

В.П. Пішак, Р.Є. Булик

Добові зміни щільності мелатонінових рецепторів 1А у нейронах супрахіазматичних ядер гіпоталамуса щурів за умов різної функціональної активності шишкоподібної залози

Проведено иммуногистохимическое исследование плотности мелатониновых рецепторов 1А в нейронах супрахиазматических ядер крыс при различной функциональной активности шишковидной железы. В условиях физиологической нормы этот показатель характеризовался четкими суточными колебаниями. В то же время дисфункция железы приводила к выраженному их нарушению. При ее гипофункции плотность исследуемых структур достоверно меньше, чем при гиперфункции. Показано, что при условиях угнетения активности шишковидной железы максимальная оптическая плотность мелатониновых рецепторов в нейронах супрахиазматических ядер гипота-ламуса смецалось с 02.00 на 14.00 и составляло $(0,35 \pm 0,012)$ усл.ед., а при активации железы – наибольший показатель отмечался в 20.00, составляя $(0,43 \pm 0,015)$ усл.ед оптической.

ВСТУП

Головними компонентами фундаментальної організації циркадіанної системи ссавців є сітківка ока, супрахіазматичні ядра (СХЯ) гіпоталамуса та шишкоподібна залоза (епіфіз мозку) [5,6]. СХЯ гіпоталамуса, як провідний водій циркадіанного ритму (пейс-мекер) в головному мозку ссавців, через ретиногіпоталамічний тракт одержують інформацію про зовнішню освітленість і задають ендогенну ритмічність [10]. Водночас сітківка і шишкоподібна залоза беруть участь у запобіганні десинхронізації внутрішніх ритмів [2]. Унікальним положенням на межі нервової й ендокринної систем зумовлена своєрідна модульовальна роль шишкоподібної залози, здатної інтегрувати різні екзогенні й ендогенні сигнали, трансформуючи їх у гормональну відповідь [1, 13]. Універсальним регулятором біологічних ритмів є епіфізарний гормон – мелатонін, продукція якого підпорядкована чіткій добовій періодичності і залежить від зов-

© В.П. Пішак, Р.Є. Булик

нішнього освітлення [8]. Максимум синтезу індоламіну показаний в темну, а мінімум – у світлу фазу доби [5, 11]. Через мелатонінові рецептори (мембранні, цитоплазматичні та ядерні) гормон контролює стан гіпоталамо-гіпофізарної системи й активність ендокринних залоз [4, 7]. Окрім того, за механізмом зворотного зв'язку він бере участь у діяльності самих СХЯ [12, 14]. Авторадіографія та радіоімунний аналіз показали наявність мелатонінових рецепторів у різних структурах мозку людини, кишечнику, яєчниках і кровоносних судинах. Припускають, що рецептори в СХЯ гіпоталамуса регулюють циркадіанний ритм [9]. Таким чином, ефекти гормону зумовлені як різною функціональною активністю шишкоподібної залози впродовж доби, так і різною щільністю рецепторів мелатоніну в СХЯ, через які гормон здійснює коригує ритми циркадіанного осцилятора. Однак відомості щодо характеристики мелатонінових рецепторів у СХЯ гіпоталамуса

залежно від функціонального стану шишкоподібної залози носять фрагментарний характер і не висвітлюють цілісного уявлення про вказані структури.

Метою нашої роботи було імуногістохімічне дослідження щільності мелатонінових рецепторів 1A в СХЯ гіпоталамуса щурів при фізіологічній, гіпер- і гіпофункції шишкоподібної залози.

МЕТОДИКА

Експерименти проведені на 48 статевозрілих самцях безпородних білих щурів масою 0,15–0,18 кг. Тварин утримували при сталій температурі, вологості повітря та вільному доступі до води й їжі. Дослідних щурів поділено на 3 групи, кожна з яких складалася з 4 підгруп (по 6 особин у групі). Тварини I групи (інтактні) перебували 7 діб за умов звичайного світлового режиму – LD (світло з 08.00 до 20.00, освітленість люмінесцентними лампами на рівні кліток 500 лк). Тварини II групи перебували за умов постійного освітлення (LL – моделювання гіпофункції шишкоподібної залози) протягом 7 діб. Тварини III групи знаходилися за умов постійної темряви – світлової депривації (DD – моделювання гіперфункції шишкоподібної залози) впродовж 7 діб. Для виявлення циркадіанних відмінностей мелатонінових рецепторів і враховуючи циклічність продукції мелатоніну щурів декапітували на 8-му добу з 6-годинним інтервалом (02.00, 08.00, 14.00 та 24.00). Всі етапи експерименту проведено з дотриманням основних вимог Європейської конвенції щодо гуманного ставлення до тварин (Страсбург, 1986).

Для імуногістохімічного дослідження ідентифіковану ділянку СХЯ гіпоталамуса фіксували у 10%-му розчині нейтрального забуференого формаліну впродовж 22 год. Після цього виконували прискорене зневоднювання у спиртах висхідної концентрації, заливали у парафін при 58°C з наступним

отриманням гістологічних зрізів завтовшки 5 мкм.

Для виконання імуногістохімічної методики використані поліклональні антитіла до мелатонінових рецепторів 1A фірми “Abscam” (Великобританія) та стрептавідин-біотинову систему візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка та діамінобензидин) фірми “Chemicon International Inc.” (США). Максимально дотримувалися стандартизації протоколу методики для всіх зрізів. Дофарбовування ядер виконували гематоксилином Майєра.

Дослідження інтенсивності зафарбовування проводили за наступною схемою. Спочатку, при використанні об’єктива мікроскопа зі збільшенням у 40 крат, отримували цифрові копії оптичного зображення, які надалі аналізували за допомогою ліцензійної копії комп’ютерної програми “ВидеоТест – Розмер 5.0” (ООО ВидеоТест, Россия, 2000), а саме – проводили комп’ютерну мікроденситометрію. Зображення аналізували у місцях позитивного забарвлення за оптичною щільністю (в умовних одиницях з діапазоном 0–1, причому “0” відповідає абсолютній оптичній прозорості у мікрозонді, а “1” – абсолютній оптичній непрозорості) з використанням мікрозондової методики.

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

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Циркадіанна характеристика мелатонінових рецепторів 1A у СХЯ тварин, які перебували за умов стандартного світлового режиму (фізіологічної функції шишкоподібної залози) надана нами раніше [3]. Зокрема, показано, що за вказаних умов експерименту найвища щільність мелатонінових рецепторів 1A у нейронах СХЯ гіпотала-

муса щурів відмічається о 02.00, а о 08.00 та 14.00 вона суттєво знижена. Крім того, в попередніх дослідженнях показано, що серед нейронів слід виділяти клітини дрібних розмірів (діаметром 5–10 мкм) здебільшого круглястої форми та великі клітини (діаметром 13–24 мкм) полігональної та грушоподібної форми, або зрідка – ованої чи круглястої форми. У дрібних нейронах добові коливання щільності мелатонінових рецепторів характеризуються або явною позитивною реакцією, або повною відсутністю позитивного забарвлення, що дає змогу стосовно цих клітин застосовувати тільки підрахунок їх вказаних варіантів на одиницю площі. У великих нейронах є імуногістохімічне забарвлення, причому воно характеризується різною інтенсивністю впродовж доби.

За умов світлової депривації кількість позитивно забарвлених на мелатонінові рецептори 1A дрібних нейронів СХЯ у полі зору площею 1600 мкм² становила: о 02.00 – 49±1,8, о 08.00 – 47±1,4, о 14.00 – 48±1,3, о 20.00 – 48±1,8, однак результати були невірогідні між вказаними групами дослідження (P>0,05).

Слід відмітити, що оптична щільність мелатонінових рецепторів 1A у великих нейронах СХЯ при тривалому світловому режимі є стабільно високою й у середньому не змінюється впродовж доби (див. таблицю).

Протилежну картину спостерігали у щурів з гіпофункцією шишкоподібної залози. Зокрема, кількість позитивно

забарвлених на мелатонінові рецептори 1A дрібних нейронів СХЯ у полі зору площею 1600 мкм² становила: о 02.00 – 16±0,9, о 08.00 – 15±1,1, о 14.00 – 18±1,1, о 20.00 – 17±1,0. Хоча розбіжності між вказаними групами дослідження невірогідні (P>0,05), однак спостерігається суттєве зниження значення цього показника у всі досліджувані періоди (P<0,001) порівняно з тваринами, яких утримували за умов постійної темряви (гіперфункція епіфіза мозку).

Результати мікроденситометричних досліджень вказують на зниження (P<0,001) імуногістохімічної щільності мелатонінових рецепторів 1A також у великих нейронах СХЯ порівняно з гіперфункцією шишкоподібної залози, хоча впродовж доби коливання показника не відзначається (див. таблицю).

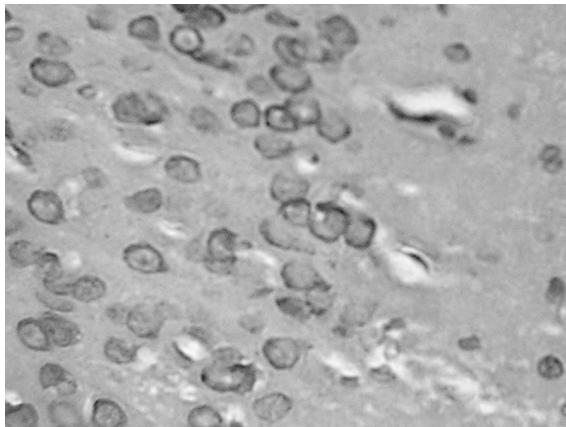
На рисунку видно відмінності оптичної щільності мелатонінових рецепторів 1A за умов гіпо- та гіперфункції шишкоподібної залози.

Таким чином, якщо оптична щільність мелатонінових рецепторів 1A у нейронах СХЯ щурів за умов фізіологічної функції шишкоподібної залози характеризувалася чіткими добовими коливаннями, то дисфункція залози призвела до вираженого їх порушення. При гіпофункції епіфіза мозку щільність досліджуваних структур вірогідно менша, ніж при гіперфункції. Крім того, імуногістохімічне дослідження показало, що за умов пригнічення активності шишкоподібної залози максимальна оптична

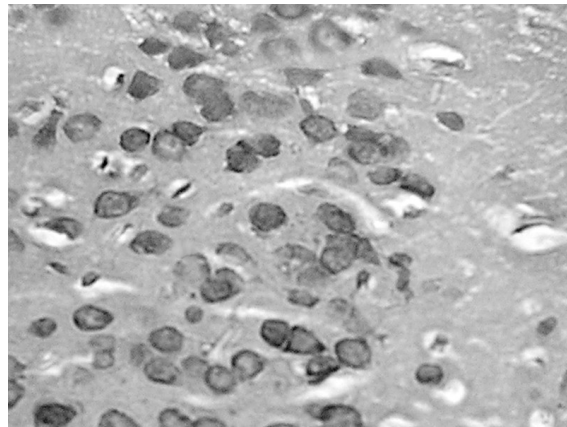
Оптична щільність забарвлення на мелатонінові рецептори 1A у нейронах супрахізматичних ядер щурів за умов моделювання різної функціональної активності шишкоподібної залози (x±Sx)

Години доби	Оптична щільність забарвлення (ум.од.)		
	фізіологічна функція (n=6)	гіпофункція (n=6)	гіперфункція (n=6)
02.00	0,42 ± 0,012	0,33 ± 0,011	0,42 ± 0,016
08.00	0,34 ± 0,008*	0,34 ± 0,011	0,40 ± 0,013
14.00	0,38 ± 0,011*	0,35 ± 0,012	0,41 ± 0,015
20.00	0,41 ± 0,013	0,32 ± 0,011	0,43 ± 0,015

Примітка. n – кількість тварин, * вірогідність різниці (P<0,05) порівняно з попереднім часовим інтервалом у межах групи.



а



б

Щільність мелатонінових рецепторів 1A у нейронах супрахіазматичного ядра щура о 02.00 за умов гіпофункції (а) та гіперфункції (б) шишкоподібної залози.

Імуногістохімічна методика з поліклональними антитілами до мелатонінових рецепторів 1A та стрептавідинбіотиновою системою візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка та діамінобензидин). Дофарбовування клітинних ядер гематоксилином Майєра. Об.40[×], Ок.10[×]

щільність мелатонінових рецепторів у нейронах СХЯ гіпоталамуса зміщується з 02.00 на 14.00 і становить $0,35 \text{ ум.од.} \pm 0,012 \text{ ум.од.}$, а при активації залози – найбільше значення було о 20.00 ($0,43 \text{ ум.од.} \pm 0,015 \text{ ум.од.}$).

Наступні дослідження у цьому напрямку дадуть змогу глибше дослідити участь центральних апаратів у механізмах циркадіанних ритмів головного мозку ссавців.

V.P.Pishak, R.Ye.Bulyk

CIRCADIAN CHANGES OF THE DENSITY OF MELATONIN RECEPTORS 1A IN THE NEURONS OF THE SUPRACHIASMATIC NUCLEI OF THE RAT HYPOTHALAMUS UNDER CONDITIONS OF DIVERSE FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE PINEAL GLAND

An immunohistochemical study of the density of melatonin receptors 1A in the neurons of the rat suprachiasmatic nuclei with diverse functional activity of the pineal gland has been carried out. The density of melatonin receptors 1A under conditions of the physiological function of the pineal gland was characterized by clear-cut diurnal variations. Simultaneously, a dysfunction of the gland results in their marked disturbance. In case of a hypofunction of the pineal body the density of the structures was reliably lower than in case of hyperfunction. It has been demonstrated that in case of a suppressed activity of the pineal body the maximum number of melatonin receptors

1A in the neurons of the hypothalamic suprachiasmatic nuclei shifts from 02.00 a.m. to 02.00 p.m. and constitutes $0,35 \pm 0,012$ conventional units (c.u.) of density, whereas a larger index is noticed at 20 hours making up $0,43 \pm 0,015$ c.u. of density when the gland is activated.

Bukovinian State Medical University, Chernivtsi

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Анисимов В.Н. Мелатонин: перспективы применения для профилактики рака и преждевременного старения // Вест. восстанов. медицины. – 2007. – №1 (19). – С.4–7.
2. Бондаренко Л.О. Значення взаємодії факторів внутрішнього і зовнішнього середовища в регуляції функціональної активності пинеальної залози: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – К., 2003. – 36 с.
3. Булик Р.Є. Циркадіанні зміни мелатонінових рецепторів 1A у супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса // Інтегративна антропологія. – 2007. – №2. – С.22–24.
4. Воронков А.Э., Иванов А.И., Баскин И.И. и др. Изучение механизма связывания лигандов мелатонинных рецепторов человека методом молекулярного моделирования // Докл. РАН. – 2005. – **403**, №3. – С.409–413.
5. Заморский И.И., Пишак В.П. Функциональная организация фотопериодической системы головного мозга // Успехи физиол. наук. – 2003. – **34**, №4. – С.37–53.
6. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. Хронобиология и хрономедицина. – М.: Триада-Х, 2000. – 488 с.
7. Смирнов А.Н. Ядерные рецепторы мелатонина //

- Биохимия. – 2001. – **66**, №1. – С.28–36.
8. Arendt J. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects // J. Biol. Rhythms. – 2005. – **20**. – P.291–303.
 9. Dubocovich M.L, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals // Endocrine. – 2005. – **2**. – P.101–110.
 10. Golombek D.A., Ferreyra G.A., Katz M.E. et al. Neurochemistry of mammalian entrainment: Signal transduction pathways in the suprachiasmatic nuclei // Biol. Rhythm Res. – 2000. – **31**, №1. – P.56–70.
 11. Green C., Menaker M. Circadian rhythms. Clocks on the brain // Science. – 2003. – **301**, №5631. – P.319–320.
 12. Klante G., Secci K., Masson-Pevet M. et al. Interstrain differences in activity pattern, pineal function, and SCN melatonin receptor density of rats // Amer. J. Physiol. – 1999. – **276**, №4, Pt 2. – P.R1078–R1086.
 13. Reiter R. J. Melatonin: clinical relevance // Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. – 2003. – **17**, № 2. – P.273–285.
 14. Witt-Enderby P., Bennett J., Jarzynka M. et al. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms // Life Sci. – 2003. – **72**, №2. – P.2183–2198.

Буковин. мед. ун-т, м. Чернівці
E-mail: bulyk@bsmu.edu.ua

Матеріал надійшов до
редакції 13.03.2008