

УДК 612.826.4.014.44

DOI: 10.24061/1727-0847.19.4.2020.43

Р.Є. Булик, К.В. Власова*Кафедра медичної біології та генетики (зав. – проф. Р.Є. Булик) Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці*

СУБМІКРОСКОПІЧНІ ПЕРЕТВОРЕННЯ СТРУКТУР ГІПОТАЛАМУСА ЗА УМОВ ЦІЛОДОБОВОГО ОСВІТЛЕННЯ

Резюме. Світлова інформація, що сприймається фоторецепторами сітківки, передається по ретинопоталамічному шляху (наявних у ньому гангліонарних клітинах сітківки) і волокнах супраоптичних, супрахіазматичних, паравентрикулярних, аркуатних ядрах гіпоталамуса, через стовбур верхньої грудної частини і латеральні інтермедіальні ядра спинного мозку, симпатичні нейрони верхнього шийного ганглія в шишкоподібній залозі. У темряві сигнали від супрахіазматичних посилюють синтез і вивільнення норадреналіну із симпатичних закінчень. Експерименти проведені на 40 статевозрілих самцях безпородних білих щурів масою 0,15-0,18 кг. Тварин утримували в твариннику при сталій температурі, вологості повітря та вільному доступі до води і їжі. Експериментальні тварини розподілені на дві серії, у кожній з яких забір біоматеріалу здійснювався о 14.00 год і о 02.00 год. Обрані терміни проведення експерименту зумовлені різною функціональною активністю шишкоподібної залози у вказані часові періоди доби. Субмікроскопічні дослідження супраоптичних ядер гіпоталамуса інтактних тварин о 14.00 год показали, що більшість нейросекреторних клітин округло-овальної форми з поодинокими інвагінаціями та ядра неправильної форми з неглибокими інвагінаціями каріолеми. Каріоплазма містить грудочки хроматину та щільне осміофільне ядрце. Нейроплазма займає невеликий об'єм, у ній щільно упаковані з невеликим просвітом каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, де спостерігається багато рибосом та полісом, а також невелика кількість рівномірно розподілених гранул. Біля комплексу Гольджі, утворюються секреторні гранули різних розмірів. Невеликі зі щільним матриксом мітохондрії містять не багато крист. Деякі з них знаходяться в енергетично напруженому стані, здатні гіпертрофуватися та частково втрачати кристи або й гинути. Досліджено ультрамікроскопічну організацію нейросекреторних клітин супраоптичних ядер переднього гіпоталамуса щурів. За стандартного режиму освітлення (12.00С:12.00Т) ультраструктура нейронів свідчить про зниження їх функціональної активності у світловий період доби та зростання – у темновий період доби. Світловий стрес (24.00С:00Т) призводить до істотного десинхронізму та спричинює деструктивні зміни компонентів досліджуваних структур, які більш виражені о 02.00 год.

Ключові слова: супраоптичні ядра гіпоталамуса, постійне освітлення, електронна мікроскопія.

Періодична зміна дня і ночі (фотоперіодизм) є визначальним чинником у формуванні біологічних ритмів [1]. Вагому роль у адаптації організму до зміни освітленості відіграє гормон шишкоподібної залози (ШЗ) – мелатонін (МТ). Саме в темновий період доби виробляється близько 70% добової кількості МТ, який володіє антиоксидантним, антистресовим, геропротекторним та іншими ефектами [2].

Світлова інформація, що сприймається фоторецепторами сітківки, передається по ретинопоталамічному шляху (наявних у ньому гангліонарних клітинах сітківки) і волокнах супраоптичних (СОЯ), супрахіазматичних (СХЯ), паравентрикулярних (ПВЯ), аркуатних ядрах гіпоталамуса, че-

рез стовбур верхньої грудної частини і латеральні інтермедіальні ядра спинного мозку, симпатичні нейрони верхнього шийного ганглія в ШЗ. У темряві сигнали від СХЯ посилюють синтез і вивільнення норадреналіну із симпатичних закінчень. У свою чергу, цей нейромедіатор збуджує рецептори на поверхні клітин ШЗ, стимулює синтез основного гормону – МТ [3, 4]. Від ШЗ інформація про світловий режим навколишнього середовища надходить у внутрішнє середовище організму [5, 6].

Серед мозкових структур, залучених у забезпечення часової організації фізіологічних функцій, у відповідь на зміну фотоперіоду чільне місце посідають СОЯ гіпоталамуса [7, 8], проте вплив

зміненого фотоперіоду на ультраструктуру нейросекреторних клітин СОЯ гіпоталамуса щурів вивчено недостатньо.

Мета дослідження: з'ясувати субмікроскопічні перебудови нейросекреторних клітин супраоптичних ядер гіпоталамуса в різні добові періоди при цілодобовому освітленні.

Матеріал і методи. Експерименти проведені на 40 статевозрілих самцях безпородних білих щурів масою 0,15-0,18 кг. Тварин утримували в твариннику при сталій температурі, вологості повітря та вільному доступі до води і їжі. Експериментальні тварини розподілені на дві серії, у кожній з яких забір біоматеріалу здійснювався о 14.00 год і о 02.00 год. Обрані терміни проведення експерименту зумовлені різною функціональною активністю ШЗ у вказані часові періоди доби.

Тварини першої серії (інтактні) перебували 7 діб за умов стандартного світлового режиму (світло з 08.00 до 20.00 год, освітленість люмінесцентними лампами на рівні кліток 500 лк). Щури другої серії перебували за умов цілодобового постійного освітлення (моделювання гіпофункції шишкоподібної залози) впродовж 7 діб. На восьмий день експерименту о 14.00 год і 02.00 год здійснювали виведення тварин з експерименту шляхом одномоментної декапітації під етаміналовим наркозом (40,0мг/кг внутрішньоочеревино).

Для електронно-мікроскопічного дослідження нейронів СОЯ гіпоталамуса забір матеріалу проводили згідно з загальноприйнятих правил. Для дослідження з головного мозку щурів, у місці виходу зорових нервів, вирізали тонку, суцільну пластинку товщиною 1,0-1,5 мм, яка охоплювала супраоптичні ядра. Цю пластинку фіксували в 2,5% розчині глютаральдегіду, який готували на фосфатному буфері Міллонга з активною реакцією середовища рН 7,2-7,4. Фіксований матеріал переносили у буферний розчин і промивали впродовж 20-30 хв. Після цього впродовж 60 хв здійснювали постфіксацію матеріалу, використовуючи для цього 1% розчин чотириокису осмію на буфері Міллонга. Далі проводили дегідратацію матеріалу в спиртах і ацетоні та заливали в суміші епоксидних смол відповідно до загальноприйнятої методики. Дослідження в нічний період доби проводили при слабкому (2 лк) червоному світлі, яке практично не впливає на біосинтез мелатоніну ШЗ. Комісією з біоетичної експертизи ВДНЗ України "Буковинський державний медичний університет" встановлено, що всі етапи експерименту проведено з дотриманням основних вимог Гельсінської декларації та вимог Ради Європи щодо прав людини та біомедицини (1977),

положень ВООЗ, Міжнародного кодексу медичної етики (1983) та законів України (протокол № 22 від 28 листопада 2007р.).

Результати дослідження та їх обговорення. Субмікроскопічні дослідження СОЯ гіпоталамуса інтактних тварин о 14.00 год показали, що більшість нейросекреторних клітин (НСК) округло-овальної форми з поодинокими інвагінаціями та ядра неправильної форми з неглибокими інвагінаціями каріолеми. Каріоплазма містить грудочки хроматину та щільне осміофільне ядереце. Нейроплазма займає невеликий об'єм, у ній щільно упаковані з невеликим просвітом каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулу, де спостерігається багато рибосом та полісом, а також невелика кількість рівномірно розподілених гранул. Біля комплексу Гольджі, утворюються секреторні гранули різних розмірів. Невеликі зі щільним матриксом мітохондрії містять не багато крист. Деякі з них знаходяться в енергетично напруженому стані, здатні гіпертрофуватися та частково втрачати кристи або й гинути. Проте даний процес фізіологічний і в нормі характеризується циклічним перебігом. У нейроплазмі таких НСК незначна кількість гормональних гранул, розсіяних по цитоплазмі. Вказана субмікроскопічна організація НСК віддзеркалює невисоку функціональну активність (рис. 1).

Дослідження ультраструктурної організації СОЯ гіпоталамуса в інтактних тварин о 02.00 год показали, що для НСК характерні ядра, каріолема яких значно нерівна, має глибокі інвагінації, що збільшує площу взаємодії ядра і цитоплазми. Розміри ядра, ядереця та щільність органел у клітинах дещо більші ніж у денний проміжок часу. У карі-

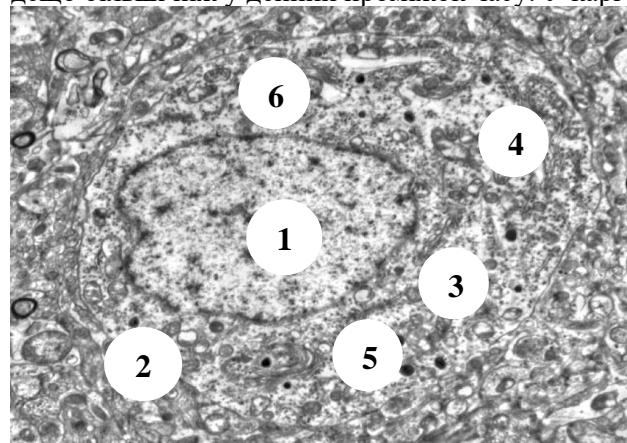


Рис.1. Ультраструктура нейросекреторної клітини СОЯ гіпоталамуса інтактної тварини о 14.00 год: 1 – неправильної форми ядро з інвагінаціями; 2 – електроннощільна нейроплазма; 3 – каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулу; 4 – комплекс Гольджі; 5 – секреторні гранули; 6 – мітохондрії з невеликою кількістю крист. Зб. x10000

оплазмі переважає еухроматин, помітні лише невеликі грудочки гетерохроматину.

У нейроплазмі більшості НСК є довгі каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму з вузьким просвітом, а на мембранах органели розташовані рибосоми. Диктіосоми комплексу Гольджі лежать парануклеарно, вони невеликі і мають неширокі цистерни, де формуються нейрогормональні гранули. В окремих полях зору за невеликого збільшення електронного мікроскопу спостерігається розташування невеликих осміофільних нейросекреторних гранул навколо комплексу Гольджі і в аксоні, що відходить від цієї клітини. Така картина вказує на активний функціональний стан клітин СОЯ (рис. 2).

У тварин, які перебували впродовж семи діб за умов світлової стимуляції ультраструктурна організація СОЯ гіпоталамуса о 14.00 год віддзеркалилася наявністю світлих НСК з набряковими явищами, які містять крупні ядра округлої форми, маленькі ядерця та інвагінацію каріолеми. У їх каріоплазмі здебільшого виявляється еухроматин та наявні ділянки гетерохроматину. У нейроплазмі нейронів СОЯ встановлені деструктивні зміни органел. Фрагментація і розширення каналців гранулярного ендоплазматичного ретикулуму та цистерн комплексу Гольджі, майже повна відсутність пухирців. Руйнування мітохондрій супроводжується утворенням вакуолей, помітне локальне просвітлення гіалоплазми. У таких НСК вміст гормональних гранул незначний і свідчить про виснаження структурної одиниці (рис. 3).

За умов 24-годинного освітлення впродовж 7-ми діб субмікроскопічно в СОЯ гіпоталамуса о 02.00 год встановлені темні НСК, що мають пікнотично змінені ядра з нерівними контурами зменше

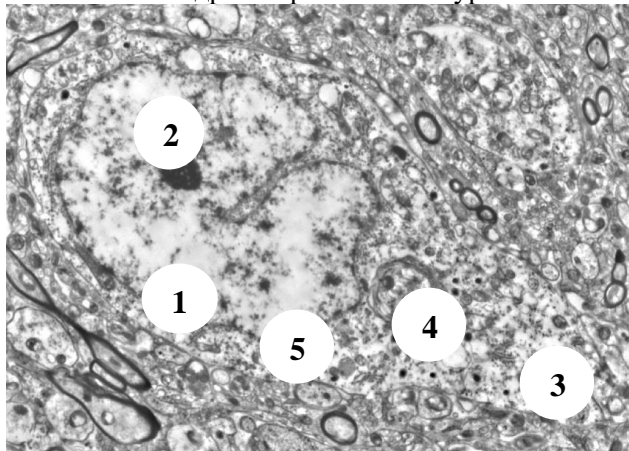


Рис. 2. Субмікроскопічний стан нейрона СОЯ гіпоталамуса щура о 02.00 год за умов стандартного освітлення: 1 – неправильної форми електронноосвітле ядро з інвагінаціями; 2 – велике ядро; 3 – нейроплазма; 4 – секреторні гранули біля комплексу Гольджі; 5 – мітохондрії. Зб. $\times 10000$

ними ядерцями, погано вираженими ядерними порами. Нейроплазма підвищеної електронної щільності, нечітко контуруються мембранні органели. Виявлено осередкове розширення каналців гранулярного ендоплазматичного ретикулуму та цистерн комплексу Гольджі з утворенням вакуолоподібних структур. Частина мітохондрій вакуолізувались, інші мають світлий матрикс і редуковані кристи, гранули гормону поодинокі (рис. 4). Описаний вище ультраструктурний стан свідчить про зниження функціональної активності структур з елементами набряку та деструкції.

Таким чином, виявлені субмікроскопічні зміни нейронів СОЯ гіпоталамуса можна розглядати як розвиток десинхронозу, внаслідок зниження продукції гормону МТ ШЗ.

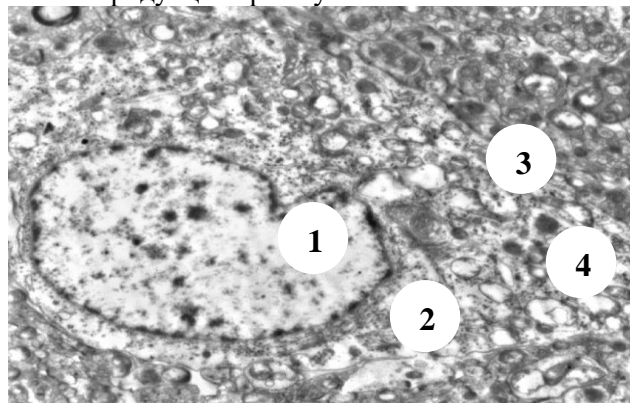


Рис. 3. Субмікроскопічна організація нейронів СОЯ гіпоталамуса щури о 14.00 год за умов постійного освітлення: 1 – інвагінації каріолеми світлого нейрона; 2 – розширені каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму; 3 – деструкція комплексу Гольджі; 4 – вакуолізовані структури. Зб. $\times 14000$

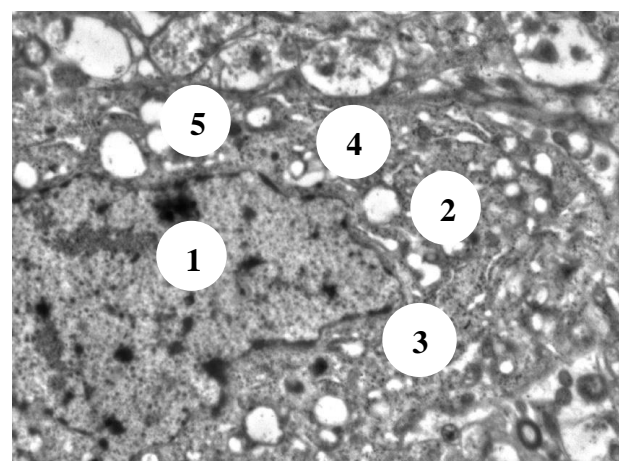


Рис. 4. Ультраструктурна організація нейросекреторних клітин СОЯ гіпоталамуса щура о 02.00 год під дією світлової стимуляції: 1 – еухроматинове ядро темного нейрона; 2 – електроннощільна гіалоплазма; 3 – деструкція комплексу Гольджі; 4 – розширені каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму; 5 – вакуолізовані структури. Зб. $\times 16000$

Висновок. Ультрамікроскопічна організація клітин супраоптичних ядер переднього гіпоталамуса щурів за стандартного режиму освітлення свідчить про зниження функціональної активності нервових клітин у світловий та її зростання – у темновий період доби. Світловий стрес призводить до істотного десинхронізму та циркадіанного пригнічення активності нейроцитів впродовж періоду спостереження. За моделювання гіпофунк-

ції шишкоподібної залози патологічні зміни компонентів досліджуваних структур більш виражені о 02.00 год.

Перспективи подальших досліджень. У даному напрямку дадуть змогу глибше пізнати механізми формування циркадіанних ритмів головного мозку вищих ссавців та місце і роль супраоптичних ядер гіпоталамуса, шишкоподібної залози в забезпеченні циркадіанного періодизму.

References

1. Lucy MC. Stress, strain, and pregnancy outcome in postpartum cows. *Anim Reprod.* 2019 Oct 23;16(3):455-64. doi: 10.21451/1984-3143-AR2019-0063.
2. Qin Q, Chen P, Cui Z, Wang J, Xie B, Zhang S, Mei X, Duan X, Zhang J, Wang S. Neuropeptide Y knockdown in the dorsomedial hypothalamus improved basal and obesity-induced decrease in bone mass density. *Neuro Endocrinol Lett.* 2019 Dec;40(6):289-96.
3. Halmos T, Suba I. Physiological and pathophysiological role of the circadian clock system. *Orv. Hetil.* 2012;153(35):1370-9.
4. Nicolaidis NC, Charmandari E, Chrousos GP, Kino T. Circadian endocrine rhythms: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its actions. *Acad. Sci.* 2014;1318:71-80.
5. Gamble KL, Berry R, Frank SJ, Young ME. Circadian clock control of endocrine factors. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014;10(8):466-75.
6. Hasler BP, Buysse DJ, Kupfer DJ, Germain A. Phase relationships between core body temperature, melatonin, and sleep are associated with depression severity: Further evidence for circadian misalignment in non-seasonal depression. *Psychiatry Research.* 2010;178:205-7.
7. Pishak VP, Tashchuk VK, Ilashchuk TA. [The chronobiological conception of the development of acute myocardial infarction]. *Klin Med (Mosk).* 2007;85(9):38-40. [in Russian]
8. Wood S, Loudon A. Clocks for all seasons: unwinding the roles and mechanisms of circadian and interval timers in the hypothalamus and pituitary. *J. Endocrinol.* 2014;222(2):39-59.

СУБМИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ГИПОТАЛАМУСА В УСЛОВИЯХ КРУГЛОСУТОЧНОГО ОСВЕЩЕНИЯ

Резюме. Световая информация, что воспринимается фоторецепторами сетчатки, передается по ретиногипоталамическому пути (имеющихся в нем ганглионарных клетках сетчатки) и волокнах супраоптических, супрахиазматическом, паравентрикулярном, аркуатных ядрах гипоталамуса, через ствол верхней грудной части и латеральные интермедиальные ядра спинного мозга, симпатические нейроны верхнего шейного ганглия в шишковидной железе. В темноте сигналы от супрахиазматического ядра усиливают синтез и высвобождение норадреналина из симпатических окончаний. Эксперименты проведены на 40 половозрелых самцах беспородных белых крыс массой 0,15-0,18 кг. Животных содержали в клетках при постоянной температуре, влажности воздуха и свободном доступе к воде и пище. Экспериментальные животные разделены на две серии, в каждой из которых забор биоматериала осуществлялся в 14.00 и в 02.00 ч. Избранные сроки проведения эксперимента обусловлены разной функциональной активностью шишковидной железы в указанные временные периоды суток. Субмикроскопические исследования супраоптических ядер гипоталамуса интактных животных в 14.00 показали, что большинство нейросекреторных клеток округло-овальной формы с редкими инвагинация и ядра неправильной формы с неглубокими инвагинациями кариолемы. Кариоплазма содержит комочки хроматина и плотное осмиофильные ядрышко. Нейроплазма занимает небольшой объем, в ней плотно упакованы с небольшим просветом каналы гранулярного эндоплазматического ретикула, где наблюдается много рибосом и полисом, а также небольшое количество равномерно распределенных гранул. В комплексе Гольджи, образуются секреторные гранулы разных размеров. Небольшие с плотным матриксом митохондрии содержат немного крист. Некоторые из них находятся в энергетически напряженном состоянии, способны гипертрофироваться и частично терять кристы или погибать. Исследовано ультрамикроскопическую организацию нейросекреторных клеток супраоптических ядер переднего гипоталамуса крыс. При стандартном режиме освещения (12.00С: 12.00Т) ультраструктура

нейронов свидетельствует о снижении их функциональной активности в световой период суток и рост - в темновой период суток. Световой стресс (24.00С: 00Т) приводит к существенному десинхронозу и вызывает деструктивные изменения компонентов исследуемых структур, более выраженные в 02.00 ч. **Ключевые слова:** супраоптические ядра гипоталамуса, постоянное освещение, электронная микроскопия.

SUBMICROSCOPIC TRANSFORMATIONS OF THE HYPOTHALAMUS STRUCTURE UNDER CONDITIONS OF 24-HOUR LIGHTING

Abstract. Light information that is perceived by the retinal photoreceptors is transmitted along the retino-hypothalamic pathway (the retinal ganglion cells present in it) and supraoptic fibers, suprachiasmatic, paraventricular, arcuate nuclei of the hypothalamus, through the trunk of the upper thoracic region and lateral intermedial nuclei of the spinal cord, sympathetic neurons of the superior cervical ganglion in the pineal gland. In the dark, signals from the suprachiasmatic nucleus enhance the synthesis and release of norepinephrine from sympathetic endings. The experiments were carried out on 40 sexually mature male outbred white rats weighing 0.15-0.18 kg. The animals were kept in cages at a constant temperature, air humidity and free access to water and food. Experimental animals were divided into two series, in each of which the biomaterial was taken at 14.00 and 02.00 h. The selected timing of the experiment is due to the different functional activity of the pineal gland in the indicated time periods of the day. Submicroscopic studies of the supraoptic nuclei of the hypothalamus of intact animals at 14:00 showed that the majority of neurosecretory cells are round-oval in shape with rare invaginations and nuclei of irregular shape with shallow invaginations of the karyolem. The karyoplasm contains lumps of chromatin and a dense osmiophilic nucleolus. Neuroplasm occupies a small volume, in it the tubules of the granular endoplasmic reticulum are tightly packed with a small lumen, where there are many ribosomes and polysomes, as well as a small amount of evenly distributed granules. In the Golgi complex, secretory granules of different sizes are formed. Mitochondria, small with a dense matrix, contain few cristae. Some of them are in an energetically stressed state, are able to hypertrophy and partially lose their cristae or die. The ultramicroscopic organization of neurosecretory cells of the supraoptic nuclei of the anterior hypothalamus of rats was investigated. Under the standard illumination mode (12.00С: 12.00Т), the ultrastructure of neurons indicates a decrease in their functional activity during the light period of the day and growth - in the dark period of the day. Light stress (24.00С: 00Т) leads to significant desynchronosis and causes destructive changes in the components of the structures under study, more pronounced at 02.00 h.

Key words: supraoptic nuclei of the hypothalamus, continuous light, electron microscopy.

Відомості про авторів:

Булик Роман Євгенович – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри медичної біології та генетики Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці;

Власова Катерина Василівна – кандидат медичних наук, доцент кафедри медичної біології та генетики Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці.

Information about the authors:

Bulyk R.Ye. – Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief of the Department of Medical Biology and Genetic of the Bukovinian State Medical University, Chernivtsi City;

Vlasova K.V. – Candidate of Medical Science, Docent of the Department of Medical Biology and Genetic of the Bukovinian State Medical University, Chernivtsi City.

Надійшла 12.07.2020 р.

Рецензент – проф. Черно В.С. (Миколаїв)