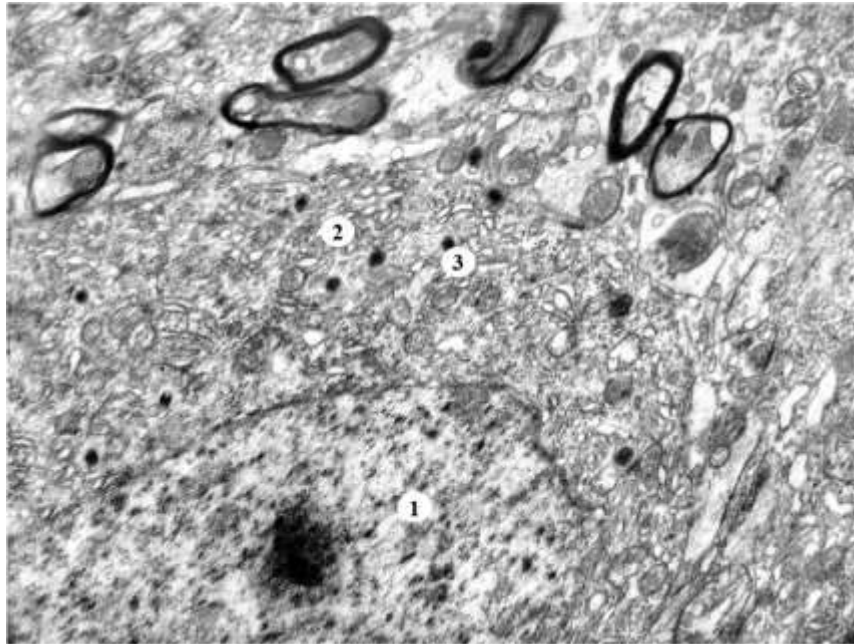


Рис. 6.2. Субмікроскопічний стан нейрона БПЯ гіпоталамуса старого щура за стандартного режиму освітлення о 02.00 год. Видовжене неправильної форми ядро (1), каналці гранулярної ЕПС і мікропухирці в нейроплазмі (2), секреторні гранули (3). Електронна мікрофотографія. Оптичне збільшення $\times 10\,000$

Субмікроскопічне вивчення БПЯ гіпоталамуса за умов світлової депривації о 14.00 год. встановило, що ядра клітин досить великі, містять великі ядерця з гранулярним та фібрилярним компонентом, глибокі інвагінації каріолеми, мембрани яких добре виражені, що включають чисельні ядерні пори. Вказані ознаки ультраструктури ядра свідчать про активацію синтетичних процесів у нейронах. В каріоплазмі переважає електронноосвітлий еухроматин, наявні невеликі маргінальні скупчення геторхроматину. Цитоплазма клітин містить протяжні каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, окремі з них розширені, частина мітохондрій гіпертрофовані, з просвітленим матриксом. Наявні чисельні мікропухирці, осміофільні секреторні гранули в нейроплазмі (рис. 6.3). Вказані ознаки ультраструктури ядра свідчать про активацію функціональної активності нейронів БПЯ гіпоталамуса.

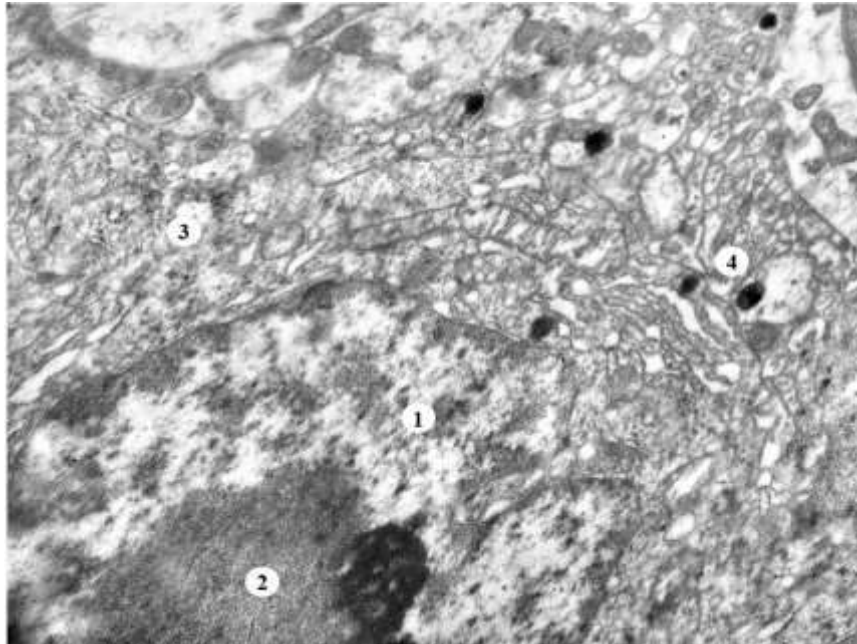


Рис. 6.3. Субмікроскопічна організація нейрона БПЯ гіпоталамуса старого щура за світлової депривації о 14.00 год. Велике ядро (1), з ядерцем (2), нейроплазма (3), секреторні гранули (4). Електронна мікрофотографія. Оптичне збільшення x12 000

В умовах світлової депривації о 02.00 год. ультраструктурно визначено нейрони, які мають просвітлену, нейро- та каріоплазму. Ядра клітин округлі, містять еухроматин, мало грудок осміофільного гетерохроматину, рідше визначалися ядерця, порівняно з попереднім терміном спостереження. В нейроплазмі наявні локально розширені каналці ендоплазматичної сітки, цистерни комплексу Гольджі слабо виражені, виявляється відносно мало мікропухирців та секреторних гранул. Мітохондрії вакуолізовані із просвітленим матриксом та фрагментованими кристами (рис. 6.4). Вказані ознаки ультраструктури клітин характеризують зниження функціональної спроможності нейронів БПЯ гіпоталамуса порівняно з попереднім часовим інтервалом експерименту.

Вивчення ультраструктури БПЯ гіпоталамуса о 14.00 год. за умов світлової стимуляції протягом 7 діб показало наявність “темних” нейронів. Виявлені клітини містять осміофільну каріо- та нейроплазму. Ядра клітин

пiкнотичнi, електроннощiльнi, мiстять вп'ячування карiолеми. Цитоплазма клiтин ущiльнена, в нiй погано визначаються органели, якi деструктивно змiненi. Секреторнi гранули погано контуруються.

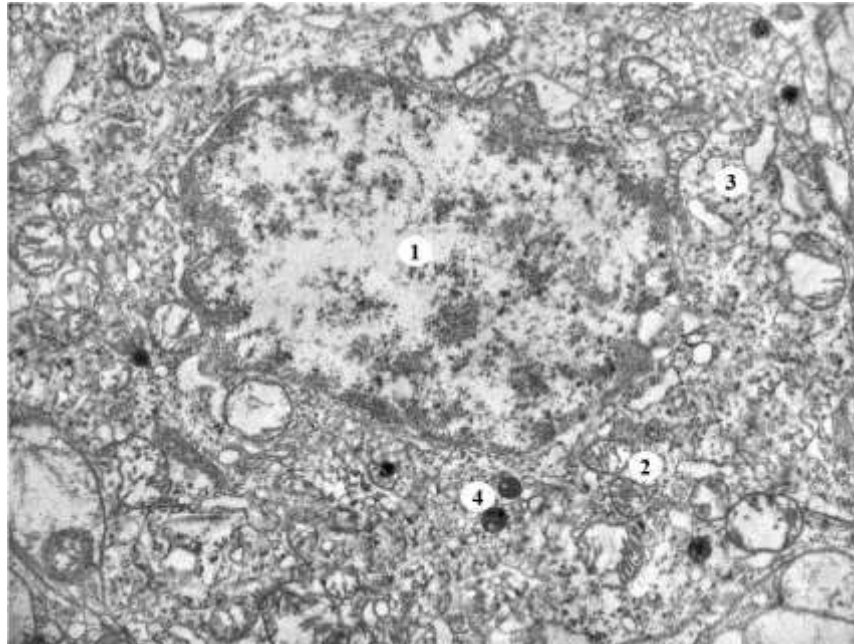


Рис. 6.4. Субмiкроскопiчна органiзацiя нейрона БПЯ гiпоталамуса старого щура за свiтлової депривацiї о 02.00 год. Ядро (1), гiпертрофованi мiтохондрiї (2), каналцi ендоплазматичної сiтки (3), осмiофiльнi гранули (4). Електронна мiкрофотографiя. Оптичне збiльшення $\times 11\ 000$

Окрiм “темних” нервових клiтин наявнi “свiтлi” – в яких визначаються округлої форми ядра, iх карiоплазма просвiтлена, у нiй розташовано небагато грудок гетерохроматину, карiолема мiстить локально просвiтлений перинуклеарний простiр. Цитоплазма таких клiтин включає розширенi каналцi гранулярної ендоплазматичної сiтки та цистерни комплексу Гольджi, з формуванням вакуолеподiбних структур. Мiтохондрiї також деструктивно змiненi, вакуолiзованi iз частково редукованими кристами, секреторних гранул небагато (рис. 6.5).

Такий субмiкроскопiчний стан свiдчить про низьку функцiональну активнiсть нейронiв БПЯ гiпоталамуса старих щурiв.

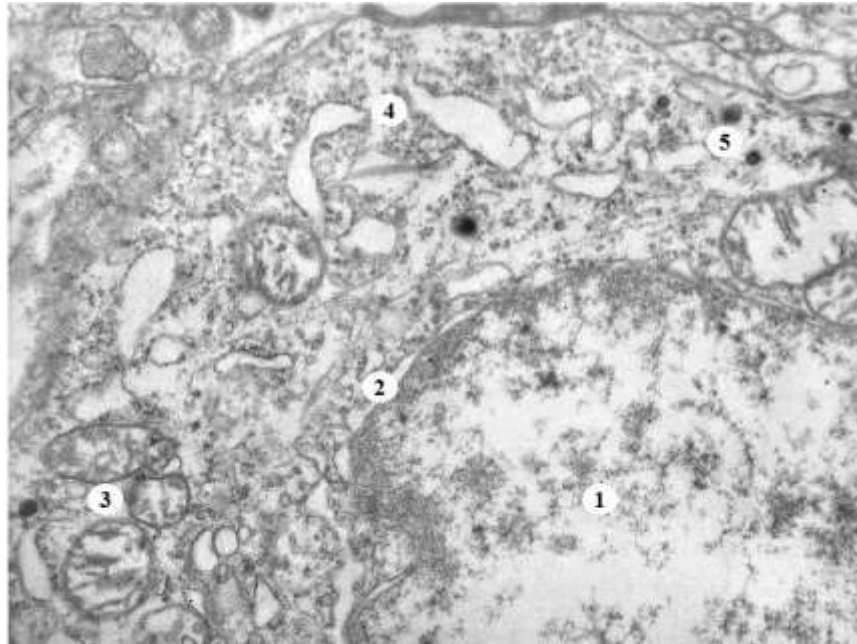


Рис. 6.5. Ультраструктурна організація нейрона БПЯ гіпоталамуса старого щура за світлової стимуляції о 14.00 год. Ядро (1), локально розширений перинуклеарний простір (2), гіпертрофовані мітохондрії (3), розширені каналці ендоплазматичної сітки (4), секреторні гранули (5). Електронна мікрофотографія. Оптичне збільшення $\times 16\ 000$

Вивчення ультраструктури БПЯ гіпоталамуса за умов світлової стимуляції о 02.00 год показали, що нейрони містять округлої форми ядра з електроннощільною каріоплазмою та нерівними контурами мембран каріолеми, що утворює глибокі інвагінації. Ядерця рідко визначалися. Гіалоплазма також ущільнена, визначаються каналці ендоплазматичної сітки, що локально розширені з утворенням світлих вакуолеподібних структур. Мітохондрії невеликі за розмірами або вакуолізовані, з просвітленим матриксом та редукованими кристами (рис. 6.6). Визначається мало мікропухирців та відповідно секреторних гранул.

Описана характеристика архітекτονіки нейронів БПЯ гіпоталамуса свідчить про пригнічення їх функціональної активності в цей часовий інтервал спостереження.

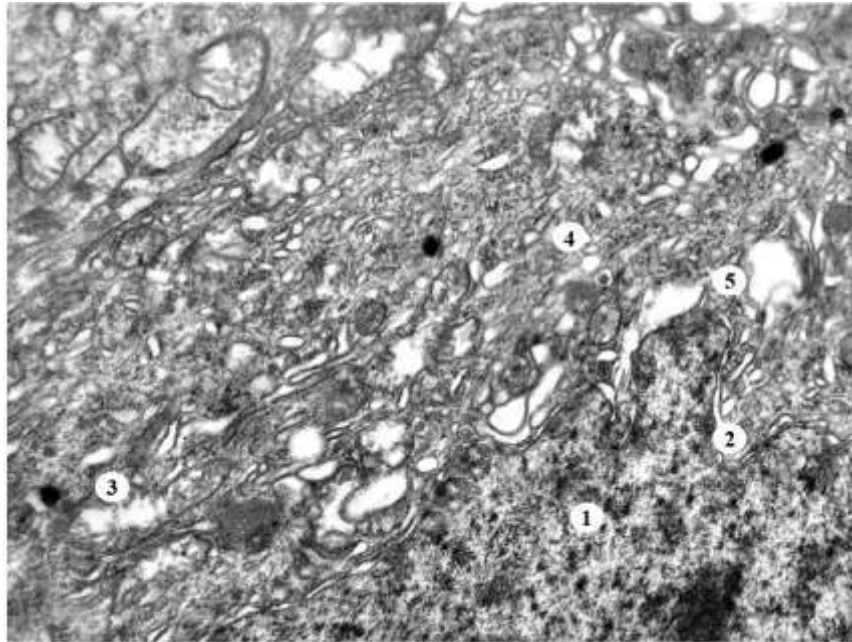


Рис. 6.6. Субмікроскопічна організація нейрона БПЯ гіпоталамуса старого щура за світлової стимуляції о 02.00 год. Ядро (1), з глибокими інвагінаціями каріолеми (2), змінені мітохондрії (3), каналці ендоплазматичної сітки (4), вакуолеподібні структури (5). Електронна мікрофотографія. Оптичне збільшення x12 000

Субмікроскопічне вивчення БПЯ гіпоталамуса тварин, які одержували екзогенний мелатонін за умов постійного освітлення, визначило, що о 14.00 год. наявні “світлі” і “темні” нейрони. Клітини містять ядра, які мають неправильну, округлу форму, неглибокі інвагінації, нечисельні ядерні пори, локально розширений перинуклеарний простір між мембранами каріолеми. Нервова клітина в стані напруження, в нейроплазмі добре розвинені каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, проте мало рибосом на їх мембранах. Цистерни комплексу Гольджі фрагментарно розширені (рис. 6.7). Мікропухирців небагато, секреторних гранул відповідно також, що імовірно пов’язано із недостатністю секреції або виведення гормону.

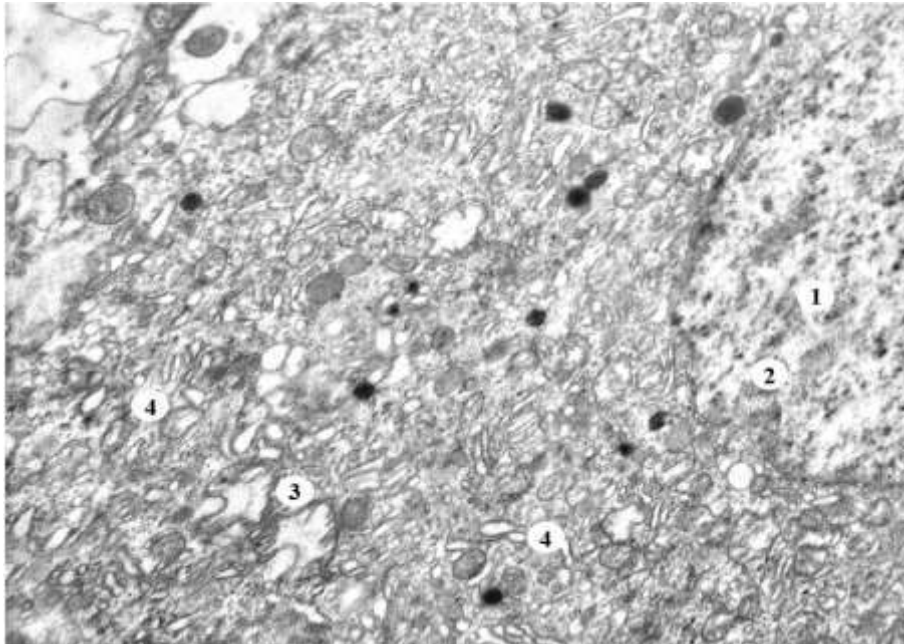


Рис. 6.7. Субмікроскопічна організація нейрона БПЯ гіпоталамуса старого щура за умов постійного освітлення та введення мелатоніну о 14.00 год. Ядро (1), з глибокими інвагінаціями каріолеми (2), змінені мітохондрії (3), каналці ендоплазматичної сітки (4). Електронна мікрофотографія. Оптичне збільшення $\times 12\,000$

Вивчення ультраструктурної організації нейронів БПЯ гіпоталамуса тварини о 02.00 год. за умов постійного освітлення та введення мелатоніну виявило, що еухроматинові ядра округлої неправильної форми, мають нечіткі контури мембран каріолеми, небагато ядерних пор (рис. 6.8). Канальці гранулярної ендоплазматичної сітки добре розвинені, локально розширені, мікропухирці чисельні, із гетерогенним вмістом, що пов'язано із утворенням секреторних гранул. Мітохондрії округлої і видовженої форми, частина з них гіпертрофовані, вакуолізовані, із редукованими кристами і просвітленим матриксом.

Такий стан нейронів БПЯ відповідає підвищеній функціональній активності порівняно з тваринами, яких утримували за умови світлової стимуляції й ін'єкцій мелатоніну не проводили.

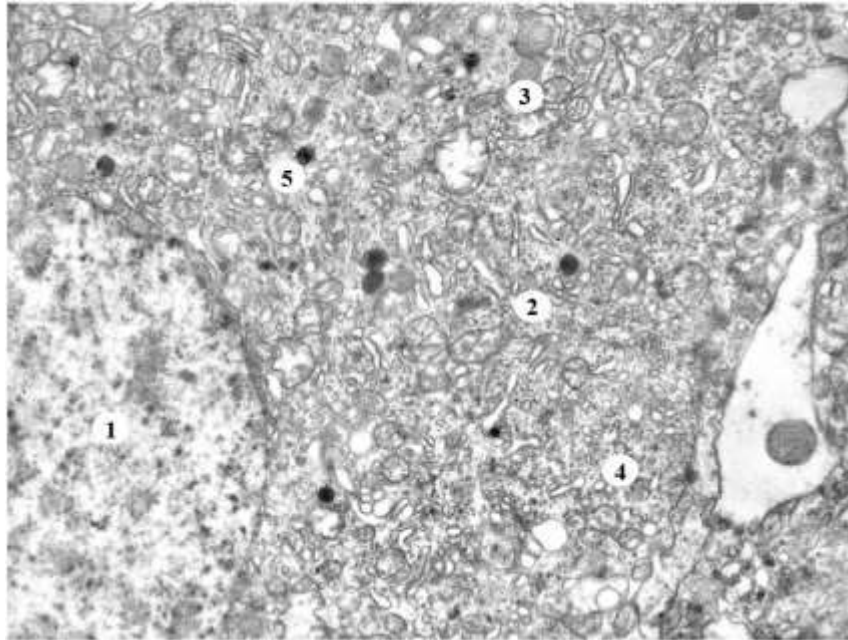


Рис. 6.8. Ультраструктурна організація нейрона БПЯ гіпоталамуса старого щура за умов постійного освітлення та введення мелатоніну о 02.00 год. Ядро (1), канальці ендоплазматичної сітки (2), мітохондрії (3), мікропухирці (4), невеликі секреторні гранули (5). Електронна мікрофотографія. Оптичне збільшення x12 000

Таким чином, отримані результати проведеного субмікроскопічного вивчення клітин БПЯ гіпоталамуса експериментальних тварин встановили їх відносно підвищену функціональну активність в темновий період доби. Зміна режиму освітлення веде до порушення архітектоніки нейронів БПЯ, що проявляється вираженими гіпертрофічними та початковими деструктивними змінами ядер і органел нейронів БПЯ гіпоталамуса. Більш істотні ультрамікроскопічні зміни структурної організації нейронів БПЯ гіпоталамуса спостерігали у щурів, що перебували за умов світлової стимуляції, ніж при світловій депривації, що підтверджується зміною ультраструктури нервових клітин о 02.00 год. та появою “темних” клітин.

За умов використання екзогенного мелатоніну на тлі цілодобового освітлення встановлено відносну нормалізацію субмікроскопічного стану нервових клітин БПЯ гіпоталамуса, однак ультраструктура органел

синтетичного та енергетичного забезпечення були в стані виснаження на тлі тривалого світлового періоду.

Результати досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Йосипенко ВР, Булик РЄ, Кривчанська МІ, Лукань ЮР. Ультраструктурна організація нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса старих щурів за різних умов освітлення. Клінічна та експериментальна патологія. 2021;20(3):28-33. doi: [10.24061/1727-4338.XX.3.77.2021.4](https://doi.org/10.24061/1727-4338.XX.3.77.2021.4)

2. Йосипенко ВР, Булик РЄ. Вплив модифікацій фотоперіоду на ультраструктурний стан нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса старих щурів. In: Proceedings of V International Scientific and Practical Conference Science, innovations and education: problems and prospects; 2021 Dec 8-10; Tokyo, Japan. Tokyo; 2021, p. 167-9.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Результатом природної адаптації та синхронізації діяльності людського організму з навколишнім середовищем є біологічні ритми, що існують на багатьох рівнях організації живої матерії – від молекулярного до організмового [4 - 6]. Добовій періодичності підпорядковуються більшість функцій нашого організму. Зокрема, біоритми впливають на метаболізм, біохімічні, ендокринні та гематологічні показники, на частоту та глибину дихання, серцебиття та артеріальний тиск, температуру тіла, тощо [10, 16]. Ці ритми є ендогенними та пов'язані зі циклічною зміною дня і ночі [4], а ендокринним посередником є мелатонін [197]. Найбільш очевидний добовий ритм, який спостерігається у людей і багатьох тварин – цикл сон-неспанья [8]. Важливим компонентом у регуляції циклу сон-неспанья є БПЯ гіпоталамуса [66].

На основі проведених нами гістологічних досліджень, можна стверджувати, що розташування БПЯ гіпоталамуса є асиметричним, одно з них знаходиться трохи попереду іншого.

Тривалість фотоперіоду по-різному впливає на морфо-функціональну активність ядер гіпоталамуса. Зокрема, аналіз морфометричних показників нейронів НПЯ гіпоталамуса виявив їх добові коливання. Так, порівнюючи з денним періодом (14.00 год.), у темновий період доби (до 02.00 год.) спостерігали вірогідне збільшення площі тіла нейронів НПЯ на $7,8 \pm 1,4\%$ внаслідок збільшення площі ядра клітин. Отримані дані свідчать про помірне підвищення функціональної активності нейронів НПЯ щурів у темновий період доби [35].

Світлова депривація вдень – знижує, а вночі – підвищує морфофункціональну активність нейронів НПЯ гіпоталамуса. Зокрема, морфометрично це проявляється зниженням площі нейрона на $21,89 \pm 3,26\%$, що зумовлено зменшенням площі його ядра на $25,67 \pm 4,01\%$ та цитоплазми –

на $16,38 \pm 2,12\%$. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення становило $1,52 \pm 0,018$ од, питомий об'єм ядра нейрона – $60,30 \pm 0,679\%$, а цитоплазми – $39,70 \pm 0,561\%$ від загального об'єму клітини [7]. Водночас, світлова депривація викликає збільшення площі нейронів, їх ядер, ядерця у нейронах надзорних ядер гіпоталамуса щурів у нічний та денний інтервали спостереження [198].

За умов світлової стимуляції у тварин зменшувалися площі нейрона, його цитоплазми, ядра та ядерця як о 14.00 год, так і о 02.00 год. порівняно з аналогічними величинами в інтактних щурів. Потрібно також відзначити той факт, що у щурів, які зазнали тривалої експозиції світлом, істотно порушувався добовий ритм морфофункціональної активності нейронів НПЯ [35].

Хоча тривале освітлення є значним стресором і пусковим чинником розвитку десинхронозу, однак це мало стосується медіального дрібноклітинного суб'ядра ПШЯ. Дослідники вказують на відсутність ознак підсилення функціональної активності структур ПШЯ та вірогідних різниць площі нейронів і його компонентів при постійному та стандартному режимі освітлення [199].

Дані нашого дослідження вказують на те, що морфометричні показники (об'єм нейронів, їх ядер та ядерно-цитоплазматичне співвідношення) не реагували ні на умови освітлення, ні на час доби, коли моделювалися відповідні умови експерименту. Однак, існує вірогідна різниця по вказаних параметрах між зрілими та старими щурами.

За стандартного світлового режиму середній об'єм нейронів у зрілих щурів складав: о 14.00 год. – $1148 \pm 12,9$ мкм³, а о 02.00 год. – $1151 \pm 12,1$ мкм³. Тоді як у старих щурів, за аналогічного освітлення, цей показник становив: о 14.00 год. - $1007 \pm 11,6$ мкм³, а о 02. 00 год. - $1011 \pm 10,2$ мкм³ ($p < 0,001$). Різниця між показниками середнього об'єму ядер нейронів була несуттєвою. У зрілих щурів о 14.00 год. цей показник перебував у межах $424 \pm 10,2$ мкм³, о 02.00 год. – $426 \pm 10,0$ мкм³. У старих щурів – о 14.00 год. – $422 \pm 10,7$ мкм³, о 02.00 год. –

425±10,2 мкм³. Привертало увагу зростання ядерно-цитоплазматичного співвідношення в нейронах у старих щурів щодо зрілих. Зокрема, у зрілих щурів цей показник о 14.00 год. становив 0,369±0,0028, а о 02.00 год. – 0,370±0,0025, в той час як у старих щурів о 14.00 год. він перебував в межах 0,419±0,0031, а о 02.00 год. – 0,420±0,0034 (p<0,001).

Отже, проведені гістологічні дослідження БПЯ гіпоталамуса показали, що у старих щурів у порівнянні зі зрілими щурами знижується об'єм нейронів за рахунок зменшення об'єму їх цитоплазми з відповідним зростанням ядерно-цитоплазматичного співвідношення (ядерно-цитоплазматичного коефіцієнту).

З віком спостерігається зменшення кількості нейронів БПЯ, що може бути однією із причин порушення сну у літніх людей [62]. Наші дослідження підтверджують суттєве зниження (близько 30%) в старих щурів у порівнянні зі зрілими щурами середньої кількості нейронів на одиниці площі 10 000 мкм² гістологічного зрізу (100x100 мкм²). У зрілих щурів середня кількість нейронів складала о 14.00 год. – 24±0,3, а о 02.00 год. – 23±0,4, а у старих щурів середня кількість нейронів о 14.00 год. становила – 16±0,2, о 02.00 год. – 16±0,3 (p<0,001).

За умов світлової депривації всі тенденції, які описані для щурів, яких утримували за звичайного світлового режиму збереглися: середній об'єм нейронів у зрілих щурів складав: о 14.00 год. – 1143±12,6 мкм³, а о 02.00 год. – 1145±12,4 мкм³. Тоді як у старих щурів, цей показник становив: о 14.00 год. – 1002±11,1 мкм³, а о 02.00 год. – 1010±10,3 мкм³ (p<0,001). У зрілих щурів о 14.00 год. показник середнього об'єму ядер нейронів перебував у межах 423±10,5 мкм³, о 02.00 год. – 424±10,3 мкм³. У старих щурів – о 14.00 год. – 420±10,9 мкм³, о 02.00 год. – 423±10,5 мкм³. Так само спостерігали зростання ядерно-цитоплазматичного співвідношення в нейронах у старих щурів щодо зрілих. Зокрема, у зрілих щурів цей показник о 14.00 год. становив 0,370±0,0027, а о 02.00 год. – 0,370±0,0026, в той час як у старих щурів о 14.00 год. він перебував в межах 0,419±0,0032, а о 02.00 год. – 0,419±0,0029 (p<0,001). У зрілих щурів середня кількість нейронів на одиниці площі 10 000

мкм² гістологічного зрізу складала о 14.00 год. – $22 \pm 0,6$, а о 02.00 год. – $22 \pm 0,5$, а у старих щурів середня кількість нейронів о 14.00 год. становила – $15 \pm 0,3$, о 02.00 год. – $16 \pm 0,4$ ($p < 0,001$). Розбіжностей у середніх тенденціях у щурів за умов світлової депривації у порівнянні зі щурами, яких утримували за звичайного світлового режиму не виявлено ($p > 0,05$).

Так само вказані тенденції збереглися і за умов світлової стимуляції та за умов світлової стимуляції й уведення мелатоніну. Зокрема, в умовах цілодобового освітлення середній об'єм нейронів у зрілих щурів складав: о 14.00 год. – $1152 \pm 12,7$ мкм³, а о 02.00 год. – $1150 \pm 12,7$ мкм³. Тоді як у старих щурів, цей показник становив: о 14.00 год. – $1006 \pm 11,0$ мкм³, а о 02.00 год. – $1004 \pm 10,9$ мкм³ ($p < 0,001$). У зрілих щурів о 14.00 год. показник середнього об'єму ядер нейронів перебував у межах $422 \pm 10,6$ мкм³, о 02.00 год. – $425 \pm 10,3$ мкм³. У старих щурів – о 14.00 год. – $423 \pm 10,0$ мкм³, о 02.00 год. – $424 \pm 10,6$ мкм³. Зростало й ядерно-цитоплазматичного співвідношення в нейронах у старих щурів щодо зрілих. Зокрема, у зрілих щурів цей показник о 14.00 год. становив $0,366 \pm 0,0029$, а о 02.00 год. – $0,369 \pm 0,0021$, в той час як у старих щурів о 14.00 год. він перебував в межах $0,420 \pm 0,0021$, а о 02.00 год. – $0,422 \pm 0,0022$ ($p < 0,001$). У зрілих щурів середня кількість нейронів на одиниці площі 10 000 мкм² гістологічного зрізу складала о 14.00 год. – $25 \pm 0,5$, а о 02.00 год. – $23 \pm 0,3$, а у старих щурів середня кількість нейронів о 14.00 год. становила – $15 \pm 0,4$, о 02.00 год. – $17 \pm 0,4$ ($p < 0,001$).

Водночас, при уведенні екзогенного мелатоніну щурам, які утримувалися 7 діб при цілодобовому освітленні середній об'єм нейронів у зрілих щурів складав: о 14.00 год. – $1149 \pm 12,7$ мкм³, а о 02.00 год. – $1150 \pm 11,9$ мкм³. Тоді як у старих щурів, цей показник становив: о 14.00 год. – $1009 \pm 11,2$ мкм³, а о 02.00 год. – $1008 \pm 10,4$ мкм³ ($p < 0,001$). У зрілих щурів о 14.00 год. показник середнього об'єму ядер нейронів перебував у межах $424 \pm 10,2$ мкм³, о 02.00 год. – $426 \pm 10,0$ мкм³. У старих щурів – о 14.00 год. – $421 \pm 10,2$ мкм³, о 02.00 год. – $423 \pm 10,0$ мкм³. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення в нейронах зростало у старих щурів щодо зрілих. Зокрема, у зрілих щурів цей

показник о 14.00 год. становив $0,369 \pm 0,0024$, а о 02.00 год. – $0,370 \pm 0,0027$, в той час як у старих щурів о 14.00 год. він перебував в межах $0,417 \pm 0,0028$, а о 02.00 год. – $0,419 \pm 0,0022$ ($p < 0,001$). У зрілих щурів середня кількість нейронів на одиниці площі $10\ 000\ \mu\text{м}^2$ гістологічного зрізу складала о 14.00 год. – $26 \pm 0,4$, а о 02.00 год. – $25 \pm 0,5$, а у старих щурів середня кількість нейронів о 14.00 год. становила – $16 \pm 0,4$, о 02.00 год. – $15 \pm 0,6$ ($p < 0,001$).

Результати цих досліджень диктують пошуки інших морфологічних методів дослідження, які здатні виявити реакцію нейронів БПЯ гіпоталамуса на зміни режиму освітлення.

Одним із таких методів є гістохімічний аналіз забарвлення на тигроїдну субстанцію нейронів БПЯ гіпоталамуса за методом Нісля в модифікації. Щільність тигроїдної субстанції дозволяє визначити функціональну активність нейрона, а розпорошення та зменшення цієї речовини відбиває глибокі дистрофічні зміни нейронів [200].

Нами виявлено, що кількість тигроїдної субстанції у зрілих щурів у середньому є вищою, ніж у старих щурів. Зокрема, оптична густина імуногістохімічного забарвлення на тигроїдну субстанцію зрілих щурів за стандартного світлового режиму перебувала в межах $0,258 \pm 0,0019$ од.опт.густини о 14.00 год. і $0,263 \pm 0,0017$ од.опт.густини о 02.00 год. Тоді як в старих щурів цей показник становив $0,214 \pm 0,0017$ од.опт.густини о 14.00 год. і $0,216 \pm 0,0018$ од.опт.густини о 02.00 год. ($p < 0,001$).

Однак, коли тигроїдна субстанція нейронів БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів не реагує на зміни режиму освітлення, то у старих щурів вона характерно змінюється.

При цілодобовій темряві спостерігали зростання кількості речовини тигроїдної субстанції у нейронах БПЯ гіпоталамуса старих щурів. Оптична густина забарвлення на тигроїдну субстанцію при цьому о 14.00 год. перебувала в межах $0,257 \pm 0,0022$ од.опт.густини, а о 02.00 год. – $0,264 \pm 0,0021$ од.опт.густини. Разом з тим, у старих щурів, цей показник о 14.00 год.

становив $0,234 \pm 0,0021$ од.опт.густини, а о 02.00 год. – $0,253 \pm 0,0024$ од.опт.густини ($p < 0,001$).

При цілодобовому освітленні у старих щурів спостерігали суттєве зменшення кількості речовини тигроїдної субстанції нейронів БПЯ гіпоталамуса. Так, оптична густина імуногістохімічного забарвлення на тигроїдну субстанцію зрілих щурів о 14.00 год. перебувала в межах $0,252 \pm 0,0020$ од.опт.густини, а о 02.00 год. – $0,259 \pm 0,0024$ од.опт.густини. Водночас, у старих щурів, цей показник о 14.00 год. становив $0,183 \pm 0,0018$ од.опт.густини, а о 02.00 год. – $0,192 \pm 0,0019$ од.опт.густини ($p < 0,001$).

Важливим є те, що мелатонін здатний підвищувати кількість тигроїдної субстанції у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів. При введенні мелатоніну щурам, які знаходилися за умов світлової стимуляції відмічали суттєве зростання оптичної густини гістохімічного забарвлення на тигроїдну субстанцію до рівня контрольної групи. У зрілих щурів показник о 14.00 год. становив $0,259 \pm 0,0023$ од.опт.густини, а о 02.00 год. – $0,262 \pm 0,0019$ од.опт.густини. У старих щурів – $0,209 \pm 0,0019$ од.опт.густини о 14.00 год. та $0,211 \pm 0,0022$ од.опт.густини о 02.00 год. ($p < 0,001$).

Українськими вченими останніми роками ретельно досліджується щільність МР у структурах головного мозку, що залучені до часової організації [201]. Зокрема, вивчали щільність розташування МР типу 1А у пришлуночкових та супраоптичних ядрах гіпоталамуса щурів за стандартного, зміненого режиму освітлення та уведення екзогенного мелатоніну. Згідно досліджень щільність МР типу 1А у вказаних структурах за стандартного режиму освітлення відзначалася чіткими добовими коливаннями, де найвищі показники спостерігали о 02.00 год. Зміна режиму освітленості призвела до вираженого десинхронозу добових коливань досліджуваної щільності МР типу 1А. За умов світлової депривації щільність МР була стабільно високою, порівняно з контрольним показником. За умов світлової стимуляції показник щільності МР суттєво знижується. [202, 203].

Нами також встановлено чимало залежностей між часом доби, режимом освітлення та щільністю МР у нейронах БПЯ гіпоталамуса. Зокрема, добові коливання оптичної густини (щільності) МР типу 1А в нейронах БПЯ гіпоталамуса характеризуються чітким циркадіанним ритмом, з найвищими показниками о 02.00 год., тоді як о 14.00 год. вона знижується ($p < 0,001$). Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на МР 1А при цьому становить $0,264 \pm 0,0016$ од.опт.густини, в той час як оптична густина МР 1А о 14.00 год. становить $0,248 \pm 0,0018$ од.опт.густини.

Важливо також відзначити, що з віком кількість МР в органах і тканинах знижується [55], що також доводять результати наших досліджень. У старих щурів щільність МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса є нижчою, ніж у зрілих тварин ($p < 0,001$). Так оптична щільність МР 1А у нейронах БПЯ старих щурів о 02.00 год. складає $0,216 \pm 0,0013$ од.опт.густини, в той час як о 14.00 год. вона становить $0,211 \pm 0,0014$ од.опт.густини. Це може бути пов'язано із зниженням загальної кількості пінеалоцитів, розвитком склерозу шишкоподібної залози [120] і, як наслідком, зниження концентрації мелатоніну з віком [43].

Модифікація режиму освітлення веде до зміни показників оптичної густини МР типу 1А в нейронах БПЯ гіпоталамуса. Зокрема, світлова депривація веде до зростання середнього рівня величин досліджуваних структур, як у зрілих, так і у старих щурів ($p < 0,001$). Показник позитивно забарвлених нейронів БПЯ на МР типу 1А при цьому о 02.00 год. становив $0,298 \pm 0,0017$ од. опт. густини, тоді як о 14.00 год. показник сягав $0,280 \pm 0,0019$ од. опт. густини. Дані оптичної густини МР 1А у нейронах БПЯ старих щурів, які перебували за умов цілодобової темряви складала о 02.00 год. – $0,234 \pm 0,0010$ од. опт. густини, о 14.00 год. – $0,267 \pm 0,0016$ од. опт. густини. Водночас, світлова стимуляція призводить до зниження щільності МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих та старих щурів. Параметри оптичної щільності МР типу 1А у зрілих щурів перебували у межах: о 02.00 год. – $0,182 \pm 0,0017$ од. опт. густини, о 14.00 год. – $0,180 \pm 0,0018$ од. опт. густини.

Однак, якщо циркадіанний ритм досліджуваних структур за умов світлової стимуляції зберігається у зрілих щурів, то інтенсивність щільності МР типу 1А в старих щурів о 02.00 год. є парадоксально меншою, ніж о 14.00 год. Показники оптичної щільності МР типу 1А старих тварин, які цілодобово перебували під постійним освітленням становили: о 02.00 год. – $0,132 \pm 0,0012$ од. опт. густини, о 14.00 год. – $0,148 \pm 0,0013$ од. опт. густини.

Задля корекції виявлених відхилень щільності МР типу 1А, що викликані тривалим перебуванням щурів за умов світлової експозиції використовували мелатонін у дозі 0,5 мкг/кг маси тіла тварини [202]. При введенні екзогенного мелатоніну на тлі постійного освітлення спостерігали вірогідне ($p < 0,001$) підвищення середніх величин щільності МР типу 1А у нейронах БПЯ гіпоталамуса, щодо тварин, яким на тлі світлового стресу ін'єкції препарату не проводили. Показник оптичної щільності МР типу 1А у зрілих щурів при цьому о 02.00 год. становив $0,275 \pm 0,0015$ од. опт. густини, тоді як о 14.00 год. показник сягав $0,249 \pm 0,0017$ од. опт. густини. Однак, у старих щурів досягти рівня тварин, що утримувалися за стандартного режиму освітлення не вдалося ні о 02.00 ні о 14.00 год. Дані оптичної густини МР типу 1А у нейронах БПЯ старих щурів, які перебували за умов цілодобового освітлення та уведення мелатоніну складала о 02.00 год. – $0,198 \pm 0,0013$ од. опт. густини, о 14.00 год. – $0,141 \pm 0,0010$ од. опт. густини.

Відповідно до того, що МР поділяють на два основних типи: мелатонінові рецептори 1-го типу (МРТ1) та 2-го типу (МРТ2) [88], а у головному мозку ссавців, у тому числі і людини, переважають рецептори типу 1А та 1В МРТ1 [90] нами вперше було також проведено дослідження щільності МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса.

Добові коливання оптичної густини (щільності) МР типу 1В в нейронах БПЯ гіпоталамуса чітко підпорядковуються циркадіанним ритмам. Найвищі показники зареєстровані о 02.00 год., тоді як о 14.00 год. вони знижуються ($p_1 < 0,001$). Показники оптичної щільності МР типу 1В у зрілих щурів перебували у межах: о 02.00 год. – $0,263 \pm 0,0016$ од. опт. густини, о 14.00 год.

– $0,246 \pm 0,0017$ од. опт. густини. Онтогенетичною особливістю оптичної густини специфічного забарвлення на МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса є те, що у старих щурів даний показник є нижчим, ніж у зрілих тварин ($p < 0,001$). Так, оптична щільність МР 1В у нейронах БПЯ старих щурів о 02.00 год. складає $0,218 \pm 0,0015$ од. опт. густини, в той час як о 14.00 год. вона становить $0,202 \pm 0,0010$ од. опт. густини.

Цілодобова темрява призводить до підвищення середнього рівня оптичної густини (щільності) мелатонінових рецепторів типу 1В в нейронах БПЯ як у зрілих, так і у старих щурів ($p < 0,001$). Показник позитивно забарвлених нейронів БПЯ на МР типу 1В при цьому о 02.00 год. становив $0,289 \pm 0,0018$ од. опт. густини, тоді як о 14.00 год. показник сягав $0,266 \pm 0,0017$ од. опт. густини. Дані оптичної густини МР типу 1В у нейронах БПЯ старих щурів, які перебували за умов цілодобової темряви склали о 02.00 год. – $0,239 \pm 0,0011$ од. опт. густини, о 14.00 год. – $0,212 \pm 0,0013$ од. опт. густини. Заразом, світлова стимуляція супроводжується пригніченням синтезу і секреції мелатоніну [156], веде до розвитку десинхронозу [83] та зниження щільності МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих та старих щурів ($p < 0,001$). Показник оптичної щільності МР типу 1В у зрілих щурів за умов цілодобового освітлення о 02.00 год. становив $0,162 \pm 0,0019$ од. опт. густини, тоді як о 14.00 год. показник сягав $0,169 \pm 0,0017$ од. опт. густини. Дані оптичної густини МР типу 1В у нейронах БПЯ старих щурів, які перебували за умов цілодобового освітлення склали о 02.00 год. – $0,134 \pm 0,0010$ од. опт. густини, о 14.00 год. – $0,133 \pm 0,0015$ од. опт. густини. Цікавим є той факт, що у зрілих щурів циркадіанний ритм досліджуваних структур за умов світлової МР типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса в старих щурів нами не виявлено.

Серед описаних ефектів, якими володіє гормон шишкоподібної залози – мелатонін слід зазначити його участь у регуляції добової ритмічної активності [204]. Введення екзогенного мелатоніну за умови постійного освітлення веде до підвищення середніх величин щільності рецепторів до мелатоніну типу 1В у нейронах БПЯ гіпоталамуса ($p < 0,001$). Показник оптичної щільності МР

типу 1В у зрілих щурів при цьому о 02.00 год. становив $0,262 \pm 0,0014$ од. опт. густини, тоді як о 14.00 год. показник сягав $0,240 \pm 0,0016$ од. опт. густини. Однак, у старих щурів досягти рівня тварин, що утримувалися за стандартного режиму освітлення не вдалося ні о 02.00 ні о 14.00 год. Дані оптичної густини МР типу 1В у нейронах БПЯ старих щурів, які перебували за умов цілодобового освітлення та уведення мелатоніну складали о 02.00 год. – $0,167 \pm 0,0012$ од. опт. густини, о 14.00 год. – $0,145 \pm 0,0012$ од. опт. густини.

Проведені імуногістохімічні дослідження дозволили дійти до висновку, що рецептори до мелатоніну типу 1А та 1В в нейронах БПЯ гіпоталамуса проявляють в основному подібні тенденції щодо реакції на умови освітлення. Зокрема, як у зрілих так і у старих щурів підвищується інтенсивність імуногістохімічного забарвлення на МР типу 1А та 1В за умов світлової депривації ($p < 0,001$), але знижується за умов світової стимуляції ($p < 0,001$). Вона є завжди вищою на період 02.00 год. у порівнянні з 14.00 год. У старих щурів інтенсивність імуногістохімічного забарвлення на МР типу 1А та 1В в нейронах БПЯ гіпоталамуса завжди є нижчою, ніж у зрілих щурів ($p < 0,001$).

Уведення екзогенного мелатоніну підвищує інтенсивність імуногістохімічного забарвлення на МР типу 1А та 1В в нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих та старих щурів ($p < 0,001$).

В літературі описано, що деякі білки можуть бути ключовим біохімічним маркером функціональної активності клітин нервової системи. Вони беруть участь у проліферації та диференціації нервових і гліальних клітин, залучаються до організації багатьох метаболічних та імунних функцій головного мозку [205].

Вперше за допомогою сучасних досліджень нами було встановлено концентрацію протеїнів у нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих і старих щурів за стандартного і зміненого режиму освітлення та уведення мелатоніну. Так, нами доведено, що оптична густина специфічного забарвлення на білок у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів у зрілих щурів у середньому суттєво перевищує показники старих щурів ($p < 0,001$). Водночас, необхідно відмітити,

що в обох вікових категоріях немає різниці між різними періодами доби (14.00 та 02.00 год.). Зокрема, оптична густина гістохімічного забарвлення на білок у нейронах БПЯ за стандартного режиму освітлення у зрілих щурів о 14.00 год. становила $0,274 \pm 0,0017$ од.опт.густини, а о 02.00 год. – $0,271 \pm 0,0016$ од.опт.густини. За аналогічних умов експерименту оптична густина гістохімічного забарвлення на білок у нейронах БПЯ у старих щурів о 14.00 год. перебувала у межах $0,222 \pm 0,0014$ од.опт.густини, а о 02.00 год. – $0,221 \pm 0,0013$ од.опт.густини ($p < 0,001$).

Варто вказати, що зміна режиму освітлення по-різному впливає на показники оптичної густини специфічного забарвлення на білок у нейронах БПЯ гіпоталамуса щурів. Зокрема, за умов світлової депривації, оптична густина специфічного забарвлення на білок у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів у середньому не змінюється незалежно від періоду доби, тоді, коли у старих щурів у середньому інтенсивність забарвлення на білок в нейронах БПЯ гіпоталамуса знижується ($p < 0,001$). Показники оптичної густини гістохімічного забарвлення на білок у нейронах БПЯ за умов цілодобової темряви у зрілих щурів становили о 14.00 год. $0,273 \pm 0,0018$ од.опт.густини, а о 02.00 год. – $0,276 \pm 0,0015$ од.опт.густини. Разом з тим, у старих щурів параметри оптичної густини гістохімічного забарвлення на білок у нейронах БПЯ складали о 14.00 год. – $0,208 \pm 0,0016$ од.опт.густини, а о 02.00 год. – $0,214 \pm 0,0015$ од.опт.густини ($p < 0,001$).

Світлова експозиція призводить до зростання середньої інтенсивності забарвлення на білок в нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих щурів, тоді, коли у старих щурів, навпаки, спостерігається зниження середньої інтенсивності забарвлення на білок в нейронах БПЯ гіпоталамуса ($p < 0,001$). Дані оптичної густини гістохімічного забарвлення на білок у нейронах БПЯ за умов цілодобового освітлення у зрілих щурів становили о 14.00 год. $0,321 \pm 0,0017$ од.опт.густини, а о 02.00 год. – $0,326 \pm 0,0014$ од.опт.густини. Однак, у старих щурів показники оптичної густини гістохімічного забарвлення на білок у

нейронах БПЯ складали о 14.00 год. – $0,198 \pm 0,0016$ од.опт.густини, а о 02.00 год. – $0,196 \pm 0,0017$ од.опт.густини ($p < 0,001$).

Уведення екзогенного мелатоніну щурам, які знаходились в умовах постійного освітлення суттєво покращує процеси накопичення протеїнів у нейронах БПЯ гіпоталамуса як зрілих так і старих щурів, причому це не залежить від періоду доби. Так, оптична густина гістохімічного забарвлення на білок у нейронах БПЯ за світлової стимуляції та введення мелатоніну у зрілих щурів о 14.00 год. становила $0,272 \pm 0,0019$ од.опт.густини, а о 02.00 год. – $0,269 \pm 0,0020$ од.опт.густини. За аналогічних умов експерименту оптична густина гістохімічного забарвлення на білок у нейронах БПЯ у старих щурів о 14.00 год. перебувала у межах $0,220 \pm 0,0016$ од.опт.густини, а о 02.00 год. – $0,218 \pm 0,0015$ од.опт.густини ($p < 0,001$).

Дослідження попередніх років дозволяють стверджувати, що активація системи вільнорадикального окиснення та її окремих проявів, зокрема, окиснювальної модифікації білків, відіграє роль неспецифічного патогенетичного ланцюга у формуванні багатьох патологій в організмі людини. Посилення цих процесів призводить до порушення рівноваги між анти- та прооксидантами у бік підвищення останніх, що веде до розвитку оксидативного стрес, який супроводжується збільшенням АФК [206]. Встановлено, що в стані окислювального стресу АФК атакують, в першу чергу, білки [207]. Незворотнім окислювальним пошкодженням білків, що ведуть до втрати їх функцій, є карбонілювання [208], що призводить зміни співвідношення між аміно- та карбоксильними групами в них. Це співвідношення в клітинах можна оцінити за допомогою коефіцієнту R/B при якому "кислі" та "основні" білки забарвлюються в різні кольори. [209]. Також доведено, що продукти окиснювальної модифікації білків володіють цитопатичною дією та мають пряме відношення до механізмів токсичної загибелі клітини [207].

Результати наших досліджень, дозволили дійти висновку, що коефіцієнт R/B в нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів у середньому є значно вищим,

ніж у старих щурів ($p < 0,001$). Коефіцієнт R/V при цьому у зрілих щурів о 14.00 год. становив $1,24 \pm 0,005$, а о 02.00 год. – $1,26 \pm 0,006$. Разом з тим, у старих щурів він перебував у межах $1,09 \pm 0,007$ о 14.00 год. та $1,17 \pm 0,004$ о 02.00 год. ($p < 0,001$). Отже, білки нейронів БПЯ гіпоталамуса зрілих щурів мають в своєму складі білки, які більше збагачені на карбоксильні групи, ніж у старих щурів. Це може свідчити про більш виражені процеси окиснювальної модифікації білків у старих щурів.

Зміна режиму освітлення по-різному впливає на показники коефіцієнту R/V у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів. Зокрема, за умов світлової депривації, коефіцієнт R/V у нейронах БПЯ гіпоталамуса зрілих і старих щурів у середньому не змінюється. При цьому у зрілих щурів о 14.00 год. він складав $1,26 \pm 0,007$, а о 02.00 год. – $1,28 \pm 0,009$. У старих щурів о 14.00 год. – $1,11 \pm 0,009$, а о 02.00 год. – $1,18 \pm 0,007$ ($p < 0,001$).

Водночас, світлова стимуляція веде до зростання коефіцієнту R/V в нейронах БПЯ гіпоталамуса і у зрілих, і у старих щурів. Для зрілих щурів о 14.00 год. даний коефіцієнт перебував у межах $1,48 \pm 0,008$, а о 02.00 год. – $1,39 \pm 0,009$. Для старих щурів характерні менші цифри коефіцієнту: 14.00 год. – $1,24 \pm 0,007$, 02.00 год. – $1,19 \pm 0,008$ ($p < 0,001$). Отримані результати можна тлумачити як зростання інтенсивності процесів окиснювальної модифікації білків у нейронах БПЯ гіпоталамуса у відповідь на зміну режиму освітлення.

Нейрогормон мелатонін відіграє важливу роль в нейропротекції та підтриманні окисдантно-антиоксидантного балансу організму людини [210]. Він володіє прямою антиапоптичною та антиоксидантною дією на органи та тканини [211]. Ін'єкція екзогенного мелатоніну на тлі постійного освітлення веде до нормалізації коефіцієнту R/V у нейронах БПЯ гіпоталамуса. Цей ефект більш помітний для старих щурів, у яких відбулася повна нормалізація середніх значень коефіцієнту R/V в нейронах БПЯ гіпоталамуса. Зокрема о 14.00 год. він складав $1,08 \pm 0,007$, а о 02.00 год. – $1,16 \pm 0,004$. Однак ефект нормалізації коефіцієнту R/V менш помітний для зрілих щурів. Так, о 14.00 год. показник становив $1,32 \pm 0,006$, а о 02.00 год. – $1,30 \pm 0,008$ ($p < 0,001$).

Все більше зацікавлення серед науковців викликає питання ультраструктурної організації структур головного мозку, які залучені до регуляції циркадіанних ритмів за зміненого фотоперіоду та уведення мелатоніну. Зокрема, ультрамікроскопічна організація нейронів супраоптичних ядер переднього гіпоталамуса щурів за стандартного режиму освітлення демонструє зниження функціональної активності у світловий та її зростання – у темновий період доби [212].

Отримані нами результати проведеного субмікроскопічного вивчення клітин БПЯ гіпоталамуса експериментальних тварин теж встановили їх відносно підвищену функціональну активність в темновий період доби. Дослідження нейронів БПЯ за стандартного світлового режиму виявили ядра з нерівними контурами, інколи з досить глибокими вп'ячуваннями. Ядерця досить об'ємні. Нейроплазма містить добре розвинені каналці гранулярної ендоплазматичної сітки з фіксованими на їх мембранах рибосомами та невеликі цистерни комплексу Гольджі. Мітохондрії округлі, невеликі, з помірно вираженими кристами.

Зміна режиму освітлення веде до порушення архітекtonіки нейронів БПЯ, що проявляється вираженими гіпертрофічними та початковими деструктивними змінами ядер і органел нейронів БПЯ гіпоталамуса. За умов цілодобової темряви нами встановлено, що ядра клітин округлі, рідше визначалися ядерця. У нейроплазмі наявні локально розширені каналці ендоплазматичної сітки, цистерни комплексу Гольджі. Мітохондрії із просвітленим матриксом та фрагментованими кристами.

Стрес, викликаний світловою експозицією призводить до десинхронозу [212] та вираженого порушення архітекtonіки нейронів НПЯ реактивного характеру з ознаками деструкції органел, що особливо помітно о 02.00 год. [213]. Нами теж з'ясовано, що більш істотні ультрамікроскопічні зміни структурної організації нейронів БПЯ гіпоталамуса спостерігали у щурів, що перебували за умов світлової стимуляції, ніж при світловій депривації, що підтверджується зміною ультраструктури нервових клітин о 02.00 год. та

появою “темних” клітин. Ядра таких клітин пікнотичні, електроннощільні, містять вп’ячування каріолеми. Цитоплазма клітин ущільнена, в ній погано визначаються органели, які деструктивно змінені. Нейрони БПЯ гіпоталамуса о 02.00 год. містять округлої форми ядра з нерівними контурами каріолеми, що утворює глибокі інвагінації. Ядерця рідко визначалися. У гіалоплазмі визначаються каналці ендоплазматичної сітки, що локально розширені. Мітохондрії невеликі за розмірами з просвітленим матриксом та редукованими кристами.

В літературі все більше даних про нейропротекторну дію мелатоніну [214]. Зокрема, ін'єкції мелатоніну на фоні постійного освітлення призвели до нормалізації нейронного складу нейросекреторних клітин вентролатерального відділу НПЯ гіпоталамуса, що особливо помітно проведеними дослідженнями о 02.00 год. [213].

За умов використання екзогенного мелатоніну на тлі цілодобового освітлення нами встановлено відносну нормалізацію субмікроскопічного стану нервових клітин БПЯ гіпоталамуса, порівняно з тваринами, яких утримували за умови світлової стимуляції й ін'єкцій мелатоніну не проводили. Однак ультраструктура органел синтетичного та енергетичного забезпечення були в стані виснаження на тлі тривалого світлового періоду.

Так, нами досліджено, що о 02.00 год. нейрони БПЯ містять ядра округлої неправильної форми, з нечіткими контурами каріолеми, візуалізується небагато ядерних пор. Канальці гранулярної ендоплазматичної сітки добре розвинені, локально розширені. Мітохондрії округлої і видовженої форми, частина з них гіпертрофовані, із редукованими кристами і просвітленим матриксом.

Отримані результати проведених експериментальних досліджень розширили уяву про гістологічну, морфометричну, гістохімічну, імуногістохімічну та субмікроскопічну організацію ключового елемента у регуляції циклу сон-неспаня – БПЯ гіпоталамуса. З'ясували характер змін досліджуваних структур у онтогенезі та за зміни режиму освітлення.

Встановили позитивний ефект гормону шишкоподібної залози – мелатоніну для корекції порушень, викликаних світловою стимуляцією. Розкрили ключову роль взаємозв'язків між сном та циркадіанними ритмами, що є важливим для пізнання механізмів виникнення та розвитку розладів сну та десинхронозів. Це дає можливість покращити ранню діагностику, удосконалити лікування та профілактику виникнення цих патологічних станів. Дані дослідження дають можливість науково обґрунтувати застосування мелатоніну при хронопатологічних явищах та розладах сну, викликаних дисфункцією шишкоподібної залози.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі надано теоретичне узагальнення та нове вирішення актуального наукового завдання – з'ясування гістологічних, морфометричних, ультрамікроскопічних, гістохімічних та імуногістохімічних особливостей бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів за умови модифікації фотоперіоду та динаміки даних змін у онтогенезі, а також дослідження впливу на стан вказаного ядра мелатоніну.

1. Розташування бічного передзорового ядра гіпоталамуса є асиметричним, одне з них знаходиться попереду іншого. У старих щурів порівняно зі зрілими тваринами на 30% зменшується середня кількість нейронів на одиницю площі гістологічного зрізу ($24 \pm 0,3$ і $16 \pm 0,3$, $p < 0,001$), знижується об'єм нейронів ($1011 \pm 10,2$ мкм³, $p < 0,001$) внаслідок зменшення об'єму їх цитоплазми з відповідним зростанням ядерно-цитоплазматичного співвідношення ($0,420 \pm 0,0034$, $p < 0,001$).

2. Кількість тигроїдної субстанції у зрілих щурів є вищою, ніж у старих тварин ($0,263 \pm 0,0017$ і $0,216 \pm 0,0018$ од.опт.густини відповідно, $p < 0,001$). Речовина Нісля нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса старих щурів за умов світлової депривації зростає ($0,253 \pm 0,0024$ од.опт.густини, $p < 0,001$), а при світовій стимуляції – знижується ($0,192 \pm 0,0019$ од.опт.густини, $p < 0,001$). Уведення мелатоніну ($0,5$ мг/кг) призводить до підвищення кількості тигроїдної субстанції у дослідних структурах, порівняно зі тваринами, яким ін'єкції мелатоніну не проводили ($p < 0,001$).

3. Добові коливання оптичної густини (щільності) мелатонінових рецепторів типу 1A та 1B в нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса характеризуються чіткою циркадіанною ритмічністю, з найвищими показниками о 02.00 год ($0,264 \pm 0,0016$ од.опт.густини), тоді як о 14.00 год. вона знижується ($p < 0,001$). У старих щурів щільність мелатонінових рецепторів у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса є нижчою, ніж у зрілих тварин і о 02.00 год. перебуває у межах $0,216 \pm 0,0013$

од.опт.густини ($p < 0,001$). Світлова депривація веде до підвищення оптичної густини мелатонінових рецепторів як у зрілих ($0,298 \pm 0,0017$ од. опт. густини), так і у старих щурів ($0,267 \pm 0,0016$ од. опт. густини) ($p < 0,001$). При світловій стимуляції спостерігається зниження вказаних показників ($0,182 \pm 0,0017$ і $0,132 \pm 0,0012$ од. опт. густини відповідно, $p < 0,001$). При введенні екзогенного мелатоніну на тлі постійного освітлення прослідковується підвищення середніх величин щільності мелатонінових рецепторів у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса ($p < 0,001$).

4. Оптична густина специфічного забарвлення на білок у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса у зрілих щурів перевищує показники старих тварин і складає $0,274 \pm 0,0017$ од.опт.густини ($p < 0,001$). У старих щурів у інтенсивність забарвлення на білок знижується ($0,221 \pm 0,0013$ од.опт.густини, $p < 0,001$). Світлова експозиція призводить до зростання середньої інтенсивності забарвлення на білок в нейронах БПЯ гіпоталамуса у зрілих щурів ($0,326 \pm 0,0014$ од.опт.густини), тоді, коли у старих щурів, навпаки, спостерігається зниження середньої інтенсивності забарвлення на білок в нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса ($0,196 \pm 0,0017$ од.опт.густини, $p < 0,001$). Уведення екзогенного мелатоніну щурам, які знаходилися в умовах постійного освітлення суттєво покращує процеси накопичення протеїнів у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса як зрілих, так і старих щурів, причому це не залежить від періоду доби ($p < 0,001$).

5. Співвідношення між аміно- та карбоксильними групами у складі білків (коефіцієнт R/B) у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса зрілих щурів є значно вищим, ніж у старих щурів: $1,26 \pm 0,006$ і $1,17 \pm 0,004$ ($p < 0,001$). Тривалий вплив освітлення веде до зростання коефіцієнту R/B і у зрілих ($1,48 \pm 0,008$), і у старих щурів ($1,24 \pm 0,007$) ($p < 0,001$). Ін'єкція мелатоніну на тлі постійного освітлення призводить до нормалізації коефіцієнту R/B у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса, що особливо було помітно у старих щурів ($p < 0,001$).

6. Відносно підвищена функціональна активність нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса спостерігається у темний період доби. Зміна режиму освітлення веде до порушення архітекtonіки нейронів БПЯ, що проявляється вираженими гіпертрофічними та початковими деструктивними змінами ядер і органел нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса. Більш виражені зміни структурної організації нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса спостерігали у щурів, що перебували за умов світлової стимуляції, ніж при світловій депривації, що підтверджується зміною ультраструктури нервових клітин о 02.00 год. та появою “темних” клітин. Використання екзогенного мелатоніну на тлі цілодобового освітлення веде до відносної нормалізації субмікроскопічного стану клітин бічного передзорового ядра гіпоталамуса.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Власенко НЮ, Власенко МА. Особенности циркадианного ритма кортизола человека при вынужденной депривации сна. Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2019;30:105-15. doi: [10.26516/2073-3372.2019.30.105](https://doi.org/10.26516/2073-3372.2019.30.105)
2. Бурчаков ДИ. Суточный ритм секреции и метаболические эффекты мелатонина. Ожирение и метаболизм. 2015;12(1):46-51. doi: [10.14341/omet2015146-51](https://doi.org/10.14341/omet2015146-51)
3. Семак ИВ, Кульчицкий ВА. Физиологические и биохимические механизмы регуляции циркадных ритмов. Труды Белорусского государственного университета. 2007;2(1):17-37.
4. Чаулин АМ, Дуплякова ПД, Дупляков ДВ. Циркадные ритмы сердечных тропонинов: механизмы и клиническое значение. Российский кардиологический журнал. 2020;25(S3):62-9. doi: [10.15829/1560-4071-2020-4061](https://doi.org/10.15829/1560-4071-2020-4061)
5. Курбатова ИВ, Топчиева ЛВ, Немова НН. Циркадные гены и сердечно-сосудистые патологии. Труды Карельского научного центра Российской академии наук. 2014;5:3-17.
6. Рапопорт СИ. Хрономедицина, циркадианные ритмы. Кому это нужно? Клиническая медицина. 2012;8:73-5.
7. Булик РС, Бурачик АІ, Булик ТС, Кривчанська МІ, Власова КВ. Морфофункціональні перетворення в нейронах супрахізматичних ядер гіпоталамуса щурів на фоні різної тривалості освітлення і при корекції мелатоніном. Вісник проблем біології і медицини. 2018;1(1):264-9. doi: [10.29254/2077-4214-2018-1-1-142-264-269](https://doi.org/10.29254/2077-4214-2018-1-1-142-264-269)
8. Baron KG, Reid KJ. Circadian misalignment and health. Int Rev Psychiatry. 2014;26(2):139-54. doi: [10.3109/09540261.2014.911149](https://doi.org/10.3109/09540261.2014.911149)

9. Кельмансон ИА. Хронопатологические аспекты расстройств сна и когнитивных функций у детей с нарушениями зрения. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2015;60(5):42-50.
10. Захарчук ОІ. Взаємозв'язок розладів хроноструктури циркадіанних ритмів та порушень циклу "сон-неспанья". Молодий вчений. 2014;10:94-7.
11. Honma S. The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm. J Physiol Sci. 2018;68(3):207-19. doi: [10.1007/s12576-018-0597-5](https://doi.org/10.1007/s12576-018-0597-5)
12. Serin Y, Acar Tek N. Effect of Circadian Rhythm on Metabolic Processes and the Regulation of Energy Balance. Ann Nutr Metab. 2019;74(4):322-30. doi: [10.1159/000500071](https://doi.org/10.1159/000500071)
13. Colwell CS. Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. Nat Rev Neurosci. 2011;12(10):553-69. doi: [10.1038/nrn3086](https://doi.org/10.1038/nrn3086)
14. Scammell TE, Arrigoni E, Lipton JO. Neural circuitry of wakefulness and sleep. Neuron. 2017;93(4):747-65. doi: [10.1016/j.neuron.2017.01.014](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.014)
15. Smith PC, Mong JA. Neuroendocrine Control of Sleep. Curr Top Behav Neurosci. 2019;43:353-78. doi: [10.1007/7854_2019_107](https://doi.org/10.1007/7854_2019_107)
16. Patke A, Young MW, Axelrod S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020;21(2):67-84. doi: [10.1038/s41580-019-0179-2](https://doi.org/10.1038/s41580-019-0179-2)
17. Richards J, Gumz ML. Advances in understanding the peripheral circadian clocks. FASEB J. 2012;26(9):3602-13. doi: [10.1096/fj.12-203554](https://doi.org/10.1096/fj.12-203554)
18. Дмитриева ТВ, Миненко ИА, Золотавин СВ, Иванова ЕВ, Бойков АВ. Годовые суточные движения земли, циркадные ритмы и молекулярные механизмы контроля циркадных ритмов. Глобус. 2019;5:(8):9-13.
19. Noble W, Spires-Jones TL. Sleep well to slow Alzheimer's progression? Science. 2019;363(6429):813-4. doi: [10.1126/science.aaw5583](https://doi.org/10.1126/science.aaw5583)
20. Begemann K, Neumann AM, Oster H. Regulation and function of extra-SCN circadian oscillators in the brain. Acta Physiol (Oxf) [Internet]. 2020[cited

2021 Sep 14];229(1):e13446. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apha.13446> doi: [10.1111/apha.13446](https://doi.org/10.1111/apha.13446)

21. Комісаренко СВ, редактор. Під знаком Нобеля: лідери наукового прогресу або роздуми вченого-біохіміка й імунолога про розвиток і значення наук про життя. Київ; 2020. Розділ, Для чого потрібні циркадні ритми, або як змінити хід «біологічного годинника»; с. 150-67.

22. Song J. Pineal gland dysfunction in Alzheimer's disease: relationship with the immune-pineal axis, sleep disturbance, and neurogenesis. *Mol Neurodegener.* 2019;14(1):28. doi: [10.1186/s13024-019-0330-8](https://doi.org/10.1186/s13024-019-0330-8)

23. Bhadra U, Thakkar N, Das P, Pal Bhadra M. Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human. *Sleep Med.* 2017;35:49-61. doi: [10.1016/j.sleep.2017.04.008](https://doi.org/10.1016/j.sleep.2017.04.008)

24. Rosenwasser AM, Turek FW. Neurobiology of Circadian Rhythm Regulation. *Sleep Med Clin.* 2015;10(4):403-12. doi: [10.1016/j.jsmc.2015.08.003](https://doi.org/10.1016/j.jsmc.2015.08.003)

25. Костенко ЕВ, Петрова ЛВ. Коррекция нарушений сна и циркадианных ритмов у пациентов, перенесших мозговую инсульт: возможности применения мелатонина в комплексе медицинской реабилитации. *Трудный пациент.* 2018;16(4):23-9.

26. Sen S, Dumont S, Sage-Ciocca D, Reibel S, de Goede P, Kalsbeek A, et al. Expression of the clock gene *Rev-erba* in the brain controls the circadian organisation of food intake and locomotor activity, but not daily variations of energy metabolism. *J Neuroendocrinol* [Internet]. 2018[cited 2021 Aug 18];30(1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jne.12557> doi: [10.1111/jne.12557](https://doi.org/10.1111/jne.12557)

27. Мінченко ОГ, Яворовський ОП, Паустовський ЮО, Мінченко ДО, Завгородній ІВ. Циркадіальні гени як чутливі маркери біонебезпеки. *Довкілля та здоров'я.* 2009;1:10-7.

28. Ray S, Valekunja UK, Stangherlin A, Howell SA, Snijders AP, Damodaran G, et al. Circadian rhythms in the absence of the clock gene *Bmal1*. *Science.* 2020;367(6479):800-6. doi: [10.1126/science.aaw7365](https://doi.org/10.1126/science.aaw7365)

29. Bailey M, Silver R. Sex differences in circadian timing systems: implications for disease. *Front Neuroendocrinol.* 2014;35(1):111-39. doi: [10.1016/j.yfrne.2013.11.003](https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.11.003)
30. Снежицкий ВА, Побиванцева НФ. Циркадианные ритмы в кардиологической практике. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* 2013;1:9-13.
31. Quera Salva MA, Hartley S, Léger D, Dauvilliers YA. Non-24-Hour Sleep-Wake Rhythm Disorder in the Totally Blind: Diagnosis and Management. *Front Neurol* [Internet]. 2017[cited 2021 Aug 01];8:686. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5741691/pdf/fneur-08-00686.pdf> doi: [10.3389/fneur.2017.00686](https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00686)
32. Amaral FGD, Cipolla-Neto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab.* 2018;62(4):472-9. doi: [10.20945/2359-3997000000066](https://doi.org/10.20945/2359-3997000000066)
33. Hatori M, Gronfier C, Van Gelder RN, Bernstein PS, Carreras J, Panda S, et al. Global rise of potential health hazards caused by blue light-induced circadian disruption in modern aging societies. *NPJ Aging Mech Dis* [Internet]. 2017[cited 2021 Oct 06];3:9. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5473809/pdf/41514_2017_Article_10.pdf doi: [10.1038/s41514-017-0010-2](https://doi.org/10.1038/s41514-017-0010-2)
34. Бердина ОН, Мадаева ИМ, Рычкова ЛВ. Ожирение и нарушения циркадных ритмов сна и бодрствования: точки соприкосновения и перспективы терапии. *Acta Biomedica Scientifica.* 2020;5(1):21-30. doi: [10.29413/ABS.2020-5.1.3](https://doi.org/10.29413/ABS.2020-5.1.3)
35. Булик РС, Власова КВ, Бурачик АІ. Оцінка динаміки морфофункціонального стану нейронів супрахіазматичних ядер гіпоталамуса щурів за тривалої світлової експозиції. *Буковинський медичний вісник.* 2016;20(4):30-3. doi: [10.24061/2413-0737.XX.4.80.2016.186](https://doi.org/10.24061/2413-0737.XX.4.80.2016.186)
36. Telias I, Wilcox ME. Sleep and Circadian Rhythm in Critical Illness. *Crit Care* [Internet]. 2019[cited 2021 Oct 23];23(1):82. Available from:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6408803/pdf/13054_2019_Article_2366.pdf doi: [10.1186/s13054-019-2366-0](https://doi.org/10.1186/s13054-019-2366-0)

37. Mattis J, Sehgal A. Circadian Rhythms, Sleep, and Disorders of Aging. *Trends Endocrinol Metab.* 2016;27(4):192-203. doi: [10.1016/j.tem.2016.02.003](https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.02.003)

38. Акарачкова ЕС, Царева ЕВ. Расстройства сна, связанные с циркадным ритмом. *Стресс под контролем.* 2019;1:9-19.

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

40. Nayak CS, Anilkumar AC. EEG Normal Sleep [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021[cited 2021 Sep 08]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537023/>

41. Александрова ЕВ, Зайцев ОС, Потапов АА. Нейромедиаторные основы сознания и бессознательных состояний. *Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко.* 2014;78(1):26-32.

42. Ковальзон ВМ, Долгих ВВ. Регуляция цикла бодрствование-сон. *Неврологический журнал.* 2016;21(6):316-22.

43. Кузнецов ВВ, Шевченко ЛА. Особенности сна и циркадных ритмов при старении. *Журнал неврології ім. Б.М. Маньковського.* 2019;7(3-4):47-56.

44. Feriante J, Araujo JF. Physiology, REM Sleep [Internet]. StatPearls; 2019[updated 2021 Feb 23; cited 2021 Oct 11]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531454/>

45. Mong JA, Cusmano DM. Sex differences in sleep: impact of biological sex and sex steroids. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* [Internet]. 2016[cited 2021 Aug 25];371(1688):20150110. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4785896/pdf/rstb20150110.pdf> doi: [10.1098/rstb.2015.0110](https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0110)

46. Гусев ЕИ, Коновалов АН, Скворцова ВИ, редакторы. *Неврология. Национальное руководство.* 2-е изд., перераб. и допол. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2018. Т 1; 880 p.

47. Meira e Cruz M, Laranjo SM, Rocha I. Hypothalamic Control of Sleep-Wake Circadian Cycle [Internet]. In: Baloyannis S, Gordeladze J, editors. Hypothalamus in Health and Diseases. IntechOpen; 2018[cited 2021 Aug 31], p. 31-45. Available from: <https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/42504/1/Hypothalamic.pdf> doi: [10.5772/intechopen.79899](https://doi.org/10.5772/intechopen.79899)
48. Путилов АА, Веревкин ЕГ. Обобщенная модель трех процессов циклической регуляции сна-бодрствования. Бюллетень сибирской медицины. 2013;12(2):266-74. doi: [10.20538/1682-0363-2013-2-266-274](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2013-2-266-274)
49. Brown RE, Basheer R, McKenna JT, Strecker RE, McCarley RW. Control of sleep and wakefulness. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1087-187. doi: [10.1152/physrev.00032.2011](https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2011)
50. Гаврилов ЮВ, Деревцова КЗ, Корнева ЕА. Орексиnergическая система мозга и патогенетические основы нарушений цикла "сон - бодрствование" при нарколепсии. Бюллетень сибирской медицины. 2017;16(4):7-15. doi: [10.20538/1682-0363-2017-4-7-15](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2017-4-7-15)
51. Yoshikawa T, Nakamura T, Yanai K. Histaminergic neurons in the tuberomammillary nucleus as a control centre for wakefulness. *Br J Pharmacol.* 2021;178(4):750-69. doi: [10.1111/bph.15220](https://doi.org/10.1111/bph.15220)
52. Lüthi A. Sleep: The Very Long Posited (VLPO) Synaptic Pathways of Arousal. *Curr Biol.* 2019;29(24):R1310-12. doi: [10.1016/j.cub.2019.11.012](https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.012)
53. Luppi PH, Fort P. Sleep-wake physiology. *Handb Clin Neurol.* 2019;160:359-70. doi: [10.1016/B978-0-444-64032-1.00023-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00023-0)
54. Jou SB, Tsai CJ, Fang CY, Yi PL, Chang FC. Effects of N6-(4-hydroxybenzyl) adenine riboside in stress-induced insomnia in rodents. *J Sleep Res* [Internet]. 2021[cited 2021 Oct 12];30(1):e13156. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jsr.13156> doi: [10.1111/jsr.13156](https://doi.org/10.1111/jsr.13156)
55. Zhao M, Tuo H, Wang S, Zhao L. The Effects of Dietary Nutrition on Sleep and Sleep Disorders. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2020[cited 2021 Aug 11];2020:ID3142874. Available from:

<https://downloads.hindawi.com/journals/mi/2020/3142874.pdf>

doi:

[10.1155/2020/3142874](https://doi.org/10.1155/2020/3142874)

56. Vetrivelan R, Fuller PM, Yokota S, Lu J, Saper CB. Metabolic effects of chronic sleep restriction in rats. *Sleep*. 2012;35(11):1511-20. doi:

[10.5665/sleep.2200](https://doi.org/10.5665/sleep.2200)

57. Черкасов ВГ, редактор. Міжнародна анатомічна термінологія (латинські, українські, російські та англійські еквіваленти. Вінниця: Нова книга; 2010. 392 с.

58. Оганесян ГА, Аристакесян ЕА, Романова ИВ, Ватаев СИ, Кузик ВВ, Камбарова ДК. Вопросы эволюции цикла бодрствование-сон. Часть 2: нейромедиаторные механизмы регуляции. *Биосфера*. 2013;5(1):97-123.

59. Yuan J, Luo Z, Zhang Y, Zhang Y, Wang Y, Cao S, et al. GABAergic ventrolateral pre-optic nucleus neurons are involved in the mediation of the anesthetic hypnosis induced by propofol. *Mol Med Rep*. 2017;16(3):3179-86. doi:

[10.3892/mmr.2017.7035](https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7035)

60. Chung S, Weber F, Zhong P, Tan CL, Nguyen TN, Beier KT, et al. Identification of preoptic sleep neurons using retrograde labelling and gene profiling. *Nature*. 2017;545(7655):477-81. doi: [10.1038/nature22350](https://doi.org/10.1038/nature22350)

61. Moore JT, Chen J, Han B, Meng QC, Veasey SC, Beck SG, et al. Direct activation of sleep-promoting VLPO neurons by volatile anesthetics contributes to anesthetic hypnosis. *Curr Biol*. 2012;22(21):2008-16. doi:

[10.1016/j.cub.2012.08.042](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.042)

62. Kroeger D, Absi G, Gagliardi C, Bandaru SS, Madara JC, Ferrari LL, et al. Galanin neurons in the ventrolateral preoptic area promote sleep and heat loss in mice. *Nat Commun* [Internet]. 2018[cited 2021 Oct 10];9(1):4129. Available from:

<https://www.nature.com/articles/s41467-018-06590-7> doi: [10.1038/s41467-018-06590-7](https://doi.org/10.1038/s41467-018-06590-7)

63. Guo X, Gao X, Keenan BT, Zhu J, Sarantopoulou D, Lian J, et al. RNA-seq analysis of galaninergic neurons from ventrolateral preoptic nucleus identifies expression changes between sleep and wake. *BMC Genomics* [Internet]. 2020[cited

2021 Aug 29];21:633. Available from:
<https://bmccgenomics.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12864-020-07050-7.pdf> doi: [10.1186/s12864-020-07050-7](https://doi.org/10.1186/s12864-020-07050-7)

64. Xiong M, Li J, Wang D, Delphin E, Ye JH. Intra-ventrolateral preoptic nucleus injection of γ -aminobutyric acid induces sedation in rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2012;4(2):94-8.

65. Saito YC, Maejima T, Nishitani M, Hasegawa E, Yanagawa Y, Mieda M, et al. Monoamines Inhibit GABAergic Neurons in Ventrolateral Preoptic Area That Make Direct Synaptic Connections to Hypothalamic Arousal Neurons. *J Neurosci*. 2018;38(28):6366-78. doi: [10.1523/JNEUROSCI.2835-17.2018](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2835-17.2018)

66. Cheng J, Wu F, Zhang M, Ding D, Fan S, Chen G, et al. The Interaction Between the Ventrolateral Preoptic Nucleus and the Tuberomammillary Nucleus in Regulating the Sleep-Wakefulness Cycle. *Front Neurosci* [Internet]. 2020[cited 2021 Nov 14];14:615854. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7767984/pdf/fnins-14-615854.pdf>
 doi: [10.3389/fnins.2020.615854](https://doi.org/10.3389/fnins.2020.615854)

67. Лазуркевич ХО, Синовєрська ОБ. Сон та його порушення у дітей: медико-соціальні аспекти. *Art of Medicine*. 2020;3:231-7. doi: [10.21802/artm.2020.3.15.231](https://doi.org/10.21802/artm.2020.3.15.231)

68. Бодулев ОЮ, Шкурупій ДА. Анестезія і порушення сну – нова проблема сучасної анестезіології (огляд літератури). *Медицина болю*. 2019;4(2):33-40. doi: [10.31636/pmju.v4i2.2](https://doi.org/10.31636/pmju.v4i2.2)

69. Skowrońska K, Obara-Michlewska M, Zielińska M, Albrecht J. NMDA Receptors in Astrocytes: In Search for Roles in Neurotransmission and Astrocytic Homeostasis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019[cited 2021 Sep 23];20(2):309. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6358855/pdf/ijms-20-00309.pdf> doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20020309>

70. Kumar S, Rai S, Hsieh KC, McGinty D, Alam MN, Szymusiak R. Adenosine A(2A) receptors regulate the activity of sleep regulatory GABAergic

neurons in the preoptic hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(1):R31-41. doi: [10.1152/ajpregu.00402.2012](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00402.2012)

71. 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](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00977.2002)

72. Vetrivelan R, Saper CB, Fuller PM. Armodafinil-induced wakefulness in animals with ventrolateral preoptic lesions. *Nat Sci Sleep*. 2014;6:57-63. doi: [10.2147/NSS.S53132](https://doi.org/10.2147/NSS.S53132)

73. Varin C, Rancillac A, Geoffroy H, Arthaud S, Fort P, Gallopin T. Glucose Induces Slow-Wave Sleep by Exciting the Sleep-Promoting Neurons in the Ventrolateral Preoptic Nucleus: A New Link between Sleep and Metabolism. *J Neurosci*. 2015;35(27):9900-11. doi: [10.1523/JNEUROSCI.0609-15.2015](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0609-15.2015)

74. Wang Q, Yue XF, Qu WM, Tan R, Zheng P, Urade Y, et al. Morphine inhibits sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic area via mu receptors and induces wakefulness in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(5):791-801. doi: [10.1038/npp.2012.244](https://doi.org/10.1038/npp.2012.244)

75. Santello M, Calì C, Bezzi P. Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv Exp Med Biol*. 2012;970:307-31. doi: [10.1007/978-3-7091-0932-8_14](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_14)

76. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*. 2014;81(4):728-39. doi: [10.1016/j.neuron.2014.02.007](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.007)

77. Kim JH, Choi IS, Jeong JY, Jang IS, Lee MG, Suk K. Astrocytes in the Ventrolateral Preoptic Area Promote Sleep. *J Neurosci*. 2020;40(47):8994-9011. doi: [10.1523/JNEUROSCI.1486-20.2020](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1486-20.2020)

78. Pelluru D, Konadhode RR, Bhat NR, Shiromani PJ. Optogenetic stimulation of astrocytes in the posterior hypothalamus increases sleep at night in C57BL/6J mice. *Eur J Neurosci*. 2016;43(10):1298-306. doi: [10.1111/ejn.13074](https://doi.org/10.1111/ejn.13074)

79. Леваков С, Боровкова Е. Физиологическая роль и клинические эффекты мелатонина. *Врач*. 2015;3:72-5.

80. Кривчанська МІ, Пішак ОВ, Пішак ВП. Реакція шишкоподібної залози на деякі агоністи та антагоністи бета-адренорецепторів у постнатальному онтогенезі. Клінічна та експериментальна патологія. 2018;17(3 Ч 2):156-61.

81. Датиева ВК, Ляшенко ЕА, Левин ОС. Применение мелатонина при нарушении сна. Современная терапия в психиатрии и неврологии. 2015;1:36-40.

82. Булгакова СВ, Романчук НП. Сон и старение: эндокринные и эпигенетические аспекты. Бюллетень науки и практики. 2020;6(8):65-96. doi: [10.33619/2414-2948/57/08](https://doi.org/10.33619/2414-2948/57/08)

83. Пішак ВП, Булик РС, Кривчанська МІ, Громик ОО, Пішак ОВ. Основні фізіологічні властивості мелатоніну. Інтегративна Антропологія. 2015;1:32-8.

84. Костенко ЕВ, Маневич ТМ, Разумов НА. Десинхроноз как один из важнейших факторов возникновения и развития цереброваскулярных заболеваний. Лечебное дело. 2013;2:104-16.

85. 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](https://doi.org/10.1016/j.smrv.2004.06.004)

86. Быков ЮВ, Ханнанова АН, Беккер РА. Мелатонин и бензодиазепины в лечении инсомнии: за и против (обзор литературы). В мире научных открытий. 2016;7:60-82. doi: [10.12731/wsd-2016-7-4](https://doi.org/10.12731/wsd-2016-7-4)

87. Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. J Pineal Res. 2014;56(4):371-81. doi: [10.1111/jpi.12137](https://doi.org/10.1111/jpi.12137)

88. Самойлов АС, Рылова НВ, Жолинский АВ, Большаков ИВ, Казаков ВФ. Применение мелатонина для профилактики и лечения нарушения циркадных ритмов. Практическая медицина. 2021;19(2):34-8. doi: [10.32000/2072-1757-2021-2-34-38](https://doi.org/10.32000/2072-1757-2021-2-34-38)

89. Евсюкова ИИ, Айламазян ЭК. Роль отсутствия циркадного ритма материнского мелатонина в генезе раннего скачка роста у детей. Журнал акушерства и женских болезней. 2020;69(1):87-94. doi: [10.17816/JOWD69187-94](https://doi.org/10.17816/JOWD69187-94)

90. Кривчанська МІ, Пішак ВП, Грицюк МІ. Мелатонін: механізм дії, біологічна роль. Інтегративна антропологія. 2010;2:36-41.

91. Рапопорта СИ, Голиченкова ВА, редакторы. Мелатонин: теория и практика. Москва: Медпрактика-М; 2009. 100 с.

92. Arendt J. Approaches to the Pharmacological Management of Jet Lag. Drugs. 2018;78(14):1419-31. doi: [10.1007/s40265-018-0973-8](https://doi.org/10.1007/s40265-018-0973-8)

93. Голоков ВА, Шнайдер НА, Николаева ТЯ, Голокова ЕА, Москалева ПВ, Насырова РФ. Мелатонин и беременность: нейрофизиология, влияние на патологические состояния матери и плода, участие в фетальном программировании (анализ литературы). Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова. Серия: Медицинские науки. 2019;1:5-18. doi: [10.25587/SVFU.2019.1\(14\).27471](https://doi.org/10.25587/SVFU.2019.1(14).27471)

94. Полуэктов МГ, Нарбут АМ, Шувахина НА. Применение мелатонина в качестве нейропротектора при ишемическом инсульте. Медицинский совет. 2019;18:18-24. doi: [10.21518/2079-701X-2019-18-18-24](https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-18-18-24)

95. Qin Q, Chen P, Cui Z, Wang J, Xie B, Zhang S, et al. Neuropeptide Y knockdown in the dorsomedial hypothalamus improved basal and obesity-induced decrease in bone mass density. Neuro Endocrinol Lett. 2019;40(6):289-96.

96. Центерадзе СЛ, Полуэктов МГ. Клинические аспекты применения препаратов мелатонина. Медицинский совет. 2021;10:80-4. doi: [10.21518/2079-701X-2021-10-80-84](https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-10-80-84)

97. Imenshahidi M, Karimi G, Hosseinzadeh H. Effects of melatonin on cardiovascular risk factors and metabolic syndrome: a comprehensive review. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2020;393(4):521-36. doi: [10.1007/s00210-020-01822-4](https://doi.org/10.1007/s00210-020-01822-4)

98. Будневский АВ, Овсянников ЕС, Шкатова ЯС, Резова НВ. Мелатонин и инфаркт миокарда: роль в диагностике и лечении. Клиническая медицина. 2018;96(4):293-7. doi: [10.18821/0023-2149-2018-96-4-293-297](https://doi.org/10.18821/0023-2149-2018-96-4-293-297)
99. McMullan CJ, Rimm EB, Schernhammer ES, Forman JP. A nested case-control study of the association between melatonin secretion and incident myocardial infarction. *Heart*. 2017;103(9):694-701. doi: [10.1136/heartjnl-2016-310098](https://doi.org/10.1136/heartjnl-2016-310098)
100. Gorman MR. Temporal organization of pineal melatonin signaling in mammals. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2020[cited 2021 Aug 27];503:110687. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0303720719303892?via%3Dihub> doi: [10.1016/j.mce.2019.110687](https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110687)
101. Samanta S. Physiological and pharmacological perspectives of melatonin. *Arch Physiol Biochem*. 2020;1-22. doi: [10.1080/13813455.2020.1770799](https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1770799)
102. Kurhaluk N, Tkachenko H. Melatonin and alcohol-related disorders. *Chronobiol Int*. 2020;37(6):781-803. doi: [10.1080/07420528.2020.1761372](https://doi.org/10.1080/07420528.2020.1761372)
103. Talib WH. Melatonin and Cancer Hallmarks. *Molecules*. 2018;23(3):518. doi: [10.3390/molecules23030518](https://doi.org/10.3390/molecules23030518)
104. Samanta S. Melatonin: an endogenous miraculous indolamine, fights against cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2020;146(8):1893-922. doi: [10.1007/s00432-020-03292-w](https://doi.org/10.1007/s00432-020-03292-w)
105. Miller SC, Pandi-Perumal SR, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJM. The Role of Melatonin in Immuno-Enhancement: Potential Application in Cancer. *Int J Exp Pathol*. 2006;87(2):81-7. doi: [10.1111/j.0959-9673.2006.00474.x](https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2006.00474.x)
106. Романчук НП, Пятин ВФ Мелатонин: нейрофизиологические и нейроэндокринные аспекты. *Бюллетень науки и практики*. 2019;5(7):71-85. doi: [10.33619/2414-2948/46/03](https://doi.org/10.33619/2414-2948/46/03)
107. Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*. 2015;61(2-3):77-84. doi: [10.1016/j.neuchi.2015.03.002](https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2015.03.002)

108. Erren TC, Reiter RJ. A generalized theory of carcinogenesis due to chronodisruption. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008;29(6):815-21.
109. Katada S, Sassone-Corsi P. The histone methyltransferase MLL1 permits the oscillation of circadian gene expression. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(12):1414-21. doi: [10.1038/nsmb.1961](https://doi.org/10.1038/nsmb.1961)
110. Peyrot F, Ducrocq C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res.* 2008;45(3):235-46. doi: [10.1111/j.1600-079X.2008.00580.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00580.x)
111. Анисимов ВН. Эпифиз, биоритмы и старение организма. *Успехи физиологических наук.* 2008;39(4):52-76.
112. Jenwitheesuk A, Nopparat C, Mukda S, Wongchitrat P, Govitrapong P. Melatonin regulates aging and neurodegeneration through energy metabolism, epigenetics, autophagy and circadian rhythm pathways. *Int J Mol Sci.* 2014;15(9):16848-84. doi: [10.3390/ijms150916848](https://doi.org/10.3390/ijms150916848)
113. Панченко АВ, Губарева ЕА, Анисимов ВН. Роль циркадных ритмов и «клеточных часов» в старении и развитии онкологических заболеваний. *Успехи геронтологии.* 2016;29(1):29-37.
114. Панченко АВ, Губарева ЕА, Анисимов ВН. Роль циркадных ритмов и «клеточных часов» в развитии заболеваний, ассоциированных с возрастом. *Успехи геронтологии.* 2016;29(3):417-23.
115. Reiter RJ, Rosales-Corral S, Sharma R. Circadian disruption, melatonin rhythm perturbations and their contributions to chaotic physiology. *Adv Med Sci.* 2020;65(2):394-402. doi: [10.1016/j.advms.2020.07.001](https://doi.org/10.1016/j.advms.2020.07.001)
116. Zisapel N. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *Br J Pharmacol.* 2018;175(16):3190-9. doi: [10.1111/bph.14116](https://doi.org/10.1111/bph.14116)
117. Айламазян ЭК, Евсюкова ИИ, Ярмолинская МИ. Роль мелатонина в развитии гестационного сахарного диабета. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2018;67(1):85-91. doi: [10.17816/JOWD67185-91](https://doi.org/10.17816/JOWD67185-91)

118. Струева НВ, Полуэктов МГ, Савельева ЛВ, Мельниченко ГА. Ожирение и сон. Ожирение и метаболизм. 2013;10(3):11-8. doi: [10.14341/2071-8713-3860](https://doi.org/10.14341/2071-8713-3860)
119. Захарчук АИ, Кадельник ЛА. Мелатонин и геронтологические аспекты сезонной структуры циркадианных ритмов неспецифического иммунитета. Health & Education Millennium. 2013;15(1-4):259-62.
120. Губина-Вакулик ГИ, Бондаренко ЛА, Геворкян АР. Морфологический ответ пинеальной железы старых животных на курсовое введение мелатонина. Успехи геронтологии. 2009;22(4):626-30.
121. Soltani S, Chauvette S, Bukhtiyarova O, Lina JM, Dubé J, Seigneur J, et al. Sleep-Wake Cycle in Young and Older Mice. Front Syst Neurosci [Internet]. 2019[cited 2021 Sep 02];13:51. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsys.2019.00051/full> doi: [10.3389/fnsys.2019.00051](https://doi.org/10.3389/fnsys.2019.00051)
122. Jeong J, Zhu H, Harris RA, Dong Y, Su S, Tingen MS, et al. Ethnic Differences in Nighttime Melatonin and Nighttime Blood Pressure: A Study in European Americans and African Americans. Am J Hypertens. 2019;32(10):968-74. doi: [10.1093/ajh/hpz083](https://doi.org/10.1093/ajh/hpz083)
123. Семёнова НВ. Хронобиологические аспекты нарушений сна у женщин климактерического периода: роль мелатонина (обзор литературы). Acta Biomedica Scientifica. 2017;2(5 Ч 1):32-7. doi: [10.12737/article_59e71aad2aa777.29348772](https://doi.org/10.12737/article_59e71aad2aa777.29348772)
124. Evsyukova HV, Joseph M, editors. Platelets and aspirin-induced asthma: pathogenesis and melatonin. 1 st ed. Amsterdam: Academic Press; 2013. 108 p.
125. Пигарев ИН. Висцеральная теория сна. Журнал высшей нервной деятельности им И.В. Павлова. 2012;63(1):86–104. doi: [10.7868/S0044467713010115](https://doi.org/10.7868/S0044467713010115)
126. Wahl S, Engelhardt M, Schaupp P, Lappe C, Ivanov IV. The inner clock-Blue light sets the human rhythm. J Biophotonics [Internet]. 2019[cited 2021

Aug 17];12(12):e201900102. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbio.201900102> doi: [10.1002/jbio.201900102](https://doi.org/10.1002/jbio.201900102)

127. Reynolds AC, Banks S. Total sleep deprivation, chronic sleep restriction and sleep disruption. *Prog Brain Res.* 2010;185:91-103. doi: [10.1016/B978-0-444-53702-7.00006-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53702-7.00006-3)

128. Bah TM, Goodman J, Iliff JJ. Sleep as a Therapeutic Target in the Aging Brain. *Neurotherapeutics.* 2019;16(3):554-68. doi: [10.1007/s13311-019-00769-6](https://doi.org/10.1007/s13311-019-00769-6)

129. Ризничук МО, Пішак ВП. Ожиріння: роль десинхронозу та генетичних чинників у механізмах його розвитку. *Regulatory Mechanisms in Biosystems.* 2017;8(1):23-9. doi: [10.15421/021705](https://doi.org/10.15421/021705)

130. Быков АТ, Маляренко ТН, Маляренко ЮЕ. Медицина сна. Сообщение 2. О природе сна. *Военная медицина.* 2009;4(13):65-73.

131. Полуэктов МГ, Пчелина ПВ. Вторична ли вторичная инсомния? Возможности неспецифического лечения препаратами мелатонина. *Медицинский совет.* 2014;18:51-7.

132. Ferrie JE, Kumari M, Salo P, Singh-Manoux A, Kivimäki M. Sleep epidemiology - a rapidly growing field. *Int J Epidemiol.* 2011;40(6):1431-7. doi: [10.1093/ije/dyr203](https://doi.org/10.1093/ije/dyr203)

133. Kronholm E, Partonen T, Laatikainen T, Peltonen M, Härmä M, Hublin C, et al. Trends in self-reported sleep duration and insomnia-related symptoms in Finland from 1972 to 2005: a comparative review and re-analysis of Finnish population samples. *J Sleep Res.* 2008;17(1):54-62. doi: [10.1111/j.1365-2869.2008.00627.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.2008.00627.x)

134. Ковальзон ВМ, Дорохов ВБ. Цикл бодрствование-сон и биоритмы человека при различных режимах чередования светлого и темного периода суток. *Health & Education Millennium.* 2013;15(1-4):151-62.

135. Cappuccio FP, D'Elia L, Strazzullo P, Miller MA. Sleep duration and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Sleep.* 2010;33(5):585-92. doi: [10.1093/sleep/33.5.585](https://doi.org/10.1093/sleep/33.5.585)

136. Prather AA, Janicki-Deverts D, Hall MH, Cohen S. Behaviorally Assessed Sleep and Susceptibility to the Common Cold. *Sleep*. 2015;38(9):1353-9. doi: [10.5665/sleep.4968](https://doi.org/10.5665/sleep.4968)
137. Prather AA, Hall M, Fury JM, Ross DC, Muldoon MF, Cohen S, et al. Sleep and antibody response to hepatitis B vaccination. *Sleep*. 2012;35(8):1063-9. doi: [10.5665/sleep.1990](https://doi.org/10.5665/sleep.1990)
138. Åkerstedt T, Ghilotti F, Grotta A, Zhao H, Adami HO, Trolle-Lagerros Y, et al. Sleep duration and mortality - Does weekend sleep matter? *J Sleep Res* [Internet]. 2019[cited 2021 Aug 12];28(1):e12712. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jsr.12712> doi: [10.1111/jsr.12712](https://doi.org/10.1111/jsr.12712)
139. Haspel JA, Anafi R, Brown MK, Cermakian N, Depner C, Desplats P, et al. A. Perfect timing: circadian rhythms, sleep, and immunity - an NIH workshop summary. *JCI Insight* [Internet]. 2020[cited 2021 Aug 01];5(1):e131487. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7030790/pdf/jciinsight-5-131487.pdf> doi: [10.1172/jci.insight.131487](https://doi.org/10.1172/jci.insight.131487)
140. Spinedi E, Cardinali DP. Neuroendocrine-Metabolic Dysfunction and Sleep Disturbances in Neurodegenerative Disorders: Focus on Alzheimer's Disease and Melatonin. *Neuroendocrinology*. 2019;108(4):354-64. doi: [10.1159/000494889](https://doi.org/10.1159/000494889)
141. Нодель МР. Современные возможности терапии нарушений сна при болезни Паркинсона. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2013;5(2):29-34. doi: [10.14412/2074-2711-2013-2409](https://doi.org/10.14412/2074-2711-2013-2409)
142. Lim J, Dinges DF. A meta-analysis of the impact of short-term sleep deprivation on cognitive variables. *Psychol Bull*. 2010;136(3):375-89. doi: [10.1037/a0018883](https://doi.org/10.1037/a0018883)
143. Rångtjell FH, Karamchedu S, Andersson P, Liethof L, Búcaro MO, Lampola L, et al. A single night of sleep loss impairs objective but not subjective working memory performance in a sex-dependent manner. *J Sleep Res* [Internet]. 2019[cited 2021 Oct 20];28(1):e12651. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7379264/pdf/JSR-28-e12651.pdf> doi: [10.1111/jsr.12651](https://doi.org/10.1111/jsr.12651)

144. Banks S, Van Dongen HP, Maislin G, Dinges DF. Neurobehavioral dynamics following chronic sleep restriction: dose-response effects of one night for recovery. *Sleep*. 2010;33(8):1013-26. doi: [10.1093/sleep/33.8.1013](https://doi.org/10.1093/sleep/33.8.1013)
145. Faraut B, Boudjeltia KZ, Vanhamme L, Kerkhofs M. Immune, inflammatory and cardiovascular consequences of sleep restriction and recovery. *Sleep Med Rev*. 2012;16(2):137-49. doi: [10.1016/j.smrv.2011.05.001](https://doi.org/10.1016/j.smrv.2011.05.001)
146. Gangwisch JE, Heymsfield SB, Boden-Albala B, Buijs RM, Kreier F, Pickering TG, et al. Short sleep duration as a risk factor for hypertension: analyses of the first National Health and Nutrition Examination Survey. *Hypertension*. 2006;47(5):833-9. doi: [10.1161/01.hyp.0000217362.34748.e0](https://doi.org/10.1161/01.hyp.0000217362.34748.e0)
147. Hoevenaar-Blom MP, Spijkerman AMW, Kromhout D, van den Berg JF, Verschuren WMM. Sleep duration and sleep quality in relation to 12-year cardiovascular disease incidence: the MORGEN study. *Sleep*. 2011;34(11):1487-92. doi: [10.5665/sleep.1382](https://doi.org/10.5665/sleep.1382)
148. Verrier RL, Josephson ME. Impact of sleep on arrhythmogenesis. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2009;2(4):450-9. doi: [10.1161/CIRCEP.109.867028](https://doi.org/10.1161/CIRCEP.109.867028)
149. Palagini L, Bruno RM, Gemignani A, Baglioni C, Ghiadoni L, Riemann D. Sleep loss and hypertension: a systematic review. *Curr Pharm Des*. 2013;19(13):2409-19. doi: [10.2174/1381612811319130009](https://doi.org/10.2174/1381612811319130009)
150. Hofmeister EN, Fisher S, Palesh O, Innominato PF. Does circadian rhythm influence gastrointestinal toxicity? *Curr Opin Support Palliat Care*. 2020;14(2):120-6. doi: [10.1097/SPC.0000000000000498](https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000498)
151. Sancar G, Brunner M. Circadian clocks and energy metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(14):2667-80. doi: [10.1007/s00018-014-1574-7](https://doi.org/10.1007/s00018-014-1574-7)
152. Bayram A, Mehri İ. Sirtuin Genleri ve İşlevleri. *Firat Tıp Derg/Firat Med J*. 2013;18:136-40.
153. Pan X, Hussain MM. Clock is important for food and circadian regulation of macronutrient absorption in mice. *J Lipid Res*. 2009;50(9):1800-13. doi: [10.1194/jlr.M900085-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.M900085-JLR200)

154. Fatima N, Rana S. Metabolic implications of circadian disruption. *Pflugers Arch.* 2020;472(5):513-26. doi: [10.1007/s00424-020-02381-6](https://doi.org/10.1007/s00424-020-02381-6)
155. Touitou Y, Reinberg A, Touitou D. Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption. *Life Sci.* 2017;173:94-106. doi: [10.1016/j.lfs.2017.02.008](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.02.008)
156. Пішак ВП, Булик РЄ, Власова КВ. Молекулярно-генетичні механізми часової організації фізіологічних функцій у ссавців (огляд літератури та власні дані). *Буковинський медичний вісник.* 2014;18(1):172-7. doi: [10.24061/2413-0737.XVIII.1.69.2014.44](https://doi.org/10.24061/2413-0737.XVIII.1.69.2014.44)
157. Ibarra-Coronado EG, Pantaleón-Martínez AM, Velazquéz-Moctezuma J, Prospéro-García O, Méndez-Díaz M, Pérez-Tapia M, et al. The Bidirectional Relationship between Sleep and Immunity against Infections. *J Immunol Res* [Internet]. 2015[cited 2021 Aug 12];2015:678164. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4568388/pdf/JIR2015-678164.pdf> doi: [10.1155/2015/678164](https://doi.org/10.1155/2015/678164)
158. Lange T, Dimitrov S, Born J. Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1193:48–59. doi: [10.1111/j.1749-6632.2009.05300.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05300.x)
159. Besedovsky L, Lange T, Born J. Sleep and immune function. *Pflugers Arch.* 2012;463(1):121-37. doi: [10.1007/s00424-011-1044-0](https://doi.org/10.1007/s00424-011-1044-0)
160. Ziaeeian B, Fonarow GC. Statins and the Prevention of Heart Disease. *JAMA Cardiol* [Internet]. 2017[cited 2021 Aug 05];2(4):464. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7667668/pdf/nihms-1643396.pdf> doi: [10.1001/jamacardio.2016.4320](https://doi.org/10.1001/jamacardio.2016.4320)
161. Edgar RS, Stangherlin A, Nagy AD, Nicoll MP, Efstathiou S, O'Neill JS, et al. Cell autonomous regulation of herpes and influenza virus infection by the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(36):10085-90. doi: [10.1073/pnas.1601895113](https://doi.org/10.1073/pnas.1601895113)

162. Mazzocchi G, Vinciguerra M, Carbone A, Relógio A. The Circadian Clock, the Immune System, and Viral Infections: The Intricate Relationship Between Biological Time and Host-Virus Interaction. *Pathogens* [Internet]. 2020[cited 2021 Aug 14];9(2):83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7168639/pdf/pathogens-09-00083.pdf> doi: [10.3390/pathogens9020083](https://doi.org/10.3390/pathogens9020083)
163. Zhuang X, Forde D, Tsukuda S, D'Arienzo V, Mailly L, Harris JM, et al. Circadian control of hepatitis B virus replication. *Nat Commun* [Internet]. 2021[cited 2021 Oct 02];12:1658. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7955118/pdf/41467_2021_Article_21821.pdf doi: [10.1038/s41467-021-21821-0](https://doi.org/10.1038/s41467-021-21821-0)
164. Rijo-Ferreira F, Carvalho T, Afonso C, Sanches-Vaz M, Costa RM, Figueiredo LM, et al. Sleeping sickness is a circadian disorder. *Nat Commun* [Internet]. 2018[cited 2021 Sep 07];9(1):62. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5754353/pdf/41467_2017_Article_2484.pdf doi: [10.1038/s41467-017-02484-2](https://doi.org/10.1038/s41467-017-02484-2)
165. Meng Y, Zhu V, Zhu Y. Co-distribution of Light At Night (LAN) and COVID-19 incidence in the United States. *BMC Public Health* [Internet]. 2021[cited 2021 Aug 19];21:1509. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8335974/pdf/12889_2021_Article_11500.pdf doi: [10.1186/s12889-021-11500-6](https://doi.org/10.1186/s12889-021-11500-6)
166. Edgar RS, Stangherlin A, Nagy AD, Nicoll MP, Efstathiou S, O'Neill JS, et al. Cell autonomous regulation of herpes and influenza virus infection by the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(36):10085-90. doi: [10.1073/pnas.1601895113](https://doi.org/10.1073/pnas.1601895113)
167. Tony AA, Tony EA, Ali SB, Ezzeldin AM, Mahmoud AA. COVID-19-associated sleep disorders: A case report. *Neurobiol Sleep Circadian Rhythms* [Internet]. 2020[cited 2021 Nov 05];9:100057. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7486182/pdf/main.pdf> doi: [10.1016/j.nbscr.2020.100057](https://doi.org/10.1016/j.nbscr.2020.100057)

168. Das G, Mukherjee N, Ghosh S. Neurological insights of COVID-19 pandemic. *ACS Chem Neurosci.* 2020;11(9):1206-9. doi: [10.1021/acscchemneuro.0c00201](https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00201)
169. Мелёхин АИ. Нарушения сна в период пандемии covid-19: специфика, психологическое обследование и психотерапия. *Вестник Удмуртского университета. Серия Философия. Психология. Педагогика.* 2021;31(1):27-38. doi: [10.35634/2412-9550-2021-31-1-27-38](https://doi.org/10.35634/2412-9550-2021-31-1-27-38)
170. Besedovsky L, Lange T, Haack M. The sleep-immune crosstalk in health and disease. *Physiol Rev.* 2019;99(10):1325–80. doi: [10.1152/physrev.00010.2018](https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2018)
171. Erdemir İ, Tufekcioglu E. The Comparison of Some Physiological and Physical Parameters Affecting Cortisol Circadian Rhythm. *Balıkesir Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi.* 2008;11:1-10.
172. Zada D, Bronshtein I, Lerer-Goldshtein T, Garini Y, Appelbaum L. Sleep increases chromosome dynamics to enable reduction of accumulating DNA damage in single neurons. *Nat Commun* [Internet]. 2019[cited 2021 Sep 14];10(1):895. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-08806-w.pdf> doi: [10.1038/s41467-019-08806-w](https://doi.org/10.1038/s41467-019-08806-w)
173. Zada D, Sela Y, Matosevich N, Monsonogo A, Lerer-Goldshtein T, Nir Y, et al. Parp1 promotes sleep, which enhances DNA repair in neurons. *Mol Cell.* 2021;81(24):4979-93. doi: [10.1016/j.molcel.2021.10.026](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.10.026)
174. Юматов ЕА, Глазачев ОС, Быкова ЕВ, Потапова ОВ, Дудник ЕН, Перцов СС. Взаимосвязь эмоционального стресса и сна. *Вестник Международной академии наук. Русская секция.* 2016;1:5-14.
175. Корешкина МИ. Головные боли и расстройства сна. *Медицинский алфавит.* 2018;3(27):30-5.
176. Захарчук ОІ, Пішак ВП, Кривчанська МІ. Біологічні ритми і сон. *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Медицина.* 2013;2:145-9.

177. Satyanarayanan SK, Su H, Lin YW, Su KP. Circadian Rhythm and Melatonin in the Treatment of Depression. *Curr Pharm Des.* 2018;24(22):2549-55. doi: [10.2174/1381612824666180803112304](https://doi.org/10.2174/1381612824666180803112304)
178. Ляшенко ЕА, Левин ОС. Расстройства сна в клинической практике. *Современная терапия в психиатрии и неврологии.* 2017;1:22-8.
179. Gold AK, Kinrys G. Treating Circadian Rhythm Disruption in Bipolar Disorder. *Curr Psychiatry Rep* [Internet]. 2019[cited 2021 Sep 04];21(3):14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6812517/pdf/nihms-1054655.pdf> doi: [10.1007/s11920-019-1001-8](https://doi.org/10.1007/s11920-019-1001-8)
180. Riemann D, Krone LB, Wulff K, Nissen C. Sleep, insomnia, and depression. *Neuropsychopharmacology.* 2020;45(1):74-89. doi: [10.1038/s41386-019-0411-y](https://doi.org/10.1038/s41386-019-0411-y)
181. Магомедова КА, Полуэктов МГ. Особенности нарушений сна у больных пожилого возраста. *Медико-социальная экспертиза и реабилитация.* 2013;3:44-6.
182. Xie Z, Chen F, Li WA, Geng X, Li C, Meng X, et al. A review of sleep disorders and melatonin. *Neurol Res.* 2017;39(6):559-65. doi: [10.1080/01616412.2017.1315864](https://doi.org/10.1080/01616412.2017.1315864)
183. Яковлева ОВ, Полуэктов МГ, Ляшенко ЕА, Левин ОС. Сон и когнитивные нарушения при нейродегенеративных заболеваниях. *Журнал неврологии и психиатрии.* 2019;119(4-2):89-98. doi: [10.17116/jnevro201911904289](https://doi.org/10.17116/jnevro201911904289)
184. Hoevenaar-Blom MP, Spijkerman AMW, Kromhout D, van den Berg JF, Verschuren WMM. Sleep duration and sleep quality in relation to 12-year cardiovascular disease incidence: the MORGEN Study. *SLEEP.* 2011;34(11):1487-92. doi: [10.5665/sleep.1382](https://doi.org/10.5665/sleep.1382)
185. Наумов АВ, Конюх ЕА. Мелатонин: медико-биологические функции. *Проблемы здоровья и экологии.* 2011;3:132-6.

186. Азимова ЮЭ. Кластерная головная боль и гипническая головная боль: роль мелатонинергической системы. *Нервные болезни*. 2018;3:40-2. doi: [10.24411/2226-0757-2018-12032](https://doi.org/10.24411/2226-0757-2018-12032)
187. Troynikov O, Watson CG, Nawaz N. Sleep environments and sleep physiology: A review. *J Therm Biol*. 2018;78:192-203. doi: [10.1016/j.jtherbio.2018.09.012](https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.09.012)
188. Hölker F, Moss T, Griefahn B, Kloas W, Voigt CC, Henckel D, et al. The dark side of light: A transdisciplinary research agenda for light. *Ecol Soc* [Internet]. 2010[cited 2021 Dec 01];15(4):13. Available from: <https://www.ecologyandsociety.org/vol15/iss4/art13/> doi: [10.5751/ES-03685-150413](https://doi.org/10.5751/ES-03685-150413)
189. Kyba CCM, Kuester T, de Miguel AS, Baugh K, Jechow A, Hölker F, et al. Artificially lit surface of Earth at night increasing in radiance and extent. *Sci Adv* [Internet]. 2017[cited 2021 Aug 11];3(11):e1701528. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5699900/pdf/1701528.pdf> doi: [10.1126/sciadv.1701528](https://doi.org/10.1126/sciadv.1701528)
190. Tähkämö L, Partonen T, Pesonen AK. Systematic review of light exposure impact on human circadian rhythm. *Chronobiol Int*. 2019;36(2):151-70. doi: [10.1080/07420528.2018.1527773](https://doi.org/10.1080/07420528.2018.1527773)
191. Пішак ВП, Висоцька ВГ, Магальяс ВМ, Булик РС, Дікал МВ. Лабораторні тварини в медико-біологічних експериментах. Черніці: Медуніверситет; 2006. 350с.
192. Багрій ММ, Діброва ВА, редактори. Методики морфологічних досліджень. Вінниця: Нова книга; 2016. 328 с.
193. Давиденко ІС, Грицюк МІ, Давиденко ОМ. Методика кількісної оцінки результатів гістохімічної реакції з бромфеноловим синім для встановлення співвідношення між аміно- та карбоксильними групами в білках. *Вісник морської медицини*. 2017;4:141-8.
194. Ferreira T, Rasband W. ImageJ. User Guide. Fiji 1.46. New York: National Institute of Health; 2012. 187 p.

195. Горальський ЛП, редактор. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології. Житомир: Полісся; 2015. 286 с.
196. Hammer Ø. PAST: Paleontological Statistics. Version 4.3. Reference manual. Oslo: Natural History Museum University of Oslo; 2020. 228 p.
197. Mayo JC, Sainz RM, González-Menéndez P, Hevia D, Cernuda-Cernuda R. Melatonin transport into mitochondria. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(21):3927-40. doi: [10.1007/s00018-017-2616-8](https://doi.org/10.1007/s00018-017-2616-8)
198. Сметанюк ОВ, Булик РЄ, Булик ТС, Кривчанська МІ. Вплив світлової депривації на морфофункціональний стан нейронів надзорних ядер гіпоталамуса щурів. *Клінічна та експериментальна патологія* 2020;19(4):61-7. doi: [10.24061/1727-4338.XIX.4.74.2020.9](https://doi.org/10.24061/1727-4338.XIX.4.74.2020.9)
199. Пішак ВП, Абрамов АВ, Булик РЄ. Характеристика медіального дрібноклітинного субядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса при світловому стресі. *Патологія.* 2008;5(3):155.
200. Долгов ОМ. Нервова тканина. Матеріали для самостійної роботи з гістології з основами ембріології. Вінниця; 2016. 44 с.
201. Булик РЄ. Вплив зруйнування супрахіазматичних ядер гіпоталамуса на циркадіанну щільність рецепторів мелатоніну 1А у нейронах гіпокампа щурів. *Патологія.* 2008;5(1):54-7.
202. Давиденко ІС, Булик РЄ, Тимофій ОВ. Аналіз щільності мелатонінових рецепторів у нейронах паравентрикулярних ядер гіпоталамуса щурів за модифікацій фотоперіоду та уведення мелатоніну. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія.* 2015;14(4):91-4. doi: [10.24061/1727-0847.14.4.2015.20](https://doi.org/10.24061/1727-0847.14.4.2015.20)
203. Власова КВ, Давиденко ІС, Булик РЄ. Імуногістохімічний аналіз щільності мелатонінових рецепторів 1А типу в нейронах супраоптичного ядра гіпоталамуса білих щурів за зміненого фотоперіоду. *Вісник морфології.* 2015;21(2):317-20.
204. Пішак ВП, Кривчанська МІ, Громик ОО. Антипроліферативні властивості мелатоніну. *Патологічні стани і сучасні технології.* 2013;2:25-30.

205. Батурина МВ, Бейер ЭВ, Журбин СА, Филь АА. Влияние хронического введения нейролептиков на содержание в крови белка s100 и уровень аутоантител к нему у крыс. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2020;15(4):573-6. doi: [10.14300/mnnc.2020.15136](https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15136)

206. Васильева ІМ, Шевченко ОО, Красносельський МВ, Жуков ВІ, Богдан ЮА. Стан окислювальної модифікації білків сироватки крові у хворих на рак шлунка та їх прогностичне значення. Вісник проблем біології і медицини. 2015;1:108-11.

207. Голотюк ВВ, Петришин МВ. Особливості динаміки метаболітів окисних модифікацій білків при лікуванні хворих на рак прямої кишки. Прикарпатський вісник НТШ. Пульс. 2016;4:34-40.

208. Ильичева АС, Фомина МА. Состояние окислительного карбонилирования белков мышечных тканей при выраженной гипергомоцистеинемии. Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2015;1:45-51.

209. Іліка ВВ, Давиденко ІС, Давиденко ОМ. Гістохімічна оцінка процесів окиснювальної модифікації білків в ендотеліоцитах кровоносних судин базальної пластинки плаценти при поєднанні запалення посліду та залізодефіцитної анемії вагітних. Клінічна та експериментальна патологія. 2016;15(4):54-7.

210. Singh M, Jadhav HR. Melatonin: functions and ligands. Drug Discov Today. 2014;19(9):1410-8. doi: [10.1016/j.drudis.2014.04.014](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.04.014)

211. Comai S, Gobbi G. Unveiling the role of melatonin MT2 receptors in sleep, anxiety and other neuropsychiatric diseases: a novel target in psychopharmacology. J Psychiatry Neurosci. 2014;39(1):6-21. doi: [10.1503/jpn.130009](https://doi.org/10.1503/jpn.130009)

212. Булик РЄ, Власова КВ. Субмікроскопічні перетворення структур гіпоталамуса за умов цілодобового освітлення. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2020;19(4):5-9. doi: [10.24061/1727-0847.19.4.2020.43](https://doi.org/10.24061/1727-0847.19.4.2020.43)

213. Бурачик АІ, Булик РЄ. Ефекти мелатоніну на ультраструктуру супрахіазматичних ядер гіпоталамуса щурів при світловій стимуляції. Клінічна та експериментальна патологія. 2017;16(1):44-8. doi: [10.24061/1727-4338.XVI.1.59.2017.10](https://doi.org/10.24061/1727-4338.XVI.1.59.2017.10)

214. Михейцева МІ. Протекторна дія мелатоніну за експериментальної глаукоми у щурів. Фізіологічний журнал. 2013;59(1):78-83.

215. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Морфометрична характеристика вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса зрілих щурів за модифікації фотоперіоду. Буковинський медичний вісник. 2020;24(2):9-14. doi: [10.24061/2413-0737.XXIV.2.94.2020.36](https://doi.org/10.24061/2413-0737.XXIV.2.94.2020.36)

216. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Аналіз щільності мелатонінових рецепторів типу 1А у нейронах передньо-бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів за різного світлового режиму. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2020. № 3. С. 45-49. doi: [10.11603/1811-2471.2020.v.i3.11581](https://doi.org/10.11603/1811-2471.2020.v.i3.11581)

217. Булик РЄ, Йосипенко ВР, Власова КВ. Вікові особливості морфометричного стану бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів на тлі різної тривалості фотоперіоду. Вісник проблем біології і медицини. 2021;2:197-200. doi: [10.29254/2077-4214-2021-2-160-197-200](https://doi.org/10.29254/2077-4214-2021-2-160-197-200)

218. Йосипенко ВР, Булик РЄ, Кривчанська МІ, Лукань ЮР. Ультраструктурна організація нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса старих щурів за різних умов освітлення. Клінічна та експериментальна патологія. 2021;20(3):28-33. doi: [10.24061/1727-4338.XX.3.77.2021.4](https://doi.org/10.24061/1727-4338.XX.3.77.2021.4)

219. Bulyk RYe, Yosyenko VR, Vlasova KV. Ontogenetic aspects of melatonin receptors 1A density in the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus under various light conditions. Wiad Lek. 2021;74(9 Cz 1):2202-6. doi: [10.36740/WLek202109131](https://doi.org/10.36740/WLek202109131)

220. Bulyk RYe, Yosyenko VR. Effect of melatonin on daily oscillations of the density of melatonin receptors 1A in neurons of the lateral preoptic nucleus

of the hypothalamus in rats under different light mode. Deutscher Wissenschaftsherold. German Science Herald. 2021;1:32-5. doi: [10.19221/202117](https://doi.org/10.19221/202117)

221. Bulyk RYe, Yosypenko VR. Characteristics of density of melatonin receptors of type 1B in neurons of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus under different light modes. Proceedings of the 9th International Scientific and Practical Conference Challenges in Science of Nowadays; 2021 Jul 16-18; Washington, USA. InterConf. 2021;66:344-9.

222. Bulyk RYe, Yosypenko VR, Kryvchanska MI, Vlasova KV, Lukan YR. Age changes in the tigroid substance of neurons of the lateral preoptic nucleus of hypothalamus under different light modes. Journal of Education, Health and Sport. 2021;11(10): 269-74. doi: [10.12775/JEHS.2021.11.10.025](https://doi.org/10.12775/JEHS.2021.11.10.025)

223. Bulyk RYe, Vlasova KV, Kushniryk OV, Yosypenko VR. Oscillations of the melatonin receptors density in the magnocellular neurons of hypothalamic supraoptic nucleus under the condition of altered photoperiod and injections of melatonin. В: Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю Вікові та хронобіологічні аспекти медицини і фармації; 2018 Жов 4-5; Чернівці. Чернівці: БДМУ; 2018, с. 18-9.

224. Йосипенко ВР. Роль вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса в регуляції циклу “сон-неспання”. ВІМСО Journal. 2019;2019:196.

225. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Онтогенетичні особливості щільності мелатонінових рецепторів у нейронах вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса. В: Матеріали міжнар. наук-практ. конф. Охорона та захист здоров'я людини в умовах сьогодення; 2019 Лис 1-2; Київ. Київ: Київський медичний науковий центр; 2019, с. 10-1.

226. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Імуногістохімічні особливості вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса щурів на фоні постійного освітлення та уведення мелатоніну. In: Proceedings of IV International Scientific and Practical Conference Priority directions of science development; 2020 Feb 3-4; Lviv, Ukraine. Lviv; 2020, p. 84-5.

227. Yosyenko VR. Age characteristics of the density of melatonin receptors in the neurons of the ventrolateral preoptic nucleus of the hypothalamus under the light stimulation. В: Бойчук ТМ, Івашук ОІ, Безрук ВВ, редактори. Матеріали 101-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»; 2020 Лют 10, 12, 17; Чернівці. Чернівці; 2020, с. 66.

228. Йосипенко ВР. Порівняльна характеристика щільності рецепторів 1А до мелатоніну в нейронах вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса за умов світлової стимуляції. ВІМСО Journal. 2020;2020:181.

229. Bulyk RYe, Yosyenko VR. Age characteristics of morphometric changes of the anterior-lateral preoptic nucleus of the hypothalamus of rats. In: Natural Science Readings; 2020 May 28-30; Bratislava. Bratislava; 2020, p. 35-3.

230. Bulyk RYe, Yosyenko VR. Influence of light stimulation on age features of the anterior-lateral preoptic nucleus of the hypothalamus. In: Proceedings of the 1st International scientific and practical conference Actual trends of modern scientific research; 2020 Jul 19-21; Munich, Germany. Munich: MDPC Publishing; 2020, p. 46-8.

231. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Вікові морфометричні зміни нейронів передньо-бічного передзорового ядра гіпоталамуса за умов світлової депривації. В: Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. Вітчизняна та світова медицина: вимоги сьогодення; 2020 Жов 9-10; Дніпро. Дніпро: Організація наукових медичних досліджень «Salutem»; 2020, с. 5-8.

232. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Гістохімічні особливості тигроїдної субстанції нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса зрілих і старих щурів за умови світлової стимуляції. В: Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. Нові досягнення у галузі медичних та фармацевтичних наук; 2020 Лис 20-21; Одеса. Одеса: Південна фундація медицини; 2020, с. 80-3.

233. Yosyenko VR. Correction of immunohistochemical disorders of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus of mature rates caused by constant

lighting. В: Бойчук ТМ, Івашук ОІ, Безрук ВВ, редактори. Матеріали підсумкової 102-ї наук.- практ. конф. з міжнар. участю професорсько-викладацького персоналу Буковинського державного медичного університету; 2021 Лют 08, 10, 15; Чернівці. Чернівці: Медуніверситет; 2021, с. 66-7.

234. Йосипенко ВР. Вплив мелатоніну на щільність тигроїдної субстанції бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів. *VIMCO Journal*. 2021;2021:117.

235. Potdar M, Yosyenko VR. The role of melatonin in sleep regulation. *VIMCO Journal*. 2021;2021:115.

236. Йосипенко ВР, Булик РЄ. Вікові відмінності щільності мелатонінових рецепторів типу 1В у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса. В: Матеріали VII Національного конгресу геронтологів і геріатрів України; 2021 Жов 6-8; Київ. Київ; 2021, с. 21.

237. Булик РЄ, Йосипенко ВР, Волошин ВЛ. Особливості вікових змін окиснювальної модифікації білків у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів при цілодобовому освітленні. В: Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. Актуальні досягнення медичних наукових досліджень в Україні та країнах ближнього зарубіжжя; 2021 Жов 1-2; Київ. Київ: Київський медичний науковий центр; 2021, с. 5-7.

238. Булик РЄ, Йосипенко ВР, Кривчанська МІ. Показники окисної модифікації білків у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів при світловій стимуляції. In: *Proceedings of 3rd International scientific and practical conference Topical issues of modern science, society and education*; 2021 Oct 3-5; Kharkiv, Ukraine. Kharkiv: SPC-Sci-conf.com.ua; 2021, p. 135-6.

239. Йосипенко ВР, Булик РЄ. Вплив модифікацій фотоперіоду на ультраструктурний стан нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса старих щурів. In: *Proceedings of V International Scientific and Practical Conference Science, innovations and education: problems and prospects*; 2021 Dec 8-10; Tokyo, Japan. Tokyo; 2021, p. 167-9.

240. Bulyk R, Yosypenko V, Vlasova K, Voloshyn H. Effect of melatonin on indicators of oxide modification of proteins in neurons of the lateral preoptic nuclei of rat hypothalamus under light stress. In: Proceedings of XIV International Scientific and Practical Conference Theoretical foundations in practice and science; 2021 Dec 21-24; Bilbao, Spain. Bilbao; 2021, p. 257-9.

241. Булик РЄ, Кривчанська МІ, Йосипенко ВР, винахідники; Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет»; патентовласник. Спосіб моделювання морфологічних порушень шишкоподібної залози у щурів. Патент України № 143485. 2020 Лип 27.

242. Булик РЄ, Кривчанська МІ, Йосипенко ВР, Махрова ЄГ, винахідники; Буковинський державний медичний університет; патентовласник. Спосіб експериментального порушення циркадіанної організації ренальних функцій у щурів в умовах різної тривалості фотоперіоду. Патент України № 147909. 2021 Чер 17.

Додаток А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

○ НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Морфометрична характеристика вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса зрілих щурів за модифікації фотоперіоду. *Буковинський медичний вісник*. 2020;24(2):9-14. doi: [10.24061/2413-0737.XXIV.2.94.2020.36](https://doi.org/10.24061/2413-0737.XXIV.2.94.2020.36)

2. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Аналіз щільності мелатонінових рецепторів типу 1А у нейронах передньо-бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів за різного світлового режиму. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2020. № 3. С. 45-49. doi: [10.11603/1811-2471.2020.v.i3.11581](https://doi.org/10.11603/1811-2471.2020.v.i3.11581)

3. Булик РЄ, Йосипенко ВР, Власова КВ. Вікові особливості морфометричного стану бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів на тлі різної тривалості фотоперіоду. *Вісник проблем біології і медицини*. 2021;2:197-200. doi: [10.29254/2077-4214-2021-2-160-197-200](https://doi.org/10.29254/2077-4214-2021-2-160-197-200)

4. Йосипенко ВР, Булик РЄ, Кривчанська МІ, Лукань ЮР. Ультраструктурна організація нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса старих щурів за різних умов освітлення. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2021;20(3):28-33. doi: [10.24061/1727-4338.XX.3.77.2021.4](https://doi.org/10.24061/1727-4338.XX.3.77.2021.4)

5. Bulyk RYe, Yosyenko VR, Vlasova KV. Ontogenetic aspects of melatonin receptors 1A density in the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus under various light conditions. *Wiad Lek*. 2021;74(9 Cz 1):2202-6. doi: [10.36740/WLek202109131](https://doi.org/10.36740/WLek202109131)

6. Bulyk RYe, Yosyenko VR. Effect of melatonin on daily oscillations of the density of melatonin receptors 1A in neurons of the lateral preoptic nucleus of the

hypothalamus in rats under different light mode. *Deutscher Wissenschaftsherold. German Science Herald*. 2021;1:32-5. doi: [10.19221/202117](https://doi.org/10.19221/202117)

7. Bulyk RYe, Yosypenko VR. Characteristics of density of melatonin receptors of type 1B in neurons of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus under different light modes. *Proceedings of the 9th International Scientific and Practical Conference Challenges in Science of Nowadays*; 2021 Jul 16-18; Washington, USA. InterConf. 2021;66:344-9.

8. Bulyk RYe, Yosypenko VR, Kryvchanska MI, Vlasova KV, Lukan YR. Age changes in the tigroid substance of neurons of the lateral preoptic nucleus of hypothalamus under different light modes. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021;11(10): 269-74. doi: [10.12775/JEHS.2021.11.10.025](https://doi.org/10.12775/JEHS.2021.11.10.025)

○ НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

9. Bulyk RYe, Vlasova KV, Kushniryk OV, Yosypenko VR. Oscillations of the melatonin receptors density in the magnocellular neurons of hypothalamic supraoptic nucleus under the condition of altered photoperiod and injections of melatonin. В: *Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю Вікові та хронобіологічні аспекти медицини і фармації*; 2018 Жов 4-5; Чернівці. Чернівці: БДМУ; 2018, с. 18-9.

10. Йосипенко ВР. Роль вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса в регуляції циклу “сон-неспанья”. *VIMCO Journal*. 2019;2019:196.

11. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Онтогенетичні особливості щільності мелатонінових рецепторів у нейронах вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса. В: *Матеріали міжнар. наук-практ. конф. Охорона та захист здоров'я людини в умовах сьогодення*; 2019 Лис 1-2; Київ. Київ: Київський медичний науковий центр; 2019, с. 10-1.

12. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Імуногістохімічні особливості вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса щурів на фоні постійного освітлення та уведення мелатоніну. In: Proceedings of IV International Scientific and Practical Conference *Priority directions of science development*; 2020 Feb 3-4; Lviv, Ukraine. Lviv; 2020, p. 84-5.

13. Yosyenko VR. Age characteristics of the density of melatonin receptors in the neurons of the ventrolateral preoptic nucleus of the hypothalamus under the light stimulation. В: Бойчук ТМ, Іващук ОІ, Безрук ВВ, редактори. Матеріали 101-ї підсумкової наукової конференції професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»; 2020 Лют 10, 12, 17; Чернівці. Чернівці; 2020, с. 66.

14. Йосипенко ВР. Порівняльна характеристика щільності рецепторів 1А до мелатоніну в нейронах вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса за умов світлової стимуляції. *BIMCO Journal*. 2020;2020:181.

15. Bulyk RYe, Yosyenko VR. Age characteristics of morphometric changes of the anterior-lateral preoptic nucleus of the hypothalamus of rats. In: *Natural Science Readings*; 2020 May 28-30; Bratislava. Bratislava; 2020, p. 35-3.

16. Bulyk RYe, Yosyenko VR. Influence of light stimulation on age features of the anterior-lateral preoptic nucleus of the hypothalamus. In: Proceedings of the 1st International scientific and practical conference *Actual trends of modern scientific research*; 2020 Jul 19-21; Munich, Germany. Munich: MDPC Publishing; 2020, p. 46-8.

17. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Вікові морфометричні зміни нейронів передньо-бічного передзорового ядра гіпоталамуса за умов світлової депривації. В: Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. *Вітчизняна та світова медицина: вимоги сьогодення*; 2020 Жов 9-10; Дніпро. Дніпро: Організація наукових медичних досліджень «Salutem»; 2020, с. 5-8.

18. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Гістохімічні особливості тигроїдної субстанції нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса зрілих і старих

щурів за умови світлової стимуляції. В: Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. *Нові досягнення у галузі медичних та фармацевтичних наук*; 2020 Лис 20-21; Одеса. Одеса: Південна фундація медицини; 2020, с. 80-3.

19. Yosypenko VR. Correction of immunohistochemical disorders of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus of mature rates caused by constant lighting. В: Бойчук ТМ, Івашук ОІ, Безрук ВВ, редактори. Матеріали підсумкової *102-ї наук.- практи. конф. з міжнар. участю професорсько-викладацького персоналу Буковинського державного медичного університету*; 2021 Лют 08, 10, 15; Чернівці. Чернівці: Медуніверситет; 2021, с. 66-7.

20. Йосипенко ВР. Вплив мелатоніну на щільність тигроїдної субстанції бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів. *VIMCO Journal*. 2021;2021:117.

21. Potdar M, Yosypenko VR. The role of melatonin in sleep regulation. *VIMCO Journal*. 2021;2021:115.

22. Йосипенко ВР, Булик РЄ. Вікові відмінності щільності мелатонінових рецепторів типу 1В у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса. В: Матеріали *VII Національного конгресу геронтологів і геріатрів України*; 2021 Жов 6-8; Київ. Київ; 2021, с. 21.

23. Булик РЄ, Йосипенко ВР, Волошин ВЛ. Особливості вікових змін окиснювальної модифікації білків у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів при цілодобовому освітленні. В: Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. *Актуальні досягнення медичних наукових досліджень в Україні та країнах ближнього зарубіжжя*; 2021 Жов 1-2; Київ. Київ: Київський медичний науковий центр; 2021, с. 5-7.

24. Булик РЄ, Йосипенко ВР, Кривчанська МІ. Показники окисної модифікації білків у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів при світловій стимуляції. In: Proceedings of 3rd International scientific and practical conference *Topical issues of modern science, society and education*; 2021 Oct 3-5; Kharkiv, Ukraine. Kharkiv: SPC-Sci-conf.com.ua; 2021, p. 135-6.

25. Йосипенко ВР, Булик РЄ. Вплив модифікацій фотоперіоду на ультраструктурний стан нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса старих щурів. In: Proceedings of V International Scientific and Practical Conference *Science, innovations and education: problems and prospects*; 2021 Dec 8-10; Tokyo, Japan. Tokyo; 2021, p. 167-9.

26. Bulyk R, Yosyenko V, Vlasova K, Voloshyn H. Effect of melatonin on indicators of oxide modification of proteins in neurons of the lateral preoptic nuclei of rat hypothalamus under light stress. In: Proceedings of XIV International Scientific and Practical Conference *Theoretical foundations in practice and science*; 2021 Dec 21-24; Bilbao, Spain. Bilbao; 2021, p. 257-9.

○ **НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ДОДАТКОВО ВІДОБРАЖАЮТЬ
НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ**

27. Булик РЄ, Кривчанська МІ, Йосипенко ВР, винахідники; Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет»; патентовласник. Спосіб моделювання морфологічних порушень шишкоподібної залози у щурів. Патент України № 143485. 2020 Лип 27.

28. Булик РЄ, Кривчанська МІ, Йосипенко ВР, Махрова ЄГ, винахідники; Буковинський державний медичний університет; патентовласник. Спосіб експериментального порушення циркадіанної організації ренальних функцій у щурів в умовах різної тривалості фотоперіоду. Патент України № 147909. 2021 Чер 17.

Додаток Б**ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Вікові та хронобіологічні аспекти медицини і фармації» (м. Чернівці, 4-5 жовтня 2018р.);

(Bulyk RYe, Vlasova KV, Kushniryk OV, Yosypenko VR. Oscillations of the melatonin receptors density in the magnocellular neurons of hypothalamic supraoptic nucleus under the condition of altered photoperiod and injections of melatonin)

Форма участі – заочна.

2. VI Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих учених «ВІМСО» (м. Чернівці, 2-5 квітня 2019р.);

(Йосипенко ВР. Роль вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса в регуляції циклу “сон-неспання”)

Форма участі – виступ на секційному засіданні.

3. Міжнародна науково-практична конференція «Охорона та захист здоров'я людини в умовах сьогодення» (м. Київ, 1-2 листопада 2019р.);

(Булик РЄ, Йосипенко ВР. Онтогенетичні особливості щільності мелатонінових рецепторів у нейронах вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса)

Форма участі – заочна.

4. IV International Scientific and Practical Conference “Priority directions of science development” (Feb 3-4, 2020, Lviv, Ukraine);

(Булик РЄ, Йосипенко ВР. Імуногістохімічні особливості вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса щурів на фоні постійного освітлення та уведення мелатоніну)

Форма участі – заочна.

5. 101-а підсумкова наукова конференція професорсько-викладацького персоналу Вищого державного навчального закладу України «Буковинський

державний медичний університет» (м. Чернівці, 10, 12, 17 лютого 2020р.);
(Yosypenko VR. Age characteristics of the density of melatonin receptors in the neurons of the ventrolateral preoptic nucleus of the hypothalamus under the light stimulation)

Форма участі – виступ на секційному засіданні.

6. VII Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих учених «ВІМСО» (м. Чернівці, 7-8 квітня 2020р.);

(Йосипенко ВР. Порівняльна характеристика щільності рецепторів 1А до мелатоніну в нейронах вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса за умов світлової стимуляції)

Форма участі – заочна.

7. 5th International Scientific-Practical Conference “NATURAL SCIENCE READINGS” (May 28-30, 2020, Bratislava);

(Bulyk RYe, Yosypenko VR. Age characteristics of morphometric changes of the anterior-lateral preoptic nucleus of the hypothalamus of rats)

Форма участі – заочна.

8. 1st International scientific and practical conference “Actual trends of modern scientific research” (Jul 19-21, 2020, Munich, Germany);

(Bulyk RYe, Yosypenko VR. Influence of light stimulation on age features of the anterior-lateral preoptic nucleus of the hypothalamus)

Форма участі – заочна.

9. Міжнародна науково-практична конференція «Вітчизняна та світова медицина: вимоги сьогодення» (м. Дніпро, 9-10 жовтня 2020р.);

(Булик РЄ, Йосипенко ВР. Вікові морфометричні зміни нейронів передньо-бічного передзорового ядра гіпоталамуса за умов світлової депривації)

Форма участі – заочна.

10. Міжнародна науково-практична конференція «Нові досягнення у галузі медичних та фармацевтичних наук» (м. Одеса, 20-21 листопада 2020р.);

(Булик РЄ, Йосипенко ВР. Гістохімічні особливості тигроїдної субстанції нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса зрілих і старих щурів за умови світлової стимуляції)

Форма участі – заочна.

11. 102-а науково-практична конференція з міжнародною участю професорсько-викладацького персоналу Буковинського державного медичного університету (м. Чернівці, 08, 10, 15 лютого 2021р.);

(Yosypenko VR. Correction of immunohistochemical disorders of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus of mature rates caused by constant lighting)

Форма участі – виступ на секційному засіданні.

12. VIII Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих учених «BIMCO» (м. Чернівці, 6-9 квітня 2021р.);

(Йосипенко ВР. Вплив мелатоніну на щільність тигроїдної субстанції бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів)

Форма участі – виступ на секційному засіданні.

13. VIII International Medical and Pharmaceutical Congress of Students and Young Scientists «BIMCO» (April 6-9, 2021, Chernivtsi, Ukraine);

(Potdar M, Yosypenko VR. The role of melatonin in sleep regulation)

Форма участі – заочна.

14. Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні досягнення медичних наукових досліджень в Україні та країнах ближнього зарубіжжя» (м. Київ, 1-2 жовтня 2021р.);

(Булик РЄ, Йосипенко ВР, Волошин ВЛ. Особливості вікових змін окиснювальної модифікації білків у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів при цілодобовому освітленні)

Форма участі – заочна.

15. VII Національний конгрес геронтологів і геріатрів України (м. Київ, 6-8 жовтня 2021р.);

(Йосипенко ВР, Булик РЄ. Вікові відмінності щільності мелатонінових рецепторів типу 1В у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса)

Форма участі – виступ на секційному засіданні.

16. 3rd International scientific and practical conference «Topical issues of modern science, society and education» (Oct 3-5, 2021, Kharkiv, Ukraine);

(Булик РЄ, Йосипенко ВР, Кривчанська МІ. Показники окисної модифікації білків у нейронах бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів при світловій стимуляції)

Форма участі – заочна.

17. V International Scientific and Practical Conference Science, innovations and education: problems and prospects (Dec 8-10, 2021, Tokyo, Japan);

(Йосипенко ВР, Булик РЄ. Вплив модифікацій фотоперіоду на ультраструктурний стан нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса старих щурів)

Форма участі – заочна.

18. XIV International Scientific and Practical Conference Theoretical foundations in practice and science (Dec 21-24, 2021, Bilbao, Spain);

(Bulyk R, Yosypenko V, Vlasova K, Voloshyn H. Effect of melatonin on indicators of oxide modification of proteins in neurons of the lateral preoptic nuclei of rat hypothalamus under light stress)

Форма участі – заочна.

Додаток В

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
Івано-Франківського національного
медичного університету
д.мед.н., професор: Ігор ВАКАЛЮК
" 8 " 10 / 2021 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: матеріали дисертаційної роботи "Онтогенетичні особливості структур переднього гіпоталамуса щурів за модифікації фотоперіоду".

2. Установа-розробник: Буковинський державний медичний університет, кафедра медичної біології та генетики.

Розробник: аспірант Йосипенко Владислав Романович.

3. Джерело інформації:

1. Булик РЄ, Йосипенко ВР, Власова КВ. Вікові особливості морфометричного стану бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів на тлі різної тривалості фотоперіоду. Вісник проблем біології і медицини. 2021; 2 (160): 197 – 200.

2. Bulyk RYe, Yosypenko VR, Vlasova KV. Ontogenetic aspects of melatonin receptors 1A density in the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus under various light conditions. Wiadomości Lekarskie. 2021;74(9 p.1):2202-2206.

3. Bulyk RYe., Yosypenko VR. Effect of melatonin on daily oscillations of the density of melatonin receptors 1A in neurons of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus in rats under different light mode. Deutscher Wissenschaftsherold. German Science Herald. 2021; 1; 32-35. DOI:10.19221/202117

4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра анатомії людини Івано-Франківського національного медичного університету.

5. Термін впровадження: 2021-2022 роки та надалі.

6. Форми впровадження: у матеріали лекцій та практичних занять з анатомії людини, а також у наукову роботу кафедри.

Затверджено на засіданні кафедри (протокол № 3 від 08.10.2021 р.)

Відповідальний за впровадження:
завідувачка кафедри анатомії людини
Івано-Франківського національного
медичного університету,
доктор медичних наук, професор

Оксана ПОПАДИНЕЦЬ

ЗАТВЕРДЖУЮ



Проректор з наукової роботи
Запорізького державного медичного університету

д.мед.н., професор

В.О. Туманський

2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: матеріали дисертаційної роботи “Онтогенетичні особливості структур переднього гіпоталамуса щурів за модифікації фотоперіоду”.

2. Установа-розробник: Буковинський державний медичний університет, кафедра медичної біології та генетики.

Розробник: аспірант Йосипенко Владислав Романович.

3. Джерело інформації:

1. Булик РС, Йосипенко ВР, Власова КВ. Вікові особливості морфометричного стану бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів на тлі різної тривалості фотоперіоду. Вісник проблем біології і медицини. 2021; 2 (160): 197 – 200.

2. Bulyk RYe, Yosypenko VR, Vlasova KV. Ontogenetic aspects of melatonin receptors 1A density in the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus under various light conditions. Wiadomości Lekarskie. 2021;74(9 p.1):2202-2206.

3. Bulyk RYe., Yosypenko VR. Effect of melatonin on daily oscillations of the density of melatonin receptors 1A in neurons of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus in rats under different light mode. Deutscher Wissenschaftsherald. German Science Herald. 2021; 1: 32-35. DOI:10.19221/202117

4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії Запорізького державного медичного університету.

5. Термін впровадження: 2020-2021 навчальний рік.

6. Форми впровадження: у матеріали лекцій та практичних занять з анатомії людини.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри анатомії людини,
оперативної хірургії та топографічної
анатомії Запорізького державного
медичного університету,
доктор медичних наук, професор

О.А. Григор'єва

ЗАТВЕРДЖУЮ



Директор з наукової роботи
Запорізького державного медичного університету

д.мед.н., професор

В.О. Туманський

2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: матеріали дисертаційної роботи "Онтогенетичні особливості структур переднього гіпоталамуса щурів за модифікації фотоперіоду".

2. Установа-розробник: Буковинський державний медичний університет, кафедра медичної біології та генетики.

Розробник: аспірант Йосипенко Владислав Романович.

3. Джерело інформації:

1. Булик РС, Йосипенко ВР, Власова КВ. Вікові особливості морфометричного стану бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів на тлі різної тривалості фотоперіоду. Вісник проблем біології і медицини. 2021; 2 (160): 197 – 200.

2. Bulyk RYe, Yosypenko VR, Vlasova KV. Ontogenetic aspects of melatonin receptors 1A density in the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus under various light conditions. Wiadomości Lekarskie. 2021;74(9 p.1):2202-2206.

3. Bulyk RYe., Yosypenko VR. Effect of melatonin on daily oscillations of the density of melatonin receptors 1A in neurons of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus in rats under different light mode. Deutscher Wissenschaftsherold. German Science Herald. 2021; 1: 32-35. DOI:10.19221/202117

4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології Запорізького державного медичного університету.

5. Термін впровадження: 2020-2021 навчальний рік.

6. Форми впровадження: у матеріали лекцій та практичних занять з нормальної та патологічної фізіології.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри патологічної фізіології
з курсом нормальної фізіології
Запорізького державного
медичного університету,
доктор медичних наук, професор

О.В. Ганчева

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
Буковинського державного медичного університету

д.мед.н., професор Олександр ІВАЩУК

" 12 "



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: матеріали дисертаційної роботи "Онтогенетичні особливості структур переднього гіпоталамуса щурів за модифікації фотоперіоду".

2. Установа-розробник: Буковинський державний медичний університет, кафедра медичної біології та генетики.

Розробник: аспірант Йосипенко Владислав Романович.

3. Джерело інформації:

1. Булик РС., Йосипенко ВР. Аналіз щільності мелатонінових рецепторів типу 1A у нейронах передньо-бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів за різного світлового режиму. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2020; 3: 45-49. DOI 10.11603/1811-2471.2020.v.i3.11581

2. Булик РС, Йосипенко ВР, Власова КВ. Вікові особливості морфометричного стану бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів на тлі різної тривалості фотоперіоду. Вісник проблем біології і медицини. 2021; 2 (160): 197 – 200.

3. Bulyk RYe, Yosypenko VR, Kryvchanska MI, Vlasova KV, Lukan YR. Age changes in the tigroid substance of neurons of the lateral preoptic nucleus of hypothalamus under different light modes. Journal of Education, Health and Sport. 2021;11(10): 269-274. DOI <https://doi.org/10.12775/JEHS.2021.11.10.025>

4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра анатомії людини імені М.Г. Туркевича Буковинського державного медичного університету.

5. Термін впровадження: 2021-2022 роки та надалі.

6. Форми впровадження: у матеріали лекцій та практичних занять з анатомії людини, а також у наукову роботу кафедри.

Затверджено на засіданні кафедри (протокол № 24 від 12.11. 2021р.)

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри анатомії людини
імені М.Г. Туркевича Буковинського
державного медичного університету,
доктор медичних наук, професор

Віктор КРИВЕЦЬКИЙ

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
Буковинського державного медичного університету

д.мед.н., професор Олександр ІВАЦУК

“ 17 ” _____ 2021 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** матеріали дисертаційної роботи “Онтогенетичні особливості структур переднього гіпоталамуса шурів за модифікації фотоперіоду”.
2. **Установа-розробник:** Буковинський державний медичний університет, кафедра медичної біології та генетики.
Розробник: аспірант Йосипенко Владислав Романович.
3. **Джерело інформації:**
 1. Булик РС, Йосипенко ВР. Морфометрична характеристика вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса зрілих шурів за модифікації фотоперіоду. Буковинський медичний вісник. 2020; 24, 2 (94): 9-14. DOI: 10.24061/2413-0737. XXIV.2.94.2020.36
 2. Йосипенко ВР, Булик РС, Кривчанська МІ, Лукань ІОР. Ультраструктурна організація нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса старих шурів за різних умов освітлення. Клінічна та експериментальна патологія. 2021; 20(3): 28-33. DOI:10.24061/1727-4338.XX.3.77.2021.4
 3. Bulyk RYe., Yosypenko VR. Effect of melatonin on daily oscillations of the density of melatonin receptors 1A in neurons of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus in rats under different light mode. Deutscher Wissenschaftsherold. German Science Herald. 2021; 1: 32-35. DOI:10.19221/202117
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра гістології, цитології та ембріології Буковинського державного медичного університету.
5. **Термін впровадження:** 2021-2022 роки та надалі.
6. **Форми впровадження:** введено у навчальний процес - у матеріали лекцій та практичних занять з гістології, цитології та ембріології, а також у наукову роботу кафедри.

Затверджено на засіданні кафедри (протокол № 4 від 16. 11. 2021р.)

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри гістології, цитології
та ембріології Буковинського
державного медичного університету,
доктор медичних наук, професор



Олександр ЦИГИКАЛО

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
Буковинського державного медичного університету

д.мед.н., професор Олександр ІВАЩУК
" 10 " 2021 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: матеріали дисертаційної роботи "Онтогенетичні особливості структур переднього гіпоталамуса щурів за модифікації фотоперіоду".

2. Установа-розробник: Буковинський державний медичний університет, кафедра медичної біології та генетики.

Розробник: аспірант Йосипенко Владислав Романович.

3. Джерело інформації:

1. Булик РС, Йосипенко ВР. Морфометрична характеристика венролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса зрілих щурів за модифікації фотоперіоду. Буковинський медичний вісник. 2020; 24, 2(94): 9-14.

2. Булик РС, Йосипенко ВР, Власова КВ. Вікові особливості морфометричного стану бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів на тлі різної тривалості фотоперіоду. Вісник проблем біології і медицини. 2021; 2 (160): 197 – 200.

3. Bulyk RYe, Yosypenko VR, Vlasova KV. Ontogenetic aspects of melatonin receptors 1A density in the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus under various light conditions. Wiadomości Lekarskie. 2021;74(9 p.I):2202-2206.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра анатомії, клінічної анатомії та оперативної хірургії Буковинського державного медичного університету.

5. Термін впровадження: 2021-2022 роки та надалі.

6. Форми впровадження: введено у навчальний процес – у матеріали лекцій та практичних занять з анатомії, клінічної анатомії та оперативної хірургії.

Затверджено на засіданні кафедри (протокол № 10 від 10.12.2021р.)

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри анатомії,
клінічної анатомії та оперативної хірургії
Буковинського державного медичного університету,
доктор медичних наук, професор

Олександр СЛОБОДЯН

ЗАТВЕРДЖУЮ

Заступник директора з наукової роботи
навчально-наукового центру
«Інститут біології та медицини» Київського
національного університету імені Тараса Шевченка
д.біол.н., професор *Александр* Олександр КОРОТКИЙ
«01» *з грудня* 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Пропозиція для впровадження:** матеріали дисертаційної роботи «Онтогенетичні особливості структур переднього гіпоталамуса щурів за модифікації фотоперіоду».
- 2. Установа-розробник:** Буковинський державний медичний університет, кафедра медичної біології та генетики.
Розробник: аспірант Йосипенко Владислав Романович.
- 3. Джерело інформації:**
 1. Булик РС, Йосипенко ВР, Власова КВ. Вікові особливості морфометричного стану бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів на тлі різної тривалості фотоперіоду. Вісник проблем біології і медицини. 2021; 2 (160): 197 – 200.
 2. Йосипенко ВР, Булик РС, Кривчанська МІ, Лукань ЮР. Ультраструктурна організація нейронів бічного передзорового ядра гіпоталамуса старих щурів за різних умов освітлення. Клінічна та експериментальна патологія. 2021; 20(3): 28-33. DOI:10.24061/1727-4338.XX.3.77.2021.4
 3. Bulyk RYe., Yosypenko VR. Effect of melatonin on daily oscillations of the density of melatonin receptors 1A in neurons of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus in rats under different light mode. Deutscher Wissenschaftsherold. German Science Herald. 2021; 1: 32-35. DOI:10.19221/202117
- 4. Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра клінічної медицини навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.
- 5. Термін впровадження:** 2021-2022 роки та надалі.
- 6. Форми впровадження:** введено у навчальний процес - у матеріали лекцій та практичних занять з анатомії людини, а також у наукову роботу кафедри.

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри клінічної медицини
навчально-наукового центру
«Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка,
доктор медичних наук, професор



Олександр МАЄВСЬКИЙ

ЗАТВЕРДЖУЮ



Проректор з наукової роботи
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова
д.мед.н., професор

Олег ВЛАСЕНКО
2021 р.**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. Пропозиція для впровадження: матеріали дисертаційної роботи “Онтогенетичні особливості структур переднього гіпоталамуса шурів за модифікації фотоперіоду”.

2. Установа-розробник: Буковинський державний медичний університет, кафедра медичної біології та генетики.

Розробник: аспірант Йосипенко Владислав Романович.

3. Джерело інформації:

1. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Аналіз щільності мелатонінових рецепторів типу 1А у нейронах передньо-бічного передзорового ядра гіпоталамуса шурів за різного світлового режиму. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2020; 3: 45-49. DOI 10.11603/1811-2471.2020.v.i3.11581

2. Булик РЄ, Йосипенко ВР, Власова КВ. Вікові особливості морфометричного стану бічного передзорового ядра гіпоталамуса шурів на тлі різної тривалості фотоперіоду. Вісник проблем біології і медицини. 2021; 2 (160): 197 – 200.

3. Bulyk RYe., Yosypenko VR. Effect of melatonin on daily oscillations of the density of melatonin receptors 1A in neurons of the lateral preoptic nucleus of the hypothalamus in rats under different light mode. Deutscher Wissenschaftsherold. German Science Herald. 2021; 1: 32-35. DOI:10.19221/202117

4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра оперативної хірургії та клінічної анатомії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

5. Термін впровадження: вересень-листопад 2021 року.

6. Форми впровадження: введено у навчальний процес - у матеріали лекцій та практичних занять з оперативної хірургії та клінічної анатомії, а також у наукову роботу кафедри.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри оперативної хірургії та клінічної анатомії.

Протокол № 11 від 14 грудня 2021 року

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри оперативної хірургії
та клінічної анатомії Вінницького національного
медичного університету ім. М.І. Пирогова,
доктор медичних наук, професор

Володимир ПІВТОРАК