

УДК 578.63:611.81.018

**І.С. Давиденко, Р.Є. Булик\*, О.В. Тимофій\***

Кафедра патологічної анатомії (зав. – проф. І.С. Давиденко); \*кафедра медичної біології та генетики (зав. – проф. Р.Є. Булик) ВДНЗ України “Буковинський державний медичний університет”, м. Чернівці

## АНАЛІЗ ЩІЛЬНОСТІ МЕЛАТОНІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ У НЕЙРОНАХ ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНИХ ЯДЕР ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ЗА МОДИФІКАЦІЙ ФОТОПЕРІОДУ ТА УВЕДЕННЯ МЕЛАТОНІНУ

**Резюме.** У статті шляхом імуногістохімічного аналізу охарактеризовано щільність мелатонінових рецепторів 1а типу в медіальних дрібноклітинних суб'ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів і встановлено її чіткий циркадіанний ритм. У середньому найвища щільність рецепторів відмічається о 02.00 год доби, а о 14.00 год вона суттєво знижується. Модифікація фотоперіоду спричиняє виражений десинхроноз добових коливань щільності досліджуваних структур. При застосуванні мелатоніну на тлі тривалого освітлення спостерігали вірогідне зростання показника щодо такого у тварин, яким на тлі світлового стресу препарат не вводили, з тенденцією до його нормалізації.

**Ключові слова:** мелатонінові рецептори, паравентрикулярні ядра, гіпоталамус, імуногістохімічний аналіз.

У нейроендокринній регуляції, зокрема такій в умовах стресу, одну з головних ролей відіграють паравентрикулярні ядра (ПВЯ) гіпоталамуса – структури, які є вищим центром координації вегетативних функцій; нейронні мережі даних ядер істотно залучені у формування відповідей організму на дію стресорних чинників [1-3]. Ці ядра складаються з низки нейронних популяцій – суб'ядер, що різняться за своїми структурно-функціональними особливостями і характером нервових зв'язків з різними відділами нервової та нейроендокринної систем [4]. Мультисинаптичні шляхи, що надходять в епіфіз мозку через ПВЯ, регулюють нічний синтез епіфізарного мелатоніну і пригнічення даного процесу при підвищенні освітленості [5]. Через мелатонінові рецептори (мембранні, цитозольні та ядерні) гормон контролює стан гіпоталамо-гіпофізарної системи й активність ендокринних залоз [6]. Окрім того, за механізмом зворотного зв'язку він втручається в діяльність самих ПВЯ [7]. Авторадіографія і радіоімунний аналіз показали присутність мелатонінових рецепторів у різних структурах мозку людини, кишок, яєчниках і кровоносних судинах [8-10]. Припускають, що мелатонінові рецептори ПВЯ причетні до регуляції циркадіанних ритмів [6]. Однак відомості щодо характеристики мелатонінових рецепторів у суб'ядрах ПВЯ гіпоталамуса щурів практично відсутні.

При вивченні стресорних реакцій і дії стреслімітувальних чинників (зокрема мелатоніну) постає важливим дослідження вказаних субпопуляцій нейронів ПВЯ гіпоталамуса, що синтезують стрес-релізінг гормони, які ініціюють стресорні реакції організму. Одним з основних пептидів, що проявляють ефект у регуляції секреції кортикотропіну, є кортиколіберин. Кортиколіберин-імунореактивна мітка виявлена, здебільшого, у медіальному дрібноклітинному суб'ядрі ПВЯ (мдПВЯ) гіпоталамуса. При впливі світла нейросекреторні клітини ПВЯ зазнають морфо-функціональних змін, що не знаходять пояснення в доступній літературі.

**Мета дослідження:** на підставі імуногістохімічної методики, поєднано з комп'ютерною мікроденситометрією, з'ясувати кількісну характеристику щільності мелатонінових рецепторів у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів.

**Матеріал і методи.** Експерименти проведені на статевозрілих самцях безпородних білих щурів масою 150-180 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію при сталих температурах і вологості повітря та вільному доступі до води і їжі. Експериментальні щури розподілені на чотири групи, кожна з яких, у свою чергу, складалася з двох підгруп (по шість тварин).

Тварини першої групи (інтактні) перебували

сім діб в умовах звичайного світлового режиму (світло-темрява по 12 год, LD, освітлення з 08.00 до 20.00 за допомогою люмінесцентних ламп, рівень освітленості в клітинах із тваринами 500 лк). Тварини другої групи знаходилися впродовж того ж періоду в умовах постійної темряви (світлова депривація, DD, індукція гіперфункції шишкоподібної залози). Щури третьої групи перебували впродовж семи діб в умовах постійного освітлення аналогічної інтенсивності (LL, індукція гіпофункції шишкоподібної залози). Тварини четвертої групи знаходилися за умов експерименту, як і щури третьої групи. Їм щоденно о 19.00 год внутрішньоочередивно вводили мелатонін (Sigma, США, ступінь очищення – 99,5%) у дозі 0,5 мг/кг, у 1,0 мл розчинника (0,9% розчин етанолу на фізіологічному розчині).

З метою виявлення циркадіанних відмінностей мелатонінових рецепторів та враховуючи циклічність продукції мелатоніну після закінчення семиденного періоду наступного дня о 14.00 і 02.00 тварин виводили з експерименту, здійснюючи одномоментну декапітацію під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг, внутрішньоочередивно). Усі етапи експерименту проведено з дотриманням основних вимог Європейської конвенції щодо гуманного ставлення до тварин.

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

З метою виконання імуногістохімічної методики використані поліклональні антитіла до мелатонінових рецепторів 1А виробника Abcam (Ве-

лика Британія) та стрептавідинбіотинову систему візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка + діамінобензидин) виробника Chemicon International Inc. (США). Максимально дотримувалися стандартизації протоколу методики для всіх зрізів. Дофарбовування ядер виконували гематоксилином Майєра.

Кількісні дослідження інтенсивності зафарбовування проводили за такою схемою. Спочатку, при використанні об'єктива мікроскопа x40, отримували цифрові копії оптичного зображення, які в подальшому аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми "ВидеоТест-Размер 5.0" (ООО Видеотест, Россия), а саме: проводили комп'ютерну мікроденситометрію. Аналіз здійснювали на підставі вимірювань мікрозондовою методикою у місцях позитивного забарвлення за показником "Оптична щільність" (у відносних одиницях з діапазоном 0-1, причому "0" відповідає абсолютній оптичній прозорості у мікрозонді, а "1" – абсолютній оптичній непрозорості). Інтенсивність специфічного зафарбовування (показник "Оптична щільність") ототожнювали зі ступенем щільності мелатонінових рецепторів.

Враховуючи необхідність виконання множинних статистичних порівнянь середніх величин у статистичних вибірках, для визначення відмінностей між сукупностями, використаний критерій Ньюмена-Кейлса.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Виразене позитивне імуногістохімічне забарвлення спостерігалось у мДПВЯ гіпоталамуса у вигляді гранул різної щільності та розмірів, які зосереджувалися здебільшого на периферії досліджуваних клітин, що віддзеркалює трансмембранне розміщення мелатонінових рецепторів 1А (рис. А). Імуногістохімічного забарвлення ядер не ви-

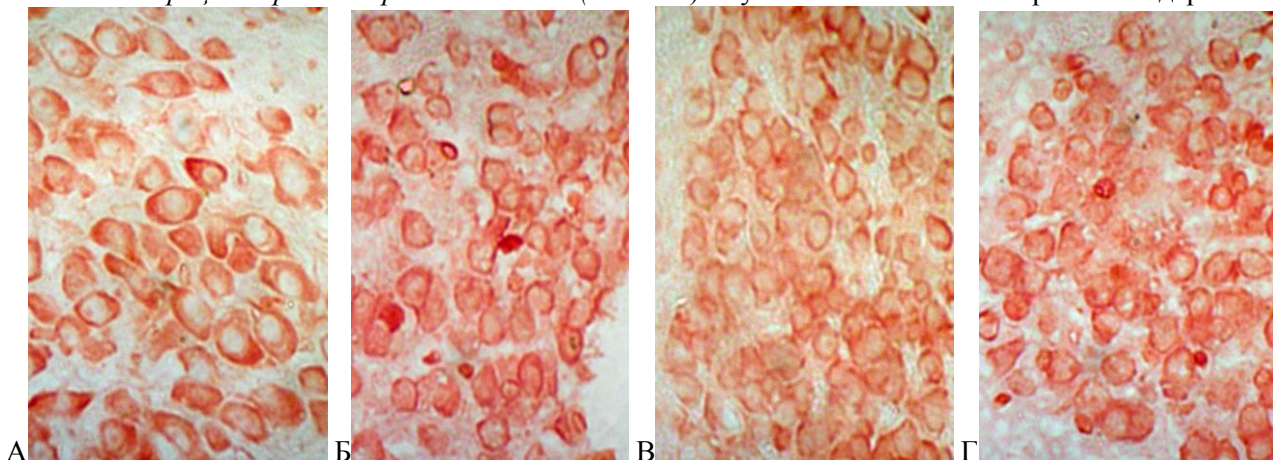


Рисунок. Мелатонінові рецептори 1А у нейронах мДПВЯ гіпоталамуса щура о 02.00 год: А) за режиму освітлення 12.00С:12.00Т; Б) 00С:24.00Т; В) 24.00С:00Т; Г) 24.00С:00Т + мелатонін. Імуногістохімічна методика з поліклональними антитілами до мелатонінових рецепторів 1А та стрептавідинбіотиновою системою візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка + діамінобензидин). Дофарбовування клітинних ядер гематоксилином Майєра. Об. 40<sup>х</sup>, Ок. 10<sup>х</sup>

являли – структури фарбувалися тільки гематоксиліном і відзначалися типовою для нейронів мдПВЯ морфологічною будовою. Звертало на себе увагу те, що за даними мікроденситометрії на 14.00 порівняно з 02.00 год. у мдПВЯ вірогідно знижувалася оптична щільність імуногістохімічного забарвлення (таблиця), що нами розцінюється як зменшення щільності рецепторів мелатоніну.

За умов постійної темряви щільність мелатонінових рецепторів 1A у мдПВЯ гіпоталамуса була стабільно високою з вірогідно вищим значенням показника у нічний проміжок доби (див. табл.).

Утримування тварин за умов світлової експозиції призвело до вірогідного зниження ( $p < 0,001$ ) імуногістохімічної щільності мелатонінових ре-

цепторів 1A у мдПВЯ гіпоталамуса порівняно як з контрольною групою, так і тваринами, яким моделювали гіперфункцію шишкоподібної залози, хоча впродовж доби коливання показника в середньому не вирізнялися.

Відмінність у щільності мелатонінових рецепторів 1A за умов світлової депривації та стимуляції проілюстровано на рисунках Б, В.

Отже, якщо щільність мелатонінових рецепторів 1A у нейронах мдПВЯ гіпоталамуса щурів за стандартного режиму освітлення відзначалася чіткими добовими коливаннями, то зміна освітленості призвела до вираженого їх порушення. За умов постійного освітлення щільність досліджуваних структур вірогідно менша, ніж при світловій депривації.

Таблиця

**Оптична щільність забарвлення на мелатонінові рецептори 1A у нейронах мдПВЯ гіпоталамуса щурів за умов моделювання різної тривалості фотоперіоду та уведення мелатоніну**

( $\bar{x} \pm S_x$ )

Години доби	Оптична щільність забарвлення (в. о. опт. щільності)			
	Контроль (n=6)	Постійне освітлення (n=6)	Світлова депривація (n=6)	Постійне освітлення + мелатонін (n=6)
02.00	0,264±0,0022	0,185±0,0026	0,285±0,0023	0,248±0,0024
14.00	0,234±0,0021*	0,182±0,0024	0,274±0,0023*	0,226±0,0023*

Примітки: n – кількість тварин, \* – вірогідність різниці ( $p < 0,05$ ) порівняно з попереднім часовим інтервалом у межах групи

З метою корекції порушень щільності мелатонінових рецепторів 1A у нейронах мдПВЯ гіпоталамуса, викликаних тривалим перебуванням щурів за умов постійного освітлення використовували мелатонін у дозі 0,5 мкг/кг маси тіла тварини (рис. Г).

При застосуванні препарату імуногістохімічний аналіз о 14.00 год показав вірогідне зростання оптичної щільності специфічного забарвлення досліджуваних структур щодо до такої у тварин, яким не проводили ін'єкції мелатоніну на тлі світлового стресу (див. табл.). Якщо при світловій експозиції показник становив у нічний період (02.00 год) 0,185±0,0026 в. о. опт. щільності, а в денний (14.00 год) – 0,182±0,0024 в. о. опт. щільності, то при уведенні мелатоніну на тлі тривалого освітлення оптичної щільності специфічного забарвлення сягала о 02.00 год – 0,248±0,0024 в. о. опт. щільності та о 14.00 год – 0,226±0,0023 в. о. опт. щільності відповідно (див. рис. Г). За критерієм Ньюмена-Кейлса між групами, зразки яких забирали для дослідження як вдень, так і вночі, розбіжність вірогідна ( $p < 0,05$ ).

**Висновки.** 1. Щільність мелатонінових ре-

цепторів 1A у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів у нормі характеризується чітким циркадіанним ритмом. У середньому найвища щільність рецепторів відмічається о 02.00 год доби, а о 14.00 год вона суттєво знижується. 2. Модифікація фотоперіоду спричиняє виражений десинхроноз добових коливань досліджуваної щільності. Порівняно як з контрольним показником, так і з таким при світловій депривації, при тривалій експозиції світлом оптична щільність специфічного забарвлення вірогідно стабільно нижча і становить о 02.00 год: у нейронах медіальних дрібноклітинних суб'ядер 0,185±0,0026 в. о. опт. щільності, у нейронах латеральних великоклітинних суб'ядер – 0,184±0,0022 в. о. опт. щільності, а о 14.00 год – 0,182±0,0024 і 0,183±0,0020 в. о. опт. щільності відповідно. Водночас при застосуванні мелатоніну на тлі тривалого освітлення спостерігали вірогідне зростання показника щодо такого у тварин, яким на тлі світлового стресу препарат не вводили, з тенденцією до його нормалізації.

**Перспективи подальших досліджень.** У подальшому планується провести подібні експери-

менти, але з іншим світловим режимом утримання тварин для виявлення можливих порушень

циркадіанного ритму мелатонінових рецепторів 1А у нейронах гіпоталамуса щурів.

### Список використаної літератури

1. *Возрастные особенности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при хроническом генеротипическом стрессе* / В.В. Хлебников, С.Л. Кузнецов, Д. А. Чернов [и др.] // *Морфолог.* – 2015. – № 1. – С. 15-20.
2. *Ткачук С.С. Нейроендокринні та біохімічні механізми порушень стрес-лімітуючої та стрес-реалізуючої систем мозку у щурів з синдромом пренатального стресу: дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.04 / Світлана Сергіївна Ткачук.* – К, 2000. – 326 с.
3. *Isobe Y. Signal transmission from the suprachiasmatic nucleus to the pineal gland via the paraventricular nucleus: analysed from arg-vasopressin peptide, rPer2 mRNA and AVP mRNA changes and pineal AA-NAT mRNA after the melatonin injection during light and dark periods* / Y. Isobe, H. Nishino // *Brain Res.* – 2004. – Vol. 1013, № 2. – P. 204-211.
4. *Абрамов А.В. Иммуномодулирующие свойства гипоталамических нейропептидов* / А.В. Абрамов, Ю.М. Колесник // *Патолог.* – 2004. – Т.1, № 1. – С. 14-21.
5. *Kiessling S. Light stimulates the mouse adrenal through a retinohypothalamic pathway independent of an effect on the clock in the suprachiasmatic nucleus* // S. Kiessling, P.J. Sollars, G.E. Pickard / *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 3. – P. 929-959.
6. *Alamilla J. Glutamate and GABA neurotransmission from the paraventricular thalamus to the suprachiasmatic nuclei in the rat* / J. Alamilla, R. Aguilar-Roblero // *J. Biol. Rhythms.* – 2010. – Vol. 25, № 1. – P. 28-36.
7. *Extrapeineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations* / C. Venegas, J.A. Garcia, G. Escames [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2012. – Vol. 52, № 2. – P. 217-227.
8. *Булик Р.С. Щільність мелатонінових рецепторів 1а типу в нейронах гіпокампа білих щурів впродовж доби: імуногістохімічний аналіз* / Р.С. Булик // *Вісн. морфолог.* – 2008. – Т. 14, № 1. – С. 69-71.
9. *Anatomical and cellular localization of melatonin MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain* // B. Lacoste, D. Angeloni, S. Dominguez-Lopez [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2015. – Vol. 58, № 4. – P. 397-417.
10. *Diurnal expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the optic tectum and retina of goldfish* // T. Ikegami, K. Azuma, M. Nakamura [et al.] // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* – 2009. – Vol. 152, № 2. – P. 219-224.

### АНАЛИЗ ПЛОТНОСТИ МЕЛАТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В НЕЙРОНАХ ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНЫХ ЯДЕР ГИПОТАЛАМУСА КРЫС В УСЛОВИЯХ МОДИФИКАЦИИ ФОТОПЕРИОДА И ВВЕДЕНИЯ МЕЛАТОНИНА

**Резюме.** В статье путем иммуногистохимического анализа охарактеризовано плотность мелатониновых рецепторов 1а типа в медиальных мелкоклеточных субъядрах паравентрикулярного ядра гипоталамуса крыс и установлено ее циркадианный ритм. В среднем высшая плотность рецепторов отмечается в 02.00 ч., а в 14.00 ч она существенно снижается. Модификация фотопериода вызывает выраженный десинхронизм суточных колебаний плотности исследуемых структур. При использовании мелатонина на фоне длительного освещения наблюдали достоверное возрастание показателя относительного такого у животных, которым на фоне светового стресса препарат не вводили, с тенденцией к его нормализации.

**Ключевые слова:** мелатониновые рецепторы, паравентрикулярные ядра, гипоталамус, иммуногистохимический анализ.

### ANALYSIS OF MELATONIN RECEPTORS DENSITY IN THE NEURONS OF THE HYPOTHALAMUS PARAVENTRICULAR NUCLEI OF RATS UNDER CONDITIONS OF PHOTOPERIOD MODIFICATION AND MELATONIN ADMINISTRATION

**Abstract.** The article characterizes the density of melatonin receptors of 1a type in the medial small-celled subnuclei of the hypothalamus paraventricular nucleus of rats by means of immunohistochemical analysis, and its clear circadian rhythm is determined. In an average the highest receptor density is marked at 2 a.m., and at 2 p.m. it considerably decreases. Modification of photoperiod causes pronounced desynchronization of daily density fluctuations of the structures examined. With administration of melatonin against the ground of a long-term light a reliable increase of the index was found concerning the same one in the animals which did not receive the medicine against the light stress, with a tendency to its normalization.

**Key words:** melatonin receptors, paraventricular nuclei, hypothalamus, immunohistochemical analysis.

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

Надійшла 14.10.2015 р.

Рецензент – проф. Котляренко Л.Т. (Київ)