

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ім. М.І.ПИРОГОВА**

БУЛИК РОМАН ЄВГЕНОВИЧ

УДК 612.82.017.2

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ МЕХАНІЗМІВ
ЦИРКАДІАННИХ РИТМІВ У ЩУРІВ**

14.03.01 – нормальна анатомія
14.03.03 – нормальна фізіологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук

Вінниця – 2009

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Буковинському державному медичному університеті МОЗ України.

НАУКОВИЙ КОНСУЛЬТАНТ: член-кореспондент АПН України,
доктор медичних наук, професор
Пішак Василь Павлович,
Буковинський державний медичний університет МОЗ України,
завідувач кафедри медичної біології, генетики та гістології

ОФІЦІЙНІ ОПОНЕНТИ: доктор медичних наук, професор
Черкасов Віктор Гаврилович
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця
МОЗ України, завідувач кафедри анатомії людини

член-кореспондент НАН України, член-кореспондент РАМН,
академік АМН України, доктор медичних наук, професор
Коркушко Олег Васильович
Інститут геронтології АМН України, завідувач відділу клінічної
фізіології та патології внутрішніх органів

доктор медичних наук, професор
Масловський Сергій Юрійович
Харківський національний медичний університет МОЗ України,
завідувач кафедри гістології, цитології й ембріології

Захист відбудеться “___” _____ 2009 р. о ___ годині
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 05.600.02 Вінницького національного
медичного університету ім. М.І.Пирогова МОЗ України (21018, м. Вінниця,
вул. М.І.Пирогова, 56).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Вінницького національного
медичного університету ім. М.І.Пирогова МОЗ України (21018, м. Вінниця,
вул. М.І.Пирогова, 56).

Автореферат розісланий “___” _____ 2009 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Власенко О.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Проблема з'ясування механізмів періодичних коливань біологічних систем залишається одним з актуальних питань біології та медицини з огляду на те що, для будь-якого організму (від примітивних до високоорганізованих істот) ритмічність функціонування – невід'ємна і фундаментальна властивість (Пішак В.П., 1985-2008; Агаджанян Н.А. и соавт., 1998; Комаров Ф.И. и соавт., 2004; Sladek M. et al., 2007). Новітніми досягненнями в галузі хронофізіології визначено фундаментальні основи часової організації біологічних систем, її регулювальний вплив на ендокринні залози, з'ясовані принципи зворотного впливу гормонів периферійних залоз на ритморегулювальний апарат (Бондаренко Л.А., Губина-Вакулик Г.И., 2005; Арушанян Э.Б., Бейер Э.В., 2006; Alarma-Estrany P., Pintor J., 2007). Однак цілісне розуміння механізмів циркадіанних ритмів (ЦР) головного мозку ссавців не можливе без подальшого поглибленого вивчення процесів хрононейроендокринної інтеграції в їх формуванні.

Найбільш вивченими є білядобові ритми з періодом, близьким 24-ом годинам (Ром-Бугославская Е.С., Бондаренко Л.А., 1995; Романов Ю.А., 2000; Tamanini F., 2007). На роль провідного водія (пейсмейкера) ритму циркадіанних коливань у головному мозку ссавців претендують супрахіазматичні ядра (СХЯ) гіпоталамуса, а ендокринним посередником у цьому процесі є шишкоподібна залоза (ШЗ) (Пішак В.П., 1985-2008; Reiter R.J., 1989-2003; Анисимов В.Н., 2007). Унікальним положенням на межі нервової й ендокринної систем зумовлена своєрідна модульовальна роль ШЗ, здатної інтегрувати різні екзогенні й ендогенні сигнали, трансформувати їх у гормональну відповідь і сприяти адаптогенезу (Коркушко О.В., Шатило В.Б., 2004; Hofman M.A., Swaab D.F., 2006).

Універсальним регулятором біологічних ритмів є мелатонін – еволюційно давня молекула, яка виявляється у всіх хребетних, багатьох безхребетних тварин і навіть у деяких рослин та одноклітинних еукаріотів (Заморский И.И., Пишак В.П., 2003; Рапопорт С.И., Малиновская Н.К., 2006). Щодо ссавців, основна частка хронобіотика секретується в ШЗ та чітко підпорядкована фотоперіоду – найнадійнішому і найстабільнішому синхронізувальному чиннику для гомойотермних тварин, зокрема, людини. Тісно пов'язана з СХЯ і ПВЯ гіпоталамуса, структурами лімбічної системи та сітківкою ШЗ бере участь у спряженні з фотоперіодизмом ЦР (Логвинов С.В. и соавт., 2003; Mills E. et al., 2005; Hannibal J., 2006). Порушення світлового режиму (тривале освітлення, постійна темрява) є визначальним стресором, що призводить до дисбалансу синтезу мелатоніну і розвитку десинхронозу (Anisimov V.N., 2002; Губин Г.Д., 2004; Чибисов С.М. и соавт., 2006). Незважаючи на певні успіхи у вивченні структури і функції ШЗ, у літературі трапляються суперечливі та неоднозначні дані про її ефекти на хрономорфологічний та ультраструктурний стан СХЯ, структури лімбічної системи – гіпокампа, периферичної ланки – надниркових залоз, тісно пов'язаних з організацією та реалізацією ЦР. Виходячи із цих позицій, існує необхідність ретельного дослідження архітекτονіки СХЯ, ШЗ, гіпокампа, надниркових залоз залежно від тривалості

фотоперіоду, що дасть змогу детально проаналізувати функціональний взаємозв'язок між вказаними структурами.

Нез'ясованими залишаються питання стосовно щільності мелатонінових рецепторів у СХЯ, гіпокампі залежно від періоду доби та при блокаді пейсмейкера ЦР, оскільки відомо, що ШЗ через мелатонінові рецептори (мембранні, цитозольні та ядерні) здійснює прямий контроль над структурами, залученими у формування часової організації (Witt-Enderby P.A. et al., 2003; Dubocovich M., Markowska M., 2005; Воронков А.Э.и соавт., 2005).

Недостатньо висвітленою в науковій літературі залишається проблема організації центральних механізмів ЦР головного мозку, пов'язаної з дисфункцією ШЗ. Не розкрито морфометричний та функціональний стан водія ЦР – СХЯ, а також кортикотропін-релізінг-синтезувальних медіальних дрібноклітинних суб'ядер ПВЯ (мдПВЯ) та вазопресин-продукувальних латеральних великоклітинних суб'ядер ПВЯ (лвПВЯ) у нормі та при гіпер- і гіпофункції ШЗ.

Не з'ясовані питання, що торкаються залежності від зміни світлового режиму рівня експресії гена ранньої функціональної активності *c-fos*, який детермінує продукцію імуноспецифічного білка c-Fos у СХЯ, мдПВЯ, лвПВЯ. Відповідний білок причетний до організації ритмічної діяльності вказаних гіпоталамічних утворень.

Суперечливі літературні дані щодо стрес-індукованих порушень функціонування ШЗ: є посилення як на активацію, так і гальмування чи повну відсутність реакції з боку мелатонінутворювальної функції залози при стресі залежно від виду, інтенсивності та тривалості дії чинника, а також інтервалу доби, коли його застосовують (Фролькіс В.В., 1999; Бондаренко Л.О., 2003).

На даний час отримані переконливі докази широкого кола ефектів як мелатоніну, так і епіфізарних пептидів, які здійснюють інформаційний зв'язок між різними клітинними групами, і таким чином, впливають на їх функціональну активність (Коркушко О.В. и соавт., 2004; Arendt J., 2005; Alarma-Estrany P., Pintor J., 2007). У Санкт-Петербурзькому Інституті біорегуляції і геронтології ПЗВ РАМН синтезований тетрапептид епіталон, що володіє високою біологічною активністю (Хавинсон В.Х., Малинин В.В., 2006). Накопичений експериментальний і клінічний досвід використання природних та синтезованих епіфізарних препаратів свідчить про безсумнівну перспективність їх застосування для лікування та профілактики десинхронозів. Однак відомості щодо впливу мелатоніну й епіталону на морфофункціональний стан та експресію гена *c-fos* у структурах, залучених у формування механізмів ЦР, залежно від тривалості фотоперіоду в різні добові періоди носять фрагментарний характер і не висвітлюють цілісного уявлення про проблему.

З'ясування архітекτονіки і морфофункціональної організації головних (СХЯ, суб'ядер паравентрикулярних ядер (ПВЯ) гіпоталамуса, шишкоподібної залози, гіпокампа) та периферичних (надниркові залози) компонентів хроноперіодичної системи, характеристика щільності мелатонінових рецепторів, аналіз рівня експресії гена ранньої функціональної активності *c-fos* у гіпоталамічних утвореннях залежно від тривалості фотоперіоду дасть можливість не тільки розширити сучасні уявлення про ступінь залучення вказаних структур у формування циркадіанних ритмів

головного мозку ссавців, усвідомити вузькі місця у центральних механізмах їх регуляції, але й науково обґрунтувати застосування експериментальної терапії при хронопатологічних явищах, викликаних дисфункцією шишкоподібної залози.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри медичної біології, генетики та гістології Буковинського державного медичного університету (м. Чернівці) “Вплив стресу та солей важких металів на хроноритми функцій нирок та морфологічні показники деяких ендокринних органів” (№ державної реєстрації 0104U009025). Автор є співвиконавцем зазначеної теми, виконавцем фрагменту “Центральні механізми циркадіанних ритмів головного мозку щурів”.

Мета і задачі дослідження. З'ясувати механізми циркадіанних ритмів у щурів, а також роль шишкоподібної залози в механізмах корекції відхилень морфологічного та функціонального стану структур фотоперіодичної системи тварин за різної тривалості фотоперіоду.

Для досягнення вказаної мети були поставлені такі задачі:

1. Оцінити морфологічні й ультрамікроскопічні зміни центральних (супрахіазматичні ядра, шишкоподібна залоза, гіпокамп) та периферичних (надниркові залози) структур фотоперіодичної системи щурів у різні періоди доби.
2. Вивчити динаміку світлооптичних та електронномікроскопічних перебудов компонентів фотоперіодичної системи в умовах світлового стресу.
3. Проаналізувати щільність мелатонінових рецепторів у структурах головного мозку за фізіологічної, гіпер-, гіпофункції шишкоподібної залози.
4. Охарактеризувати щільність мелатонінових рецепторів у гіпокампі за різної епіфізарної активності та при зруйнуванні супрахіазматичних ядер гіпоталамуса.
5. З'ясувати особливості морфометричних змін супрахіазматичних ядер гіпоталамуса щурів за різної функціональної активності шишкоподібної залози.
6. Оцінити коливання концентрації РНК у нейронах супрахіазматичного ядра гіпоталамуса у щурів при епіфізарній дисфункції.
7. Установити закономірності змін перерізу тіл, компонентів нейронів, концентрації в них РНК, ядерно-цитоплазматичного співвідношення, питомих об'ємів ядер і цитоплазми паравентрикулярних ядер гіпоталамуса в циркадіанному аспекті.
8. Охарактеризувати стан експресії гена ранньої функціональної активності *c-fos* у структурах гіпоталамуса щурів за фізіологічних умов та при порушенні світлового режиму.
9. Встановити кореляційні зв'язки між морфофункціональними перебудовами компонентів циркадіанного блоку на фоні зміненої тривалості циклу світло-темрява в різні періоди доби.
10. Провести медикаментозну терапію мелатоніном і епіталоном з метою корекції морфофункціональних змін при гіпопінеалізмі та обґрунтувати доцільність їх застосування.

Об'єкт дослідження: циркадіанні ритми головного мозку в щурів.

Предмет дослідження: залежність формування циркадіанних ритмів головного мозку в щурів від архітекτονіки та морфофункціональної організації центральних і периферичних компонентів хроноперіодичної системи.

Методи дослідження: фізіологічні (з'ясування функціонального стану супрахіазматичних ядер, латеральних великоклітинних і медіальних дрібноклітинних суб'ядер паравентрикулярних ядер гіпоталамуса), біохімічні (визначення концентрації мелатоніну в плазмі крові), імуногістохімічні (застосування поліклональних антитіл до мелатонінових рецепторів 1A), імунофлуоресцентні (ідентифікація імуноспецифічного білка c-Fos у гістологічних зрізах гіпоталамуса), морфометричні, денситометричні (аналіз нейронів гіпоталамуса і кількісне визначення вмісту в них РНК), гістологічні (вивчення досліджуваних структур на світлооптичному рівні), електронно мікроскопічні, математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі на основі експериментального дослідження вперше розкрито нові, невідомі раніше, закономірності хроноритмічної організації компонентів фотоперіодичної системи щурів залежно від функціональної активності ШЗ. Вперше експериментально обґрунтовано концепцію фотозалежної хроноорганізації циркадіанних ритмів, згідно з якою порушення тривалості фотоперіоду викликає дисбаланс синтезу мелатоніну, що є ключовою ланкою дезорганізації механізмів добової періодичності у щурів.

Вперше встановлено більш виражені загальні добові закономірності перебудов морфофункціональних параметрів компонентів циркадіанної системи – вентролатерального відділу супрахіазматичних ядер та нонапептидергічних нейросекреторних популяцій суб'ядер паравентрикулярних ядер гіпоталамуса, шишкоподібної залози, гіпокампа, надниркових залоз при епіфізарній гіпофункції, ніж при її гіперфункції.

На підставі комплексного вивчення характеру щільності мелатонінових рецепторів у нейронах СХЯ та гіпокампа впродовж доби отримано переконливі докази фотоіндукованого її порушення з припиненням добових коливань у середніх тенденціях, а також з підсиленням варіації індивідуальної реакції структури лімбічної системи тварин на зруйнування пейсмерних нейронів.

Вперше показано, що індикатором раннього десинхронозу центральних механізмів циркадіанних ритмів головного мозку щурів є порушення експресії гена швидкої функціональної відповіді *c-fos* і детермінованого ним імуноспецифічного білка c-Fos у пейсмерних нейронах супрахіазматичних і кортикотропін-релізінг-гормонпродукувальних та вазопресин-синтезуювальних суб'ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса при диспінеалізмі.

Встановлена закономірність, згідно з якою введення синтетичного біорегулятора епіталону (0,5 мкг/кг) корегувало інтенсивність синтезу і секреції гормонів досліджуваних структур, підвищувало резистентність ультраструктур до світлового стресора та істотно покращувало показники площі перерізу компонентів нейронів СХЯ, а мелатоніну (0,5 мг/кг) – концентрацію в них РНК.

Практичне значення одержаних результатів. Результати проведених експериментальних досліджень розширюють уяву про механізми хрононейроендокринної інтеграції у формуванні циркадіанних ритмів, і зокрема участь у них нейроендокринного трансдуктора – шишкоподібної залози.

Розкриття фундаментальних основ функціонування та генної експресії нейросекреторних клітин гіпоталамічних ядер залежно від тривалості фотоперіоду створює передумови для розробки схем профілактики і лікування десинхронозів, пов'язаних з порушеннями епіфізарної активності.

Здійснено пошук фармакологічних препаратів з метою стимуляції мелатонін-утворювальної функції шишкоподібної залози. Науково обґрунтовано доцільність застосування синтетичного біорегулятора епіталону для корекції морфофункціональних та імуногістохімічних порушень центральних ланок циркадіанної ритміки при гіпопінеалізмі.

Результати роботи впроваджені в науковий та навчальний процеси на кафедрах медичної біології, генетики та гістології, нормальної, патологічної фізіології, фармакології, фармації Буковинського державного медичного університету, Чернівецького національного університету ім. Ю. Федьковича, Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького, Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова, Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я.Горбачевського, Дніпропетровської державної медичної академії, використовуються в науково-дослідній роботі НДІ медико-екологічних проблем МОЗ України.

За результатами досліджень отримано деклараційний патент України на корисну модель (№и 200707859) «Спосіб дослідження циркадіанних змін мелатонінових рецепторів 1А у супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса», підготовлено інформаційний лист та галузеве нововведення.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто здійснено розробку основних теоретичних положень роботи, проведено аналіз та реферування літературних джерел. Здобувач оволодів методами патофізіологічних досліджень, провів набір і обробку фактичного матеріалу. Електронномікроскопічні дослідження проведені на базі Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я.Горбачевського під керівництвом та за участю д.б.н., проф. Волкова К.С. Морфометричний і денситометричний аналіз нейронів гіпоталамуса та кількісний аналіз вмісту в них РНК проводили на базі Запорізького державного медичного університету за участю д.мед.н., проф. Абрамова А.В. Дисертантом написано всі розділи дисертації, сформульовано основні положення та висновки, підготовлено до друку результати власних досліджень. Запозичень ідей та розробок співавторів публікацій не було. Матеріали кандидатської дисертації у написанні докторської дисертації не використовувалися.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дослідження доповідалися та обговорювалися на міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених “Вчені майбутнього” (м. Одеса, 2005); регіональній науково-практичній конференції “Актуальні питання імунології, алергології та ендокрино-

логії” (м. Чернівці, 2006); XVII з’їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченому 125-річчю з дня народження О.О.Богомольця (Київ-Чернівці, 2006); Всеукраїнській науковій конференції “Актуальні питання вікової анатомії та ембріотопографії” (м. Чернівці, 2006); науково-практичній конференції з міжнародною участю “Хронобіологія і хрономедицина: теоретичні та клінічні перспективи” (м. Чернівці, 2006 р.); XII Міжнародному симпозиумі “Эколого-физиологические проблемы адаптации” (Москва, 2007); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених “Медична наука – 2007” (м. Полтава, 2007); Всеукраїнській науково-практичній конференції, присвяченій 100-річчю з дня народження проф. Н. М. Шінкермана “Патологоанатомічна діагностика хвороб людини: здобутки, проблеми, перспективи” (м. Чернівці, 2007); Міжнародному симпозиумі, присвяченому 80-річчю з дня народження акад. РАМН Н. А. Агаджаняна “Адаптационная физиология и качество жизни: проблемы традиционной и инновационной медицины” (Москва, 2008); Всеукраїнській науково-практичній конференції “Прикладні аспекти морфології експериментальних і клінічних досліджень” (м. Тернопіль, 2008); V міжнародній медико-фармацевтичній конференції студентів і молодих вчених, присвяченій 600-річчю Чернівців (м. Чернівці, 2008); IV конференції Українського товариства нейронаук з міжнародною участю (м. Славянськ, 2008); V Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю “Сучасні проблеми патофізіології: від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів” (м. Запоріжжя, 2008); міжнародному конгресі студентів і молодих вчених (м. Новий Сад, Сербія, 2008); Всеукраїнській науково-практичній конференції “Актуальні проблеми сучасної морфології”, (м. Луганськ, 2008); міжнародній Львівсько-Люблінській науково-практичній конференції з міжнародною участю “Сучасні аспекти експериментальної та клінічної біохімії”, (м. Люблін, Польща, 2008); Первом Российском съезде по хронобиологии и хрономедицине с международным участием (м. Владикавказ, РПО-Аланія, Росія, 2008); підсумкових наукових конференціях співробітників Буковинського державного медичного університету (м. Чернівці, 2004-2008).

Публікації. Основні наукові положення, висновки і практичні рекомендації викладені в 35 опублікованих працях, із них 22 статті (одноосібних – 14) у фахових наукових виданнях, рекомендованих ВАК України, де можуть публікуватися матеріали докторських та кандидатських дисертацій. Отримано деклараційний патент України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалу і методів дослідження, 11 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел. Обсяг основного тексту викладений на 324 сторінках машинописного тексту, робота ілюстрована 53 таблицями, 83 рисунками. Список літератури включає 520 джерел (256 – кирилицею, 264 – латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріал, методи та моделі досліджень. Дослідження проведені на 342 статевозрілих нелінійних самцях білих щурів масою 200-230 г. Вибір статі тварин зумовлений більшою вразливістю нейроендокринної регуляції стрес-реактивності у самців (Ткачук С.С., 2000). Адаптивні системи самок динамічніші, надійніші і мають більшу резервну потужність, а, отже, саме у самців легше виявити нейрохімічні, ендокринні та морфологічні кореляти зрушень, викликаних впливом стресу. До початку експерименту тварин утримували в твариннику при сталій температурі, вологості повітря та вільному доступі до води й їжі. Усі експерименти проведені в літньо-осінній період, оскільки за літературними джерелами, це є період стабільної сезонної активності кори надниркових залоз (Клочкова Г.М. и соавт., 1990).

Експериментальні щури поділені на 9 серій досліджень. Кожна з останніх у свою чергу, складалася з двох груп. Тварини серії: №1 – (інтактні) перебували в умовах стандартного світлового режиму. Люмінесцентні лампи вмикали з 08.00 до 20.00 год, освітленість приміщення на рівні тварин становила 500 лк впродовж 7-ми діб; №2 – (контроль) знаходилися за тих же умов експерименту, як і щури серії №1, проте щоденно о 19.00 год внутрішньоочеревинно отримували ін'єкцію 1,0 мл розчинника (0,9% розчин етанолу на фізіологічному розчині); №3 – знаходилися в умовах експерименту, як і щури серії №1, щоденно о 19.00 год внутрішньоочеревинно 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); №4 – перебували при постійному освітленні люмінесцентними лампами (моделювання гіпофункції ШЗ) протягом 7-ми діб; №5 – знаходилися в умовах експерименту, як і щури серії №4. Їм щоденно о 19.00 год внутрішньоочеревинно 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); №6 – знаходилися в умовах експерименту, як і щури серії №4, які щоденно о 19.00 год підшкірно отримували ін'єкцію епіталону (Санкт-Петербурзький Інститут біорегуляції і геронтології ПЗО РАМН, Росія) у дозі 0,5 мкг/кг, у 0,5 мл фізіологічного розчину; №7 – перебували в умовах стандартного світлового режиму, їм проводили електролітичне зруйнування СХЯ гіпоталамуса; №8 – перебували в умовах стандартного світлового режиму, їм виконували псевдооперацію електролітичного зруйнування СХЯ гіпоталамуса; №9 – знаходилася в умовах постійної темряви – (моделювання гіперфункції ШЗ) впродовж 7-ми діб. Експерименти в серії №8 та в нічний період доби в серіях №1, 2, 3 проводили при слабкому (2 лк) червоному світлі, оскільки воно практично не впливає на біосинтез мелатоніну ШЗ.

При виконанні досліджень дотримувалися Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях (1986), Директиви ЄЕС №609 (1986) та наказу МОЗ України №281 від 01.11.2000 р. „Про заходи щодо подальшого вдосконалення організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин”.

Після закінчення 7-денного експерименту наступного дня о 14.00 і о 02.00 год здійснювали виведення тварин з експерименту шляхом одномоментної декапітації під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг внутрішньоочеревино).

Концентрацію мелатоніна в сироватці крові визначали імуноферментним методом з використанням тест-системи Direct Saliva Melatonin Elisa фірми Bugelmann (Швейцарія).

З метою виявлення морфофункціональних відмінностей досліджуваних структур та враховуючи циклічність продукції мелатоніну забір біоматеріалу здійснювали з 12-годинним інтервалом (о 14.00 і о 02.00 год).

Для комп'ютерної морфометрії отримували цифрові копії зображень досліджуваних структур з використанням мікроскопа ЛЮМАМ-Р8 (об'єтив 40^x – для цитометричних досліджень, окуляр 10^x – для гістологічних досліджень, окуляр 10^x для всіх досліджень) та цифрової камери Olympus C740UZ. Потім цифрові копії зображення аналізували за допомогою ліцензійної версії комп'ютерної програми "ВидеоТест – Размер 5.0" (ООО Видеотест, Россия) – проводили комп'ютерну мікроденситометрію із застосуванням показників, які вказані в результатах дослідження.

Для електронно-мікроскопічних досліджень шматки завтовшки 2-3 мм з ділянки локалізації супрахіазматичних ядер гіпоталамуса, гіпокампа, шишкоподібну та надниркові залози поміщали в 2,5 % розчин глютаральдегіду з активною реакцією середовища 7,3-7,4 на фосфатному буфері Міллонга. Подальшу обробку і дослідження матеріалу проводили за загальноприйнятою методикою (Dijkstra M.J., 1992). Вивчення і фотографування препаратів здійснювали за допомогою електронних мікроскопів ЕМВ-100 ЛМ та ЕМ 125 К.

Для ідентифікації c-Fos у гістологічних зрізах гіпоталамуса застосовували непрямий імунофлуоресцентний метод. Як первинні антитіла використовували кролячі антитіла (IGG) до cFos (Sigma-Aldrich, США). В якості вторинних антитіл слугували козячий гаммаглобулін проти глобулінів кролика, кон'югований з флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC) (Sigma-Aldrich, США). Ідентифікацію c-Fos у нейронах гіпоталамуса і кількісний аналіз його вмісту проводили на комп'ютерній системі цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі.

Топографічну приналежність імунопозитивних нейронів окремим структурам гіпоталамуса картували відповідно до стереотаксичного атласу мозку щура (Paxinos G.D. Watson C.C., 1985). Приналежність ідентифікованих нейронів окремим суб'ядрам паравентрикулярного ядра (ПВЯ) здійснювали на підставі топографічної і функціональної класифікації, що наведена в роботах Armstrong W.E. et al. (1980), Swanson L.W., Kupers H.G. (1980), Swanson L.W., Sawchenko P.E. (1983), Гоуфманом Е.И. (1985, 1990). З огляду на те, що медіальне дрібноклітинне суб'ядро ПВЯ синтезує кортикотропін-рилізінг фактор (КРФ), а латеральне великоклітинне суб'ядро містить вазопресин-синтезувальні нейрони і обидва залучені в нейроендокринну відповідь при різноманітних стресових реакціях організму, це визначило їх вибір для з'ясування реакції нейроендокринної системи при порушенні світлового режиму.

Морфометричний і денситометричний аналіз нейронів гіпоталамуса і кількісний аналіз вмісту в них РНК проводили на комп'ютерній системі цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) у видимому спектрі: інтерактивно визначалися межі тіла нейрона, його ядра і ядерця, а потім автоматично обчислювали площу перерізу виділених об'єктів, концентрацію і вміст у них РНК.

На підставі отриманих показників обчислювалася концентрація РНК у виділених структурах нейронів K_i (умовних одиниць оптичної щільності – од.опт. щільності): $K_i = |\lg(D_i / D_0)|$, і вміст РНК у виділених структурах нейронів C_i (одиниць оптичної щільності – од.опт. щільності): $C_i = S_i \cdot |\lg(D_i / D_0)|$, де S_i - площа структури нейрона (мкм^2), а D_i і D_0 - показники оптичної щільності виділених структур нейронів і міжклітинної речовини («фону» препарату), відповідно.

З метою виконання імуногістохімічної методики використані поліклональні антитіла до мелатонінових рецепторів 1A виробника Abcam (Велика Британія) та стрептавідинбіотинову систему візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка+діамінобензидин) виробника Chemicon International Inc. (США). Дофарбовування ядер проводили гематоксиліном Майєра.

Тваринам 7-ої серії під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг внутрішньоочеревинно) здійснювали двобічну електрокоагуляцію супрахізматичних ядер переднього гіпоталамуса. Щурів скальпували і проводили трепанацію черепа. Сталеві електроди ($d=0,2$ мм) вводили в головний мозок тварин за стереотаксичними координатами (Рахінос Г., 1983): $AP=-1,0$, $L=\pm 0,2$, $H=9,4$. Електрокоагуляцію здійснювали анодним струмом (1 мА) впродовж 20 с. Зруйнування супрахізматичних ядер при електрокоагуляції верифікували на зрізах мозку, які зафарбовували крезил-віолетом.

У 8-ій серії щурам застосовували "псевдооперацію" для виключення можливого впливу оперативного втручання на інтерпретацію результатів: електроди вводили в головний мозок за указаними стереотаксичними координатами, однак при цьому не подавали електричного струму.

При статистичній обробці даних морфометрії надниркових залоз вираховували середню арифметичну та її похибку, використовуючи критерій Хана-Шапіро-Уілкі. Вірогідність різниці між групами дослідження визначали за допомогою двостороннього непарного критерію Стьюдента. Результати вважали вірогідними при $p \leq 0,05$.

Коефіцієнт кореляції визначали за методом (О. І. Мерков, Л. Є. Поляков, 1974), де r_{xy} незалежно від знаку приймали за величин від 0 до 0,29 – як малу; 0,30 - 0,69 – як середню; 0,70 - 1,0 – як сильну кореляцію. Для виявлення вірогідності відмінностей результатів у дослідних і контрольних групах тварин визначали коефіцієнт Стьюдента (t), вірогідність відмінності вибірок (p) і довірчий інтервал середньої за таблицями розподілу Стьюдента. Вірогідними вважали значення, для яких $p < 0,05$.

При імуноцитохімічному дослідженні комп'ютерну мікроденситометрію проводили за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми "ВидеоТест – Размер 5.0" (ООО Видеотест, Россия). Враховуючи необхідність виконання множинних

статистичних порівнянь середніх величин у статистичних вибірках, для визначення відмінностей між сукупностями використаний критерій Ньюмена-Кейлса. Розбіжність у варіюванні індивідуальних величин вимірюваного показника оцінювали за допомогою двох відповідних цьому завданню статистичних методів – критерію Фішера та критерію Левене (Hardle W. et al., 2007).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Гістологічна та субмікроскопічна організація супрахіазматичних ядер гіпоталамуса, шишкоподібної залози, гіпокампа, надниркових залоз за різної тривалості фотоперіоду та введення епіталону

Результати ультраархітекtonіки пейсмейкерних нейронів СХЯ гіпоталамуса щурів, яким моделювали епіфізарну гіпер- чи гіпофункцію вказують на більш виражені порушення структури досліджуваних нейронів в умовах пригніченої функціональної активності ШЗ, ніж при її підвищеній функції. Ін'єкції синтетичного тетрапептиду епіталону (0,5 мкг/кг маси тіла) на фоні епіфізарної гіпофункції призвели до нормалізації нейронного складу нейросекреторних клітин вентролатерального відділу СХЯ гіпоталамуса, що особливо помітно проведеними дослідженнями о 02.00 год.

Аналіз морфологічної та ультрамікроскопічної архітекtonіки ШЗ дозволяє підсумувати, що у тварин, які перебували в умовах світлової депривації ультраструктурна організація ШЗ показала переважання світлих клітин, ядра яких мають покрайний контур і містять у собі 1-2 ядерця; у цитоплазмі виявляється невелика кількість мітохондрій, активний КГ, вільні рибосоми та полісоми, багато дрібних везикул. У полі зору трапляються темні (запасні) форми пінеалоцитів. Описана структура свідчить про підвищену активність пінеальної залози 02.00 год. В умовах цілодобового освітлення гістологічна і субмікроскопічна організація пінеалоцитів віддзеркалюється більш вираженими порушеннями реактивного характеру на тлі пригнічення біосинтетичних внутрішньоклітинних процесів. Зокрема, о 02.00 год це структурно проявляється гіпертрофованими мітохондріями і зменшенням числа рибосом, помірно розширеними цистернами КГ і каналцями гранулярного ЕПР. Біохімічно відзначено різке пригнічення рівня гуморального медіатора організації циркадіанних ритмів у плазмі крові впродовж добових інтервалів.

Застосований епіталон (0,5 мкг/кг маси тіла) протективно впливає на ультраструктуру пінеалоцитів щурів, які знаходилися в умовах постійного освітлення; індукує компенсаторно-адаптаційні перебудови, спричинює відновлення серотонін-продукувальної активності залози в денний період та зростання о 02.00 год кількості гранул мелатоніну в пінеалоцитах і рівня хронобіотика в плазмі крові. Біохімічне визначення концентрації мелатоніну в плазмі крові підтвердило нормалізувальний ефект уведення епіталону на фоні стрес-індукованих змін, яка сягала $99,2 \pm 13,89$ пг/мл (рис. 1). Одним з механізмів впливу епіталону на функціональний стан ШЗ при дії постійного освітлення, на нашу думку, може бути тенденція до нормалізації балансу нейромедіаторів у мозкових структурах, і, як наслідок, відновлення чутливості залози до периферичних регуляторних сигналів.

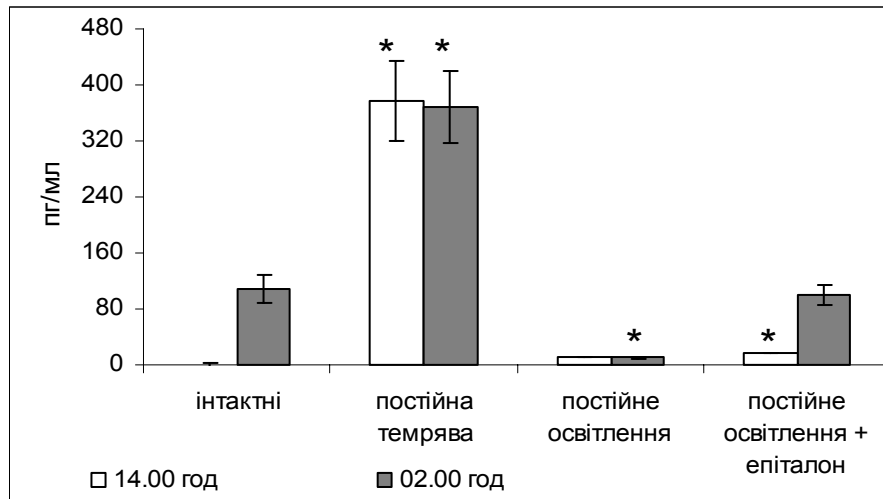


Рис. 1. Вплив епіталону (0,5 мкг/кг маси тіла тварини) на динаміку концентрації мелатоніну в сироватці крові щура.
Примітка. На цьому і наступних рисунках * – вірогідність різниці ($p < 0,05$) порівняно з аналогічним часовим інтервалом в інтактній групі.

За семидобової темряви (моделювання епіфізарної гіперфункції) світлооптична організація гіпокампа характеризується порушенням ритмічності та зниженням функціональної активності нейронів гіпокампа як о 14.00 год, так і о 02.00 год. В умовах цілодобового постійного освітлення (моделювання гіпофункції ШЗ), особливо о 02.00 год, мікроскопічна організація нейронів гіпокампа віддзеркалюється більш вираженими порушеннями реактивного характеру на тлі пригнічення внутрішньоклітинних регенеративних процесів. Зокрема, о 02.00 год це ультраструктурно проявляється такими ознаками: малою кількістю рибосом і полісом, вузьким просвітом каналців гранулярного ЕПР, нечіткими компонентами КГ, деструктивною зміною окремих органел.

Застосування епіталону (0,5 мкг/кг маси тіла тварини) при світловому стресі сприяло зростанню функціональної активності та регенерації досліджуваної структури. Поміж інших ознак, це проявлялося зростанням об'ємів ядер більшості клітин, рибосом і полісом в їх нейроплазмі, а також наявністю первинних і вторинних лізосом, що віддзеркалювало процеси утилізації пошкоджених дією тривалого освітлення ультраструктур.

При звичайному освітленні у надниркових залозах щурів відбуваються добові коливання цитологічних параметрів пучкової зони кіркової речовини, які разом вказують на більшу функціональну напруженість епітеліоцитів вказаної зони о 14.00 год порівняно з 02.00 год.

В умовах гіперфункції ШЗ в пучковій зоні спостерігається подібна тенденція – морфологічні зміни епітеліоцитів відповідають підвищенню їх функції о 14.00 год та зниженню о 02.00 год. При епіфізарній гіпофункції в пучковій зоні морфологічні зміни епітеліоцитів свідчать про зниження їх функції як о 14.00 год, так і о 02.00 год. У сітчастій зоні о 14.00 год у цитоплазмі епітеліоцитів морфологічні зміни вказують на підвищення функції, а о 02.00 год – зниження функціональної активності.

Світлова депривація призводить до реактивних змін ультраструктури клітин мозкового шару надниркових залоз щурів о 14.00 год. Водночас о 02.00 год вказані зміни особливо помітні, що віддзеркалюється ущільненням ядер, пронизаною інвагінаціями каріолею, розширенням каналців ЕПР і диктіосом КГ. Цілодобове освітлення о 02.00 год досліду викликає більші реактивні зміни на електронномікроскопічному рівні порівняно з групою тварин о 14.00 год. Це проявляється зростанням кількості грудочок гетерохроматину, втратою структурованості ядерця, різким розширенням перинуклеарного простору, зменшенням розмірів секреторних гранул.

Застосування епіталону (0,5 мкг/кг маси тіла тварини) в умовах цілодобового освітлення запобігає розвитку морфофункціональних змін ендокриноцитів кори надниркових залоз щурів при денному та частково гальмує ступінь вказаних змін хромафінних клітин надниркових залоз при нічному спостереженнях.

Циркадіанні зміни щільності мелатонінових рецепторів 1А типу в гіпоталамічних ядрах і гіпокампі щурів за світлової експозиції та депривації: імуногістохімічний аналіз

Супрахізматичні ядра гіпоталамуса. Чітке позитивне імуногістохімічне забарвлення визначалось у нейронах СХЯ у вигляді гранул різних розмірів та щільності, які концентрувалися переважно на периферії кожної клітини, що вочевидь відображає трансмембранне розташування мелатонінових рецепторів 1А. Імуногістохімічного забарвлення ядер не спостерігали – вони фарбувалися виключно гематоксилином і характеризувалися типовою для нейронів СХЯ морфологією. Звертало на себе увагу те, що серед нейронів виділялися клітини дрібних розмірів (діаметром 5-10 мкм) переважно круглястої форми та великі клітини (діаметром 13-24 мкм) полігональної або грушоподібної форми. Характерно, що на 08.00 порівняно з 02.00 год. у 4,5 раза (з $64 \pm 1,2$ до $14 \pm 0,8$ у полі зору площею 1600 мкм^2 – $p < 0,001$ за критерієм Ньюмена-Кейлса) зменшувалася кількість позитивно забарвлених дрібних нейронів.

Виявлено зменшення щільності у дрібних нейронах мелатонінових рецепторів до концентрації, яка нижча порогу чутливості застосованої імуногістохімічної методики. Окрім того, за мікроденситометричними даними на 8.00 порівняно з 02.00 год. у великих клітинах зменшувалася оптична щільність імуногістохімічного забарвлення (табл. 1), що також розцінюємо як зменшення щільності мелатонінових рецепторів.

О 14.00 год порівняно з 8.00 год відмічали сталу картину стосовно кількості позитивно забарвлених дрібних нейронів ($16 \pm 1,4$ та $14 \pm 0,8$ у полі зору площею 1600 мкм^2 – $p = 0,28$ за критерієм Ньюмена-Кейлса). Однак, у великих нейронах мало місце зростання щільності мелатонінових рецепторів, на що вказувало підвищення оптичної щільності забарвлення (табл. 1).

Циркадіанна динаміка оптичної щільності забарвлення на мелатонінові рецептори 1А у «великих» нейронах супрахіазматичних ядер гіпоталамуса ($\bar{x} \pm S_x$)

Години доби	Оптична щільність (в.од.опт.щільності) (n=10)	Величина вірогідності (p) розбіжностей між групами дослідження за критерієм Ньюмена-Кейлса
02.00	0,42 ± 0,012	<0,1*
08.00	0,34 ± 0,008	0,003*
14.00	0,38 ± 0,011	0,008*
20.00	0,41 ± 0,013	0,095*

Примітка. * – вірогідність різниці порівняно з попереднім часовим інтервалом.

О 20.00 год. відмічали «повернення» величин показників до тих, які спостерігали о 02.00 год. Зокрема, кількість дрібних нейронів у полі зору площею 1600 мкм² становила 61±1,4 в.од.опт. щільності (вірогідність розбіжності з групою 02.00 год – p=0,079), величина оптичної щільності забарвлення у великих нейронах характеризувала аналогічну закономірність (табл. 1).

В умовах світлової депривації кількість позитивно забарвлених на мелатонінові рецептори 1А дрібних нейронів СХЯ у полі зору площею 1600 мкм² становила: о 02.00 год – 49±1,8, о 08.00 год – 47±1,4, о 14.00 год – 48±1,3, о 20.00 год – 48±1,8 в.од.опт.щільності. Розбіжності за критерієм Ньюмена-Кейлса між вказаними групами дослідження невірогідні (p>0,05).

Згідно з наведеними даними щільність мелатонінових рецепторів 1А у великих нейронах СХЯ при тривалій темряві є стабільно високою й у середньому не змінюється впродовж доби (табл. 2).

Оптична щільність забарвлення на мелатонінові рецептори 1А у нейронах супрахіазматичних ядер щурів в умовах моделювання різної функціональної активності шишкоподібної залози ($\bar{x} \pm S_x$)

Години доби	Оптична щільність забарвлення (в.од.опт.щільності)		
	фізіологічна функція (n=6)	гіпофункція ШЗ (n=6)	гіперфункція ШЗ (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. * – вірогідність різниці (p<0,05) порівняно з попереднім часовим інтервалом у межах групи.

Протилежну картину спостерігали у щурів, які знаходилися в умовах гіпофункції ШЗ. Зокрема, кількість позитивно забарвлених на мелатонінові рецептори 1А дрібних нейронів СХЯ у полі зору площею 1600 мкм² становила:

о 02.00 год – $16 \pm 0,9$, о 08.00 год – $15 \pm 1,1$, о 14.00 год – $18 \pm 1,1$, о 20.00 год – $17 \pm 1,0$. Хоча розбіжності за критерієм Ньюмена-Кейлса між вказаними групами дослідження невірогідні ($p > 0,05$), однак, має місце суттєве зниження даного показника у всі досліджувані періоди ($p < 0,001$) порівняно з тваринами, яких утримували в умовах гіперфункції епіфіза мозку.

Дані таблиці 2 щодо результатів мікроденситометричних досліджень вказують на зниження ($p < 0,001$) імуногістохімічної щільності мелатонінових рецепторів 1A також у великих нейронах СХЯ у тварин, яким моделювали гіпофункцію ШЗ порівняно з епіфізарною гіперфункцією, хоча впродовж доби коливання показника в середньому не відрізнялися.

Таким чином, якщо щільність мелатонінових рецепторів 1A у нейронах СХЯ гіпоталамуса шурів в умовах фізіологічної функції ШЗ 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, в умовах пригнічення активності ШЗ максимальна кількість мелатонінових рецепторів у нейронах СХЯ гіпоталамуса зміщується з 02.00 год на 14.00 год і становить $0,35 \pm 0,012$ в.од.опт. щільності, а при активації залози – найбільший показник відзначається о 20.00 год, складаючи $0,43 \pm 0,015$ в.од.опт. щільності.

Препаратом, який використовували для корекції порушень, викликаних тривалим перебуванням шурів в умовах постійного освітлення, щільності мелатонінових рецепторів 1A у нейронах СХЯ гіпоталамуса був синтетичний епіфізарний тетрапептид – епіталон у дозі 0,5 мкг/кг маси тіла тварини.

Проведеними імуногістохімічними дослідженнями о 14.00 год при уведенні препарату вірогідних змін щільності досліджуваних структур щодо до такої у тварин, яким не проводили ін'єкції тетрапептиду на фоні світлового стресу не виявлено (табл. 2). Якщо при світловій експозиції число позитивно забарвлених на мелатонінові рецептори 1A дрібних нейронів СХЯ у полі зору площею 1600 мкм^2 становила у нічний період (02.00 год) $16 \pm 0,9$, а в денний (14.00 год) – $18 \pm 1,1$, то при застосуванні епіталону на фоні тривалого освітлення кількість досліджуваних нейронів складала о 02.00 год – $22 \pm 0,7$ та 14.00 год – $19 \pm 0,8$ відповідно. За критерієм Ньюмена-Кейлса між групами, зразки яких забирали для дослідження вночі, розбіжність вірогідна ($p < 0,05$).

Гіпокамп. Чітке позитивне імуногістохімічне забарвлення визначалось у нейронах гіпокампа у вигляді гранул різних розмірів та оптичної щільності, які концентрувалися переважно по периферії кожної клітини, що вочевидь відображає трансмембранне розташування мелатонінових рецепторів 1A. Імуногістохімічного забарвлення ядер не спостерігали – вони фарбувалися виключно гематоксиліном і характеризувалися типовою для нейронів гіпокампа морфологією.

Результати вимірювань оптичної щільності специфічного забарвлення на мелатонінові рецептори 1A подані у таблиці 3.

Як видно з даних таблиці, найвища щільність мелатонінових рецепторів 1А у нейронах гіпокампа щурів відмічається о 02.00 год, причому, хоча відмінність порівняно з 20.00 у середньому є невеликою (довірчий інтервал різниці середніх при $p=0,05$ знаходиться у межах всього 0,00015-0,05985 в. од. опт. щільності), але розбіжність достатньо вірогідна ($p=0,048$).

Для прикладу більшої розбіжності наводимо довірчий інтервал різниці середніх при $p=0,05$ між показниками щільності мелатонінових рецепторів 1А у нейронах гіпокампа щурів о 02.00 та 08.00 год, який становить 0,10727-0,15272 в. од. опт. щільності.

Таблиця 3

Циркадіанна динаміка оптичної щільності імуногістохімічного забарвлення на мелатонінові рецептори 1А у нейронах гіпокампа щура ($\bar{x} \pm S_x$)

Години доби	Оптична щільність (в.од.опт.щільності) (n=10)	Величина вірогідності (p) розбіжностей між групами дослідження за критерієм Ньюмена-Кейлса
02.00	0,37 ± 0,009	p=0,048*
08.00	0,24 ± 0,006	p=0,001*
14.00	0,27 ± 0,008	p=0,008*
20.00	0,34 ± 0,011	p=0,002*

Примітка. * – вірогідність різниці порівняно з показниками попереднього часового інтервалу

Середні дані мікроденситометричних досліджень імуногістохімічної щільності мелатонінових рецепторів 1А в нейронах гіпокампа при моделюванні гіперфункції ШЗ представлені у таблиці 4. Відмітимо, що щільність мелатонінових рецепторів 1А в нейронах СХЯ при тривалій темряві є стабільно високою в нічний період, а в ранковий та денний період вона вірогідно знижується.

На відміну від тварин, які перебували при постійній темряві, у щурів, які знаходилися в умовах гіпофункції ШЗ кількість позитивно забарвлених на мелатонінові рецептори 1А нейронів гіпокампа вірогідно менша. Найвищих значень вона сягала о 14.00 год, коли показник перебував у межах $0,29 \pm 0,008$ в. од. опт. щільності, вірогідно відрізняючись від такої о 08.00 год – $0,24 \pm 0,009$ в. од. опт. щільності. Порівняння отриманих показників оптичної щільності забарвлення на мелатонінові рецептори 1А у нейронах гіпокампа щурів у різні добові періоди з моделюванням різної епіфізарної активності, дало змогу встановити вірогідність різниць за критерієм Ньюмена-Кейлса, крім 14.00 год.

При корекції епіталоном (0,5 мкг/кг маси тіла тварини) змін, спричинених світловим стресом, щільності мелатонінових рецепторів 1А в нейронах гіпокампа щурів вірогідної різниці щодо щільності досліджуваних рецепторів у тварин, яким не застосовували тетрапептид на фоні світлового стресу імуногістохімічно о 14.00 год не виявлено (табл. 2).

Оптична щільність забарвлення на мелатонінові рецептори 1А у нейронах гіпокампа щурів в умовах моделювання різної функціональної активності шишкоподібної залози ($\bar{x} \pm S_x$)

Години доби	Оптична щільність забарвлення (в.од.опт.щільності)		
	фізіологічна функція (n=6)	гіпофункція ШЗ (n=6)	гіперфункція ШЗ (n=6)
02.00	0,37 ± 0,009*	0,25 ± 0,007*	0,37 ± 0,010
08.00	0,24 ± 0,006*	0,24 ± 0,009*	0,28 ± 0,006*
14.00	0,27 ± 0,008*	0,29 ± 0,008	0,29 ± 0,009
20.00	0,34 ± 0,011*	0,27 ± 0,007	0,36 ± 0,010

Примітка. * – вірогідність різниці ($p < 0,05$) порівняно з попереднім часовим інтервалом у межах групи.

Однак, о 02.00 год така різниця чітка, а сама кількість позитивно забарвлених на мелатонінові рецептори 1А нейронів гіпокампа становила $0,35 \pm 0,009$ в.од.опт. щільності.

Нами також з'ясовано вплив СХЯ гіпоталамуса на щільність мелатонінових рецепторів 1А в нейронах гіпокампа тварин. Проведені експерименти показали практично повну відсутність істотного впливу псевдооперації на щільність досліджуваних мелатонінових рецепторів 1а у центральному відділі лімбічної системи головного мозку, що дозволило нам об'єднати дані та сформуванати групи контрольних параметрів в обрані періоди доби.

При неушкоджених СХЯ у лабораторних щурів згідно з мікроденситометричними даними, які отримані на імуногістохімічних препаратах, відмічали добові коливання щільності мелатонінових рецепторів 1А у гіпокампі. Зокрема, на 02.00 год припадав максимум оптичної щільності забарвлення – $0,37 \pm 0,009$ в.од.опт.щільності, вірогідно нижчу оптичну щільність забарвлення виявлено о 20.00 год ($0,34 \pm 0,011$ в.од.опт. щільності), ще меншу – о 14.00 год ($0,27 \pm 0,008$ в. од. опт. щільності), а мінімальна величина вказаного показника ($0,24 \pm 0,006$ в. од. опт. щільності) зафіксована о 08.00 год ранку.

При електролітичному зруйнуванні СХЯ вказана циркадіанна закономірність коливання щільності мелатонінових рецепторів 1А у гіпокампі порушувалася. У результаті статистичної обробки отриманих даних обчислені наступні середні величини оптичної щільності специфічного забарвлення на мелатонінові рецептори 1А у нейронах гіпокампа: о 02.00 год – $0,25 \pm 0,013$ в.од.опт.щільності, о 8.00 год – $0,24 \pm 0,012$ в.од.опт. щільності, о 14.00 год – $0,24 \pm 0,011$ в.од.опт. щільності, о 20.00 год – $0,26 \pm 0,012$ в.од.опт. щільності. Згідно з критерієм Ньюмена-Кейлса та Стьюдента розбіжностей між середніми величинами не виявлено ($p > 0,05$), не відзначено навіть тенденції до розбіжності ($p > 0,1$).

Отже, щільність мелатонінових рецепторів 1А у нейронах СХЯ щурів підпорядкована чіткій циркадіанній організації. Найвища щільність спостерігається о 02.00 та 20.00 год, а о 08.00 та 14.00 год вона суттєво знижується. Дисфункція ШЗ призвела до вираженого порушення добових коливань досліджуваної щільності. При

гіпофункції епіфіза мозку щільність досліджуваних структур вірогідно менша, ніж при гіперфункції. Крім того, імуногістохімічне дослідження показало, що в умовах пригнічення активності ШЗ максимальна кількість мелатонінових рецепторів у нейронах СХЯ гіпоталамуса зміщується з 02.00 год на 14.00 год і становить $0,35 \pm 0,012$ в.од.опт. щільності, а при активації залози – найбільший показник відзначається о 20.00 год, складаючи $0,43 \pm 0,015$ в.од.опт. щільності. Водночас, при застосуванні епіталону на фоні тривалого освітлення кількість досліджуваних рецепторів о 02.00 год вірогідно вища щодо числа структур у тварин, яким на фоні світлового стресу препарат не вводили.

Упорядкована циркадіанна ритмічність властива і для виявлення мелатонінових рецепторів 1А у нейронах гіпокампа щурів за фізіологічних умов. Максимальна щільність рецепторів візуалізується о 20.00 та 02.00 год, з подальшим зниженням о 08.00 та 14.00 год.

Моделювання епіфізарної гіпофункції, на відміну від гіперфункції залози, віддзеркалюється вірогідним зниженням щільності рецепторів до мелатоніну в центральному відділі лімбічної системи головного мозку – гіпокампі. Ін'єкції епіталону (0,5 мкг/кг) зменшують о 02.00 год прояв порушень, викликаних світловим стресором.

При експериментальному зруйнуванні СХЯ у щурів відбувається десинхронізація циркадіанних ритмів щільності мелатонінових рецепторів 1А нейронів гіпокампа з припиненням добових коливань у середніх тенденціях, а також з підсиленням варіації індивідуальної реакції тварин на моделювання виключення функції СХЯ гіпоталамуса.

Морфометрична характеристика нейронів супрахіазматичних ядер, медіальних дрібноклітинних, латеральних великоклітинних суб'ядер паравентрикулярних ядер гіпоталамуса щурів за різної тривалості фотоперіоду та експериментальної терапії

СХЯ гіпоталамуса. Тривалість фотоперіоду істотно впливає на фоторецепторні пейсмейкери СХЯ. Вивчення морфометричних характеристик нейронів СХЯ гіпоталамуса виявило добову динаміку показників. Так, порівняно з денним періодом (14.00 год), до 02.00 год відмічали вірогідне збільшення (на $7,5 \pm 1,5\%$) площі перерізу тіла нейронів СХЯ, зумовлене зростанням площі перерізу ядра клітин, що підтверджено прямим кореляційним зв'язком ($r=0,27$). У свою чергу, збільшення площі перерізу ядра нейрона зумовлено вірогідним зростанням площі перерізу його ядерця, яка становила $5,53 \pm 0,234$ мкм², коефіцієнт кореляції між досліджуваними показниками дорівнював 0,54. При цьому в нічний період спостереження ядерно-цитоплазматичне співвідношення в пейсмейкерних нейронах становило $1,7 \pm 0,05\%$ і вірогідно більше (на $27,6 \pm 3,12\%$), ніж у денний проміжок. Водночас питомий об'єм ядра нейрона зростав на $18,2 \pm 2,16\%$, а цитоплазми, навпаки, знижувався на $14,2 \pm 1,98\%$. Ці зміни поєднувалися зі зростанням концентрації РНК у самих ядрах на $7,3 \pm 1,5\%$, а також із підвищенням концентрації РНК в ядерцях нейронів на $8,5 \pm 1,7\%$ і займаній ними площі перерізу на $26,5 \pm 5,2\%$ порівняно з денним періодом. При цьому змін площі перерізу цитоплазми і концентрації в ній РНК не реєстрували (рис. 2).

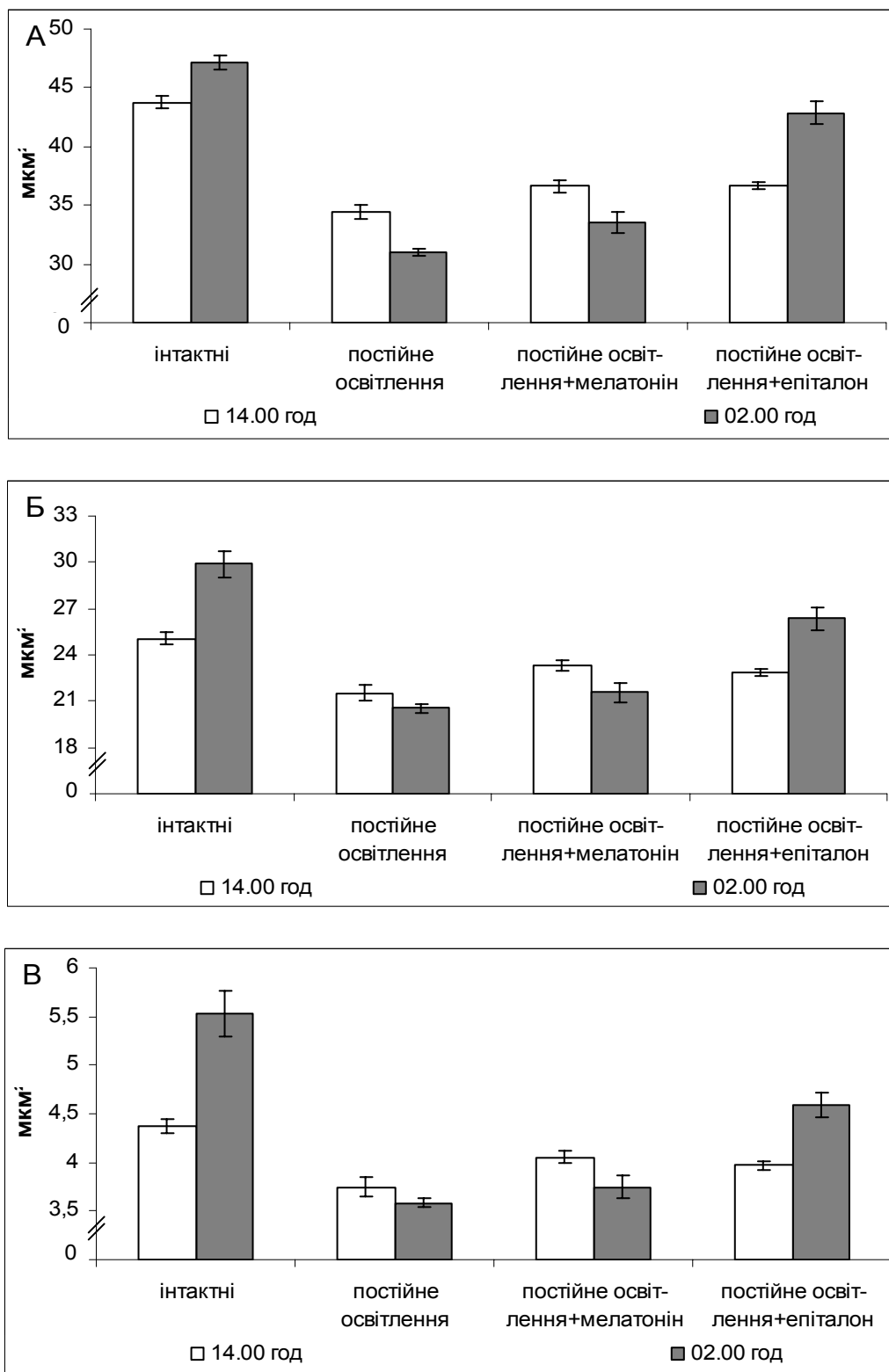


Рис. 2. Добова динаміка морфометричних змін площі перерізу тіла (А), ядра (Б) та цитоплазми (В) нейрона СХЯ гіпоталамуса при уведенні мелатоніну й епіталону на фоні постійного освітлення.

Постійний світловий режим десинхронізує морфофункціональну активність нейронів СХЯ, змінює у концентрацію РНК в їх ядрі, ядерці та цитоплазмі. Уведення мелатоніну тваринам, що перебували в умовах постійного освітлення нормалізувало показники площі перерізу нейронів СХЯ і концентрацію у них РНК.

Водночас, індол не корегував ритм активності нейронів СХЯ, який залишався таким, як і при тривалому фотоперіоді та інверсним щодо тварин, які перебували за звичайного світлового режиму (рис. 2). Рівень РНК у нейронах СХЯ о 02.00 год не зазнає вірогідних змін у групах порівняння, що, ймовірно, свідчить про залучення додаткових ендогенних механізмів, спрямованих на збереження функціональної активності нейронів у вказаний період, коли в нормі продукується найбільше мелатоніну.

Медіальні дрібноклітинні суб'ядра ПВЯ гіпоталамуса. Активність медіальних дрібноклітинних суб'ядер ПВЯ гіпоталамуса характеризуються добовою ритмічністю зі зниженням у нічний період доби. На це вказує вірогідне зменшення площі перерізу нейрона внаслідок зниження площі перерізу ядра ($r=0,66$) та цитоплазми ($r=0,64$), низька концентрація РНК у цитоплазмі на фоні збільшення ядерно-цитоплазматичного співвідношення до $1,44 \pm 0,019$ од. порівняно з денними величинами. Результати нічного етапу експерименту у тварин, які утримувалися в умовах епіфізарної гіперфункції вказують на порушення ритмічності активності нейронів мдПВЯ гіпоталамуса та зміщення максимальних величин площі перерізу складових нейрона з денних на нічні години. Проте низькі концентрації РНК в ядрі, ядерці та цитоплазмі нейротрансдуктора можна пояснити присутністю в цьому інтервалі доби підвищеної кількості в крові епіфізарного хронобіотика – мелатоніну, який в якості стрес-лімітувального чинника інгібує продукцію кортикотропін-рилізінг гормону медіальними дрібноклітинними суб'ядрами ПВЯ гіпоталамуса.

Хоча тривале освітлення є значним стресором і пусковим чинником розвитку десинхронозу, у даному випадку це мало стосується досліджуваних суб'ядер нейросекреторних клітин гіпоталамуса. Практично відсутність ознак підсилення функціональної активності структур ПВЯ та вірогідних різниць площі перерізу нейронів і його компонентів при постійному та стандартному режимі освітлення дозволяє дійти висновку про широкий діапазон пластичності мдПВЯ при 7-добовій експозиції яскравим світлом та визначальний вплив на їх діяльність світлового подразника (рис. 3).

Ін'єкції мелатоніну (0,5 мг/кг маси тіла тварини) на тлі епіфізарної гіпофункції істотно не вплинули на добовий ритм морфофункціональної активності нейроендокринних трансдукторів ПВЯ гіпоталамуса, який залишався схожим до такого в інтактної групи щурів та тварин із зниженою функціональною активністю (рис. 3).

Порівнюючи з мелатоніном, в умовах постійного освітлення епіталон (0,5 мкг/кг маси тіла) призводить до більшого пригнічення о 14.00 год та, навпаки, зростання о 02.00 год морфометричних показників дрібноклітинних нейронів суб'ядер ПВЯ гіпоталамуса (рис. 3).

Латеральні великоклітинні суб'ядра ПВЯ гіпоталамуса. В інтактних тварин простежується циркадіанна ритмічність морфофункціональної активності досліджуваних нейротрансдукторів лвПВЯ гіпоталамуса з максимальними показниками близько 14.00 год. Гіперфункції ШЗ викликає десинхроноз функціональної активності нейронів лвПВЯ гіпоталамуса та інверсію максимальних величин з денних на нічні години, що розцінюємо, як ефекти мелатоніну, який в якості стрес-лімітувального чинника пригнічує синтез вазопресину латеральними великоклітинними суб'ядрами ПВЯ гіпоталамуса самців щурів (рис. 4).

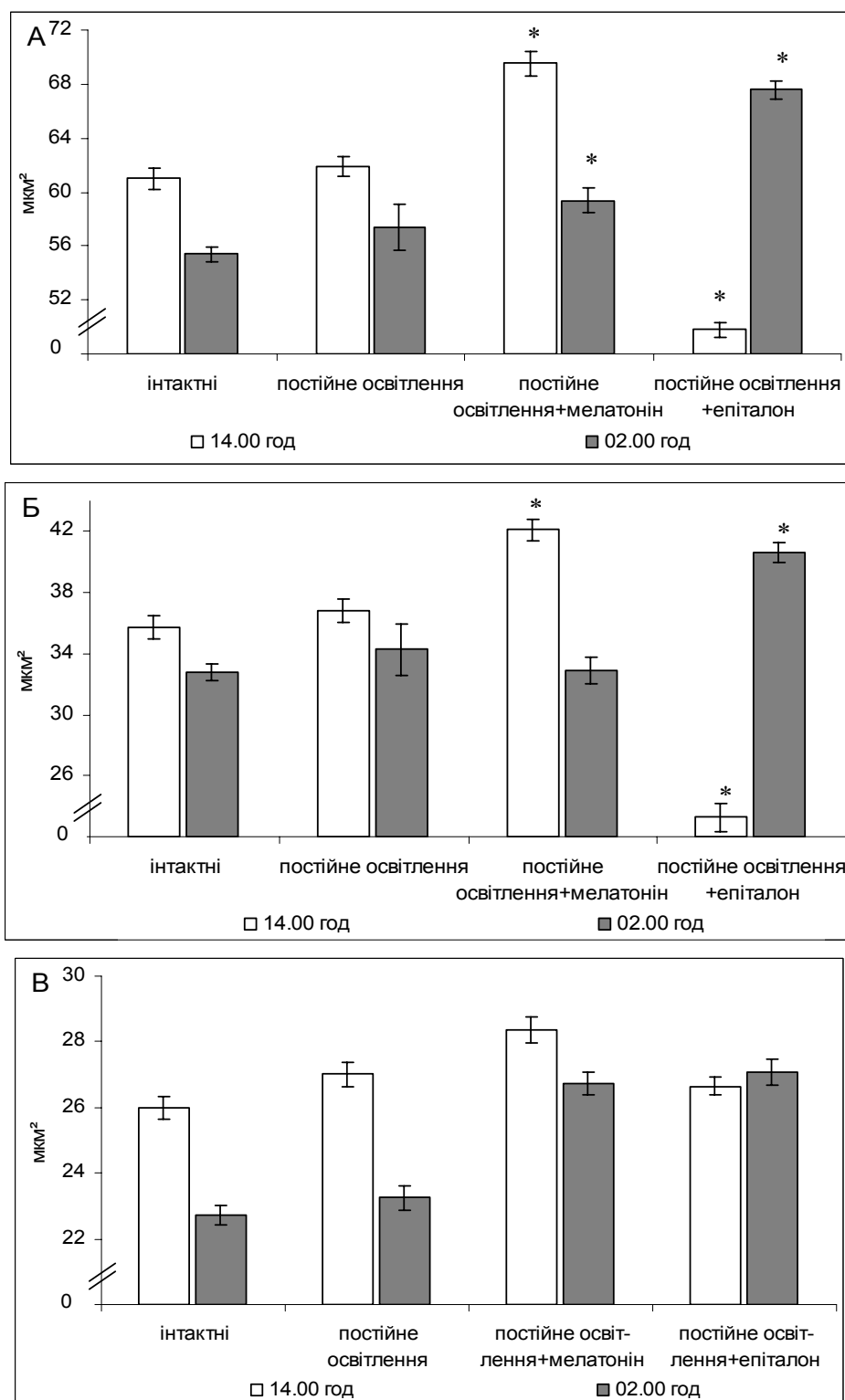


Рис. 3. Добова динаміка морфометричних змін площі перерізу тіла (А), ядра (Б) та цитоплазми (В) нейрона мДПВЯ при уведенні мелатоніну й епіталону на фоні постійного освітлення.

Вивчення добових коливань та функціональної активності нейронів лВПВЯ у щурів, які перебували за гіпофункції ШЗ показало згладжуваність різниці між денними та нічними показниками. І хоча при тривалому освітленні вдень вірогідних різниць щодо показників інтактних тварин не виявлено, уночі площа перерізу

компонентів досліджуваних суб'ядра нейросекреторних клітин гіпоталамуса вірогідно зростає. Це дозволяє дійти висновку, що за тривалого світлового стресу розвивається десинхроноз з проявами реактивних змін морфометричних параметрів латеральних великоклітинних суб'ядер ПВЯ гіпоталамуса.

Застосування мелатоніну (0,5 мг/кг маси тіла тварини) на фоні гіпофункції епіфіза мозку нормалізували порушення циркадіанного ритму морфофункціональної активності нейротрансдукторів ПВЯ гіпоталамуса, спричинене світловим стресом. Порівнянням морфометричних параметрів з показниками стресованих світлом щурів о 14.00 год встановлено вірогідне підвищення площі перерізу соми нейрона лВПВЯ на $12,2 \pm 1,04\%$ за рахунок зростання площі перерізу ядра ($r=0,99$) та ядерця на $19,4 \pm 1,10\%$ на тлі вірогідного зменшення питомого об'єму цитоплазми з одночасним зростанням питомого об'єму ядра структури. О 02.00 год реєстрували вірогідно нижчу площу перерізу ядерця на $8,7 \pm 1,42\%$ та вищу площу перерізу цитоплазми на $10,4 \pm 2,02\%$ порівняно з щурами, яких піддавали тривалій експозиції постійним світлом. Зменшувалася і концентрації РНК у складових нейрона в періоди експерименту.

На відміну від мелатоніну, в умовах постійного освітлення епіталон (0,5 мкг/кг маси тіла) не нормалізує добового ритму морфофункціональної активності нейронів лВПВЯ, який залишається подібним до такого у щурів, яким моделювали гіпопінеалізм і не вводили пептид. Крім того, тетрапептид призводить до істотного пригнічення морфометричного стану латеральних великоклітинних суб'ядер ПВЯ о 14.00 год. Уночі дія препарату на фоні постійного освітлення викликала збільшення площі перерізу нейрона внаслідок зростання площі перерізу цитоплазми на $7,7 \pm 0,65\%$ ($r=0,61$). У добовому аспекті концентрація РНК у стресованих світлом щурів, яким вводили епіталон, о 02.00 год зростала в ядрі – на $13,5 \pm 1,10\%$, в ядерці – на $13,3 \pm 1,25\%$ та цитоплазмі – на $19,0 \pm 1,28\%$.

Стан гена ранньої функціональної активності *c-fos* в ядрах гіпоталамуса щурів за різної тривалості фотоперіоду та застосуванні мелатоніну й епіталону

СХЯ гіпоталамуса. Експресія продукту активності гена „надранньої відповіді” *c-fos* – білка c-Fos – у нейронах СХЯ щурів, утримуваних в умовах нормальної фотоперіодики, зазнає чітких циркадіанних коливань (табл. 5).

За моделювання різної функціональної активності ШЗ – змін фотоперіоду (стандартного світлового режиму, постійного освітлення та темряви) нами досліджено їх впливи на стан гена ранньої функціональної активності *c-fos* у нейронах СХЯ гіпоталамуса щурів у різні проміжки доби шляхом визначення інтенсивності експресії відповідного протеїну (c-Fos) з використанням імунофлуоресцентної методики.

Як показало імунофлуоресцентне виявлення білка c-Fos (продукт експресії гена „надранньої відповіді” *c-fos*) у нейронах СХЯ, ділянки, де інтенсивність флуоресценції вірогідно перевищувала фон, містилися в межах перерізів ядер нейронів зазначеної структури. Середні значення площ таких імунопозитивних ділянок ядер (S_i) дещо варіювали, але і в інтактних тварин, і в щурів, які перебували в умовах світлової стимуляції та депривації, і в підгрупах, в яких зразки СХЯ для дослідження відбиралися вдень (о 14.00 год) та вночі (о 02.00 год), міжгрупові різниці не досягали рівня вірогідності.

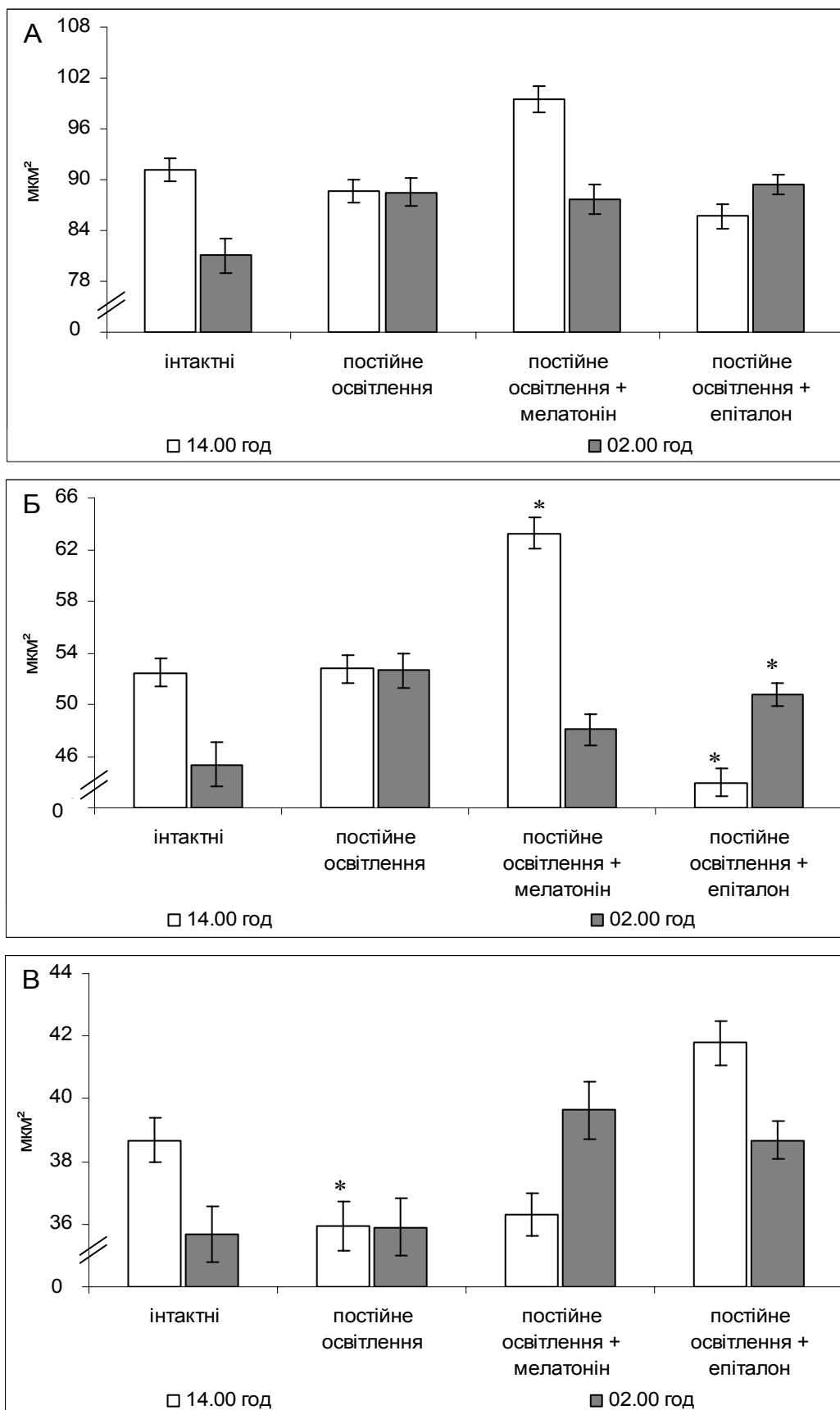


Рис. 4. Залежність від періоду доби морфометричних показників площі перерізу тіла (А), ядра (Б) та цитоплазми (В) нейрона лВПВЯ гіпоталамуса при уведенні мелатоніну й епіталону на фоні постійного освітлення.

Можна лише відмітити, що у фізіологічних умовах та в умовах постійної темряви дещо більші площі матеріалу, імунореактивного відносно c-Fos, виявлялись у нічний проміжок доби, а у тварин, що зазнали тривалої світлової стимуляції, більша площа матеріалу наявна вдень (табл. 5).

У той же час помітні відмінності спостерігалися між величинами площі перерізу ядер нейронів СХЯ ($S_{\text{я}}$). Так, усереднені для всієї групи в цілому (без урахування періоду доби) у тварин, котрих утримували у змінених умовах освітлення, показники вірогідно менші, ніж відповідні значення в контрольній групі (у групі стресованих світлом тварин на 23,3, а в групі щурів, які перебували при постійній темряві – на 13,2 %; $p < 0,05$ в обох випадках). Різною й добова динаміка варіацій площі перерізу ядер нейронів СХЯ. У контрольній групі ця площа вночі в середньому на 19,1 % більша, ніж вдень. Водночас у групі, яка зазнала світлової депривації зміни протилежні – середнє значення даної площі вночі на 13,2 % менше, ніж вдень. Крім того, проведений кореляційний аналіз встановив о 02.00 год тісний обернений зв'язок між площами ядра нейрона і матеріалу, імунореактивного відносно c-Fos ($r = -0,78$).

У групі, якій моделювали епіфізарну гіпофункцію (тварини, котрі знаходилися в умовах постійного освітлення) середні значення площі перерізу ядер СХЯ вночі і вдень майже однакові. При попарному порівнянні відповідних величин, виміряних у різних групах вдень, середня площа перерізу ядра в стресованих світлом особин вірогідно менша, ніж в інтактній, а в тварин з епіфізарною гіперфункцією – майже ідентична тій, що спостерігалася в умовах норми. Що ж стосується значень даного параметра в зразках, відібраних вночі, то і в групі, на яку діяли світловим подразником і в групі, яких утримували в постійній темряві ці величини вірогідно менші (на 31,3 і 25,7 % відповідно), ніж в інтактній групі.

Отже, середні значення площ перерізу ядер нейронів СХЯ в різних експериментальних групах і підгрупах помітно різнилися. Тому можна було б вважати, що коректнішим показником, який характеризує кількість імунореактивного до c-Fos матеріалу, є не абсолютні, а відносні значення площ імунопозитивних ділянок перерізу ядер, нормовані щодо повних площ цих органел. Згідно з розрахунками даних показників, у групі контролю такі нормовані площі склали дещо менше половини загальних площ перерізу ядер і дуже подібні (приблизно 47,5 % вдень і 44,5 % вночі; різниця невірогідна). В умовах постійного освітлення ці значення більші, ніж в інтактній групі. Вдень цей показник у середньому по підгрупі сягав 60,8 %, а вночі – 55,3 %, тобто тенденція перевищення відносної площі c-Fos-імунореактивного матеріалу вдень зберігалася. Обидва згадані показники в групі з епіфізарною гіпофункцією вірогідно вищі при попарному порівнянні з аналогічними величинами в інтактній групі ($p < 0,05$). Інша картина спостерігалась у тварин, котрі перебували в умовах постійної темряви. Вдень нормована площа імунореактивного матеріалу (48,8 %) у тварин цієї групи дуже близька до відповідного значення в групі щурів, яких утримували при стандартному фотоперіоді, але у тварин, в яких зразки відбирали вночі, даний показник сягав у середньому 65,6 %. Останнє значення високовірогідно перевищувало відповідний показник у згаданій групі вдень та аналогічні значення для нічного періоду в інтактній і групі щурів, яким моделювали знижену функцію ШЗ ($p < 0,05$) (табл. 5).

Таблиця 5

cFos -імунопозитивні нейрони в супрахіазматичному ядрі гіпоталамуса щурів ($\bar{x} \pm S_x$)

Серії експериментальних тварин	Площа матеріалу, імунореактивного до c-Fos, мкм ²	Концентрація білка c-Fos в нейроні, O _{IФ}	Вміст білка c-Fos у нейроні, O _{IФ}	Щільність c-Fos -імунопозитивних нейронів (мм ²)	Сумарний вміст білка c-Fos у структурі, O _{IФ} / мм ²
Інтактні, 14.00 год	11,91 ± 0,688	0,250 ± 0,0095	3,02 ± 0,231	476 ± 84	1438 ± 253
Інтактні, 02.00 год	13,30 ± 0,612 p>0,05	0,174 ± 0,0026 p<0,001	2,40 ± 0,124 p<0,05	574 ± 62 p>0,05	1376 ± 148 p>0,05
Уведення мелатоніну, 14.00 год	17,25 ± 1,648 p ₂ <0,05	0,304 ± 0,0133 p ₂ <0,001	4,78 ± 0,461 p ₂ <0,01	593 ± 98 p ₂ <0,05	2832 ± 468 p ₂ <0,05
Уведення мелатоніну, 02.00 год	17,22 ± 1,175 p ₂ >0,05 p ₁ >0,05	0,197 ± 0,0033 p ₂ >0,05 p ₁ <0,001	3,57 ± 0,268 p ₂ >0,05 p ₁ <0,05	630 ± 33 p ₂ >0,05 p ₁ >0,05	2250 ± 118 p ₂ >0,05 p ₁ >0,05
Постійне освітлення, 14.00 год	13,10 ± 0,760 p>0,05	0,218 ± 0,0032 p<0,05	2,85 ± 0,167 p>0,05	470 ± 54 p>0,05	1339 ± 154 p>0,05
Постійне освітлення, 02.00 год	11,35 ± 0,738 p>0,05 p ₁ >0,05	0,207 ± 0,0057 p<0,001 p ₁ >0,05	2,47 ± 0,207 p>0,05 p ₁ >0,05	455 ± 76 p>0,05 p ₁ >0,05	1125 ± 188 p>0,05 p ₁ >0,05
Постійне освітлення + мелатонін, 14.00 год	12,25 ± 0,554 p ₃ <0,05 p ₄ >0,05	0,466 ± 0,0041 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001	5,75 ± 0,261 p ₃ >0,05 p ₄ <0,001	559 ± 43 p ₃ >0,05 p ₄ >0,05	3215 ± 247 p ₃ >0,05 p ₄ <0,001
Постійне освітлення + мелатонін, 02.00 год	12,10 ± 0,490 p ₃ <0,05 p ₄ >0,05 p ₁ >0,05	0,281 ± 0,0146 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001 p ₁ <0,001	3,40 ± 0,221 p ₃ >0,05 p ₄ <0,05 p ₁ <0,001	350 ± 33 p ₃ <0,001 p ₄ >0,05 p ₁ <0,01	1190 ± 112 p ₃ <0,01 p ₄ >0,05 p ₁ <0,001
Постійне освітлення + епіталон, 14.00 год	16,81 ± 0,737 p ₄ <0,01	0,212 ± 0,0022 p ₄ >0,05	3,76 ± 0,183 p ₄ <0,01	428 ± 27 p ₄ >0,05	16112 ± 102 p ₄ <0,001
Постійне освітлення + епіталон, 02.00 год	14,51 ± 0,882 p ₄ <0,05 p ₁ >0,05	0,174 ± 0,0020 p ₄ <0,001 p ₁ <0,001	2,67 ± 0,181 p ₄ >0,05 p ₁ <0,01	490 ± 54 p ₄ >0,05 p ₁ >0,05	1307 ± 144 p ₄ >0,05 p ₁ <0,001

Зміни характеристик світлового режиму істотно впливали на показники інтенсивності флуоресценції, які віддзеркалюють концентрацію білка c-Fos в ядрах нейронів СХЯ. Індекс концентрації c-Fos (K_i) в умовах постійного освітлення вдень менший у середньому на 12,8 %, а вночі, навпаки, більший на 19,0 % порівняно з аналогічними величинами в групі контролю. Проте найбільші зрушення в концентрації білка c-Fos спостерігали у зразках, взятих вдень у тварин, утримуваних в умовах постійної темряви. Відповідний індекс концентрації сягав у цій підгрупі в середньому $0,603 \pm 0,11$ ум.од., тобто у два рази більший (241 %), ніж аналогічне значення в групі контролю ($p < 0,001$). Деяке перевищення індексу концентрації білка c-Fos в ядрах нейронів СХЯ порівняно з інтактними значеннями відмічали у групі з моделюванням епіфізарної гіперфункції і вночі: воно невелике (на 6,9 %), але вірогідне ($p < 0,05$). В інтактних тварин і тих, котрих утримували в умовах постійної темряви, індекс концентрації білка c-Fos, виміряний вдень, вірогідно вищий ($p < 0,05$), ніж аналогічне значення вночі – в інтактній групі остання величина становила в середньому 69,6 % денного значення. При постійній темряві середній індекс концентрації c-Fos, визначений вдень, перевищував нічне значення в цій самій групі більш, ніж втричі. У той же час у тварин, які знаходилися в умовах постійного освітлення, денні та нічні значення індексу концентрації c-Fos майже не відрізнялись одне від одного (табл. 5).

Виявлені зрушення значною мірою зумовлювали групову специфіку та добову динаміку такого інтегрального показника, як індекс вмісту білка c-Fos в ядрах нейронів СХЯ (C_i).

В інтактній групі цей індекс вночі вірогідно менший (на 20,6 %, $p < 0,05$), ніж вдень. У щурів, котрі знаходилися в умовах постійного освітлення, значення індексу вмісту c-Fos досить близькі до таких в інтактній групі. Подібною виявилась і добова динаміка даного показника, проте різниця між денним і нічним рівнями в групі стресованих світлом тварин не вірогідна.

Зрозуміло, що підвищення концентрації білка c-Fos в ядрах нейронів СХЯ вдень у щурів, утримуваних в умовах постійної темряви, зумовлювало високі значення й індексу сумарного вмісту цього білка (246 % порівняно з відповідним значенням в інтактній групі). Вночі цей індекс у тварин згаданої групи істотно зменшувався, і його значення ставали досить близькими до аналогічних величин у двох інших групах (інтактних тварин та щурів, яким створювали світловий стрес).

Спираючись на результати описаних вище вимірювань і розрахунків ми намагалися охарактеризувати інтегральну щільність імунореактивного матеріалу щодо c-Fos у тканині СХЯ в цілому. Для цього розраховували щільність локалізації c-Fos-імунопозитивних нейронів у досліджених перерізах зазначеного ядра. Даний параметр у різних групах і підгрупах варіював у межах 453-574 нейрони на 1 мм^2 площі перерізу. Щільність розташування c-Fos-позитивних нейронів не виявила певних чітких міжгрупових відмінностей та залежності від того, коли відбирався експериментальний матеріал – вдень або вночі. Слід все таки відмітити, що в інтактних щурів дещо більші значення щільності локалізації c-Fos-позитивних нейронів у СХЯ спостерігалися вночі, а в групі тварин, які зазнали світлової

депривації добова динаміка даного показника зворотна – щільність більша вдень. При утримуванні особин за гіперліюмінізованих умов середні значення щільності нейронів з c-Fos-позитивними ядрами, виміряні вдень і вночі, практично однакові. Невірогідність міжгрупових різниць середніх значень щільності розташування c-Fos-позитивних нейронів могла бути значною мірою зумовлена досить великою дисперсією цього параметра при його визначенні у випадково вибраних зонах зрізів СХЯ (табл. 5).

Оскільки міжгрупові та «добові» відмінності таких параметрів, як площа імунореактивного щодо c-Fos матеріалу в ядрах нейронів СХЯ та щільність локалізації клітин, імунопозитивних щодо вказаного протеїну, відносно помірні, ймовірно, що визначальний вплив на індекс інтегральної щільності c-Fos у тканині СХЯ справляли зміни концентрації даного білка та похідного параметра – індексу вмісту c-Fos в ядрах нейронів. Значення індексу інтегральної щільності c-Fos у тварин інтактної та стресованої світлом груп досить близькі і не виявляли вірогідних розбіжностей. Варто відзначити тенденцію до зменшення значень цього параметра в групі тварин, котрі знаходилися при постійному освітленні. При цьому індекс сумарної щільності білка c-Fos у щурів, яких утримували в умовах світлової депривації, вдень майже втричі вищий (297 %), ніж аналогічне значення в інтактній групі. Вночі згаданий індекс у групі тварин з епіфізарною гіперфункцією повертався до значень, близьких до тих, котрі спостерігались у двох інших групах (табл. 5).

При проведенні експериментальної терапії мелатоніном у стресованих світлом тварин, в яких зразки відбирали вночі, концентрація білка c-Fos у структурах вірогідно вища стосовно щурів, яким вводили гормон за стандартного фотоперіоду та інтактних особин, однак у добовому аспекті слід відмітити істотне зниження параметра о 02.00 год. Застосування епіталону на фоні постійного освітлення не викликало таких виражених змін, які проявлялися після їх корекції мелатоніном. Зокрема, вдень концентрація протеїну перебувала на рівні $0,212 \pm 0,0022 O_{if}$, а вночі – $0,174 \pm 0,0020 O_{if}$. У цій серії дослідження нами не виявлено і вірогідних відмінностей відносно інтактної групи щурів.

Медіальні дрібноклітинні суб'ядра ПВЯ гіпоталамуса. Як і в СХЯ, так і в медіальних дрібноклітинних суб'ядрах ПВЯ гіпоталамуса щурів динаміка експресії продукту активності гена „надранньої відповіді” *c-fos* – білка c-Fos – має чітку циркадіанну ритмічність. Отримані результати дозволяють припустити, що визначальними чинниками, які вплинули на індекс інтегральної щільності c-Fos у тканині мдПВЯ гіпоталамуса щурів були зміни концентрації даного білка та індексу вмісту c-Fos в суб'ядрах нейронів. Показники індексу інтегральної щільності c-Fos за фізіологічної, гіпер- та гіпофункції епіфіза мозку о 02.00 год вірогідно нижчі, ніж о 14.00 год, а саме в інтактних тварин – на 26,3 %, при світловій стимуляції – на 47,0 %, в мовах постійної темряви на 62,8 % відповідно (табл. 6).

Тижневі внутрішньоочеревинні ін'єкції щурам мелатоніну (0,5 мг/кг маси тіла тварини) за стандартного фотоперіоду сприяли нічному зростанню площі матеріалу, імунореактивного до c-Fos на 14,8 % стосовно інтактних тварин, істотно не змінюючи при цьому денних значень.

сFos-імунопозитивні нейрони у мдПВЯ гіпоталамуса щурів ($\bar{x} \pm S_x$)

Серії експериментальних тварин	Площа матеріалу, імунореактивного до с-Fos, мкм ²	Концентрація білка с-Fos у нейроні, O _{1Ф}	Вміст білка с-Fos у нейроні, O _{1Ф}	Щільність с-Fos - імунопозитивних нейронів (мм ²)	Сумарний уміст білка с-Fos у структурі, O _{1Ф} / мм ²
Інтактні, 14.00 год	26,46 ± 1,506	0,370 ± 0,0064	9,63 ± 0,533	227 ± 15	2185 ± 144
Інтактні, 02.00 год	27,67 ± 1,420 p>0,05	0,238 ± 0,0035 p<0,001	6,84 ± 0,402 p<0,01	236 ± 14 p>0,05	1614 ± 95 p<0,01
Уведення мелатоніну, 14.00 год	28,54 ± 1,919 p ₂ >0,05	0,331 ± 0,0109 p ₂ >0,05	8,85 ± 0,530 p ₂ >0,05	300 ± 37 p ₂ >0,05	2656 ± 328 p ₂ >0,05
Уведення мелатоніну, 02.00 год	32,28 ± 1,434 p ₂ <0,05 p ₁ >0,05	0,221 ± 0,0034 p ₂ <0,05 p ₁ <0,001	7,45 ± 0,395 p ₂ >0,05 p ₁ >0,05	307 ± 19 p ₂ >0,05 p ₁ >0,05	2286 ± 142 p ₂ >0,05 p ₁ >0,05
Постійне освітлення, 14.00 год	30,96 ± 1,372 p<0,05	0,269 ± 0,0085 p<0,001	8,43 ± 0,537 p>0,05	283 ± 20 p<0,05	2385 ± 169 p>0,05
Постійне освітлення, 02.00 год	25,22 ± 1,413 p>0,05 p ₁ <0,05	0,188 ± 0,0025 p<0,001 p ₁ <0,001	4,86 ± 0,308 p<0,01 p ₁ <0,001	260 ± 13 p>0,05 p ₁ >0,05	1263 ± 63 p<0,05 p ₁ <0,001
Постійне освітлення + мелатонін, 14.00 год	22,43 ± 0,971 p ₃ <0,05 p ₄ <0,001	0,519 ± 0,0089 p ₃ <0,001 p ₄ <0,001	11,67 ± 0,556 p ₃ =0,004 p ₄ =0,002	256 ± 22 p ₃ >0,05 p ₄ >0,05	2988 ± 257 p ₃ >0,05 p ₄ >0,05
Постійне освітлення + мелатонін, 02.00 год	26,78 ± 1,773 p ₃ =0,032 p ₄ >0,05 p ₁ <0,05	0,235 ± 0,0030 p ₃ =0,011 p ₄ <0,001 p ₁ <0,001	6,40 ± 0,450 p ₃ >0,05 p ₄ <0,05 p ₁ <0,001	257 ± 21 p ₃ >0,05 p ₄ >0,05 p ₁ >0,05	1644 ± 134 p ₃ <0,01 p ₄ >0,05 p ₁ <0,001
Постійне освітлення + епіталон, 14.00 год	32,42 ± 1,095 p ₄ >0,05	0,242 ± 0,0021 p ₄ <0,05	8,17 ± 0,312 p ₄ >0,05	327 ± 18 p ₄ >0,05	2672 ± 147 p ₄ >0,05
Постійне освітлення + епіталон, 02.00 год	25,51 ± 0,921 p ₄ >0,05 p ₁ <0,001	0,208 ± 0,0029 p ₄ <0,001 p ₁ <0,001	5,46 ± 0,239 p ₄ >0,05 p ₁ <0,001	232 ± 12 p ₄ >0,05 p ₁ <0,01	1267 ± 66 p ₄ >0,05 p ₁ <0,001

Таблиця 7

cFos-імунопозитивні нейрони у лВПВЯ гіпоталамуса щурів ($\bar{x} \pm S_x$)

Серії експериментальних тварин	Площа матеріалу, імунореактивного до c-Fos, мкм ²	Концентрація білка c-Fos в нейроні, O _{IF}	Вміст білка c-Fos у нейроні, O _{IF}	Щільність c-Fos-імунопозитивних нейронів (мм ²)	Сумарний вміст білка c-Fos у структурі, O _{IF} / мм ²
Інтактні, 14.00 год	130,88 ± 9,933	0,330 ± 0,0229	44,40 ± 5,132	190 ± 39	8436 ± 1731
Інтактні, 02.00 год	105,53 ± 4,969 p<0,05	0,236 ± 0,0105 p<0,01	24,65 ± 1,599 p<0,01	204 ± 27 p>0,05	5029 ± 665 p>0,05
Уведення мелатоніну, 14.00 год	116,08 ± 15,223 p ₂ >0,05	0,357 ± 0,0389 p ₂ <0,05	42,90 ± 7,667 p ₂ >0,05	180 ± 34 p ₂ >0,05	7722 ± 1459 p ₂ >0,05
Уведення мелатоніну, 02.00 год	123,99 ± 7,257 p ₂ >0,05 p ₁ >0,05	0,291 ± 0,0127 p ₂ >0,05 p ₁ >0,05	35,72 ± 2,440 p ₂ >0,05 p ₁ >0,05	124 ± 23 p ₂ >0,05 p ₁ >0,05	4429 ± 822 p ₂ >0,05 p ₁ >0,05
Постійне освітлення, 14.00 год	129,27 ± 10,461 p>0,05	0,233 ± 0,0198 p<0,01	29,73 ± 3,474 p<0,05	127 ± 23 p>0,05	3775 ± 684 p<0,05
Постійне освітлення, 02.00 год	124,25 ± 7,683 p>0,05 p ₁ >0,05	0,197 ± 0,0128 p<0,05 p ₁ >0,05	23,43 ± 1,359 p>0,05 p ₁ >0,05	120 ± 25 p<0,05 p ₁ >0,05	2811 ± 586 p<0,05 p ₁ >0,05
Постійне освітлення + мелатонін, 14.00 год	124,48 ± 11,992 p ₃ >0,05 p ₄ >0,05	0,467 ± 0,0212 p ₃ <0,05 p ₄ <0,001	57,11 ± 5,548 p ₃ >0,05 p ₄ <0,01	120 ± 22 p ₃ >0,05 p ₄ >0,05	6854 ± 1257 p ₃ >0,05 p ₄ <0,05
Постійне освітлення + мелатонін, 02.00 год	111,57 ± 15,883 p ₃ >0,05 p ₄ >0,05 p ₁ >0,05	0,279 ± 0,0110 p ₃ >0,05 p ₄ <0,001 p ₁ <0,001	30,96 ± 4,317 p ₃ >0,05 p ₄ >0,05 p ₁ <0,01	132 ± 12 p ₃ >0,05 p ₄ >0,05 p ₁ >0,05	4087 ± 372 p ₃ >0,05 p ₄ >0,05 p ₁ >0,05
Постійне освітлення + епіталон, 14.00 год	137,74 ± 7,251 p ₄ >0,05	0,255 ± 0,0061 p ₄ >0,05	36,31 ± 2,229 p ₄ >0,05	92 ± 6 p ₄ >0,05	3341 ± 218 p ₄ >0,05
Постійне освітлення + епіталон, 02.00 год	106,33 ± 8,103 p ₄ >0,05 p ₁ <0,05	0,258 ± 0,0152 p ₄ <0,05 p ₁ >0,05	23,69 ± 1,652 p ₄ >0,05 p ₁ <0,001	180 ± 37 p ₄ >0,05 p ₁ <0,05	4265 ± 877 p ₄ >0,05 p ₁ >0,05

На фоні постійного освітлення мелатонін сприяв наближенню до норми концентрації білка c-Fos у суб'ядрах мдПВЯ гіпоталамуса в нічний проміжок. Удень спостерігали різкий підйом показника до $0,519 \pm 0,0089 O_{i\phi}$. Такої різниці у добовому аспекті не реєстрували при застосуванні епіталону (0,5 мкг/кг маси тіла тварини), коли концентрація білка о 14.00 год вірогідно нижча (на 10,0 %), а о 02.00 год вища (на 10,6 %) щодо такої в тварин, яких піддали дії світлового стресора і корекцію не проводили.

Латеральні великоклітинні суб'ядра ПВЯ гіпоталамуса. Враховуючи отримані результати добової експресії гена ранньої функціональної активності *c-fos* у латеральних великоклітинних суб'ядрах ПВЯ гіпоталамуса, відмітимо її вірогідне зростання у денні години (табл. 7). В особин, які перебували в умовах світлового стресу, денний показник індексу вмісту c-Fos на 33,0 % нижчий, а в нічний – наближався до контрольних величин за збереженої добової динаміки.

Виражене підвищення концентрації білка c-Fos в суб'ядрах нейронів лвПВЯ о 14.00 год у щурів в умовах постійної темряви відповідно спричинило високі значення й індексу сумарного вмісту цього білка. О 02.00 год вказаний індекс в особин суттєво зменшувався, наближаючись до аналогічних значень інтактних щурів і тварин, яким моделювали гіпофункцію епіфіза мозку.

Ін'єкції мелатоніну (0,5 мг/кг маси) стресованим світлом тваринам віддзеркалилися на добовій динаміці індексу вмісту білка c-Fos у суб'ядрах лвПВЯ, здебільшого в умовах гіпофункції ШЗ. У цьому випадку о 14.00 год показник майже вдвічі перевищував дані експерименту на стресованих тваринах без уведення гормону, наближаючи його до норми. Крім того, він вірогідно вищий і порівняно з таким у зрізах, узятих о 02.00 год. При застосуванні тетрапептиду епіталону (0,5 мкг/кг маси) спостерігали зростання досліджуваного індексу вдень відносно особин з епіфізарною гіпофункцією без проведення експериментальної терапії епіталоном. Уночі такого впливу на індекс вмісту білка у суб'ядрах лвПВЯ не зафіксовано.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на основі експериментального дослідження розкрито нові, невідомі раніше, закономірності хроноритмічної організації компонентів фотоперіодичної системи залежно від функціональної активності шишкоподібної залози, що є необхідним для пізнання центральних механізмів циркадіанних ритмів головного мозку ссавців. Обґрунтовано концепцію фотозалежної хроноорганізації циркадіанних ритмів, згідно з якою порушення тривалості фотоперіоду викликає дисбаланс синтезу мелатоніну, що є ключовою ланкою дезорганізації механізмів добової періодичності в щурів.

1. Встановлено, що загальні добові закономірності ритмічних перебудов морфологічної та ультрамікроскопічної структури вентролатерального відділу супрахізматичних ядер переднього гіпоталамуса, шишкоподібної залози, гіпокампа, наднирникових залоз полягають у адаптивних змінах до тривалості циклу

світло-темрява. Головні процеси хрононейроендокринної інтеграції у формуванні циркадіанних ритмів у щурів спрямовані на збереження співвідношення регуляторних гормонпродукувальних клітин та морфофізіологічних ознак з боку ефекторних клітинних ланок.

2. Експериментальне моделювання гіпопінеалізму (тривале освітлення) та гіперпінеалізму (постійна темрява) призвело до порушення досліджуваних компонентів циркадіанного блоку на світлооптичному та електронномікроскопічному рівнях. Це віддзеркалилося істотним кількісним перерозподілом типів нейросекреторних клітин у структурах головного мозку (зменшення вмісту активних і зникнення нейроцитів у фазі накопичення, поява інтенсивно світлих і функціонально виснажених, збільшення числа пікноморфних клітин), що свідчить про порушення фазного характеру нейросекреції. Десинхроноз архітекτονіки досліджуваних утворень більш виражений в умовах гіпофункції шишкоподібної залози, ніж при її гіперфункції, що вказує на інтегральний вплив нейроендокринного трансдуктора в пейсмеркерній системі організму щурів.
3. Дано оцінку щільності рецепторів мелатоніну 1А у пейсмеркерних нейронах супрахіазматичних ядер гіпоталамуса, яка тісно корелює з концентрацією мелатоніну в плазмі крові щурів, досягаючи максимуму о 02.00 год. За умов пригнічення активності шишкоподібної залози максимальна кількість мелатонінових рецепторів у нейронах супрахіазматичних ядер гіпоталамуса зміщується з 02.00 год на 14.00 год і становить $0,35 \pm 0,012$ відносних одиниць оптичної щільності (в.од.опт. щільності), а при активації мелатонінутворювальної функції залози – найбільший показник відзначається о 20.00 год, складаючи $0,43 \pm 0,015$ в.о.опт. щільності.
4. Доведено, що гіперфункція шишкоподібної залози супроводжується стабільно високою імуногістохімічною щільністю мелатонінових рецепторів ($0,37 \pm 0,010$ в.о.опт. щільності) у нейронах гіпокампа в нічний період, а в денний період вона вірогідно знижується ($0,29 \pm 0,009$ в.о.опт. щільності). При епіфізарній гіпофункції кількість позитивно забарвлених на мелатонінові рецептори нейронів гіпокампа вірогідно менша щодо контролю в усі періоди спостереження. Найвищих значень вона сягала о 14.00 год, коли показник перебував у межах $0,29 \pm 0,008$ в.о.опт. щільності, вірогідно відрізняючись від такої о 02.00 год – $0,25 \pm 0,007$ в.о.опт. щільності. При зруйнуванні супрахіазматичних ядер відбувається десинхронізація циркадіанних ритмів щільності мелатонінових рецепторів нейронів гіпокампа з припиненням добових коливань у середніх тенденціях, а також з підсиленням варіації індивідуальної реакції тварин на зруйнування основного координатора добових ритмів.
5. Встановлено виражене порушення добового ритму морфометричних показників пейсмеркерних нейронів супрахіазматичних ядер гіпоталамуса при гіпофункції шишкоподібної залози о 02.00 год. Так, площа перерізу нейрона становила $31,04 \pm 0,319$ мкм² і була меншою за аналогічну в інтактних тварин і щурів з гіпер-

функцією шишкоподібної залози. Вказані зміни супроводжувалися зменшенням площі перерізу ядра до $20,54 \pm 0,255 \text{ мкм}^2$ ($r=0,78$) та цитоплазми – до $10,51 \pm 0,189 \text{ мкм}^2$ ($r=0,84$). Ядерно-цитоплазматичне співвідношення сягало $1,95 \pm 0,024$ і перевищувало таке в інтактних тварин на $14,04 \pm 1,017\%$ внаслідок зростання питомого об'єму ядра, який складав $66,17 \pm 0,821\%$ та зменшення питомого об'єму цитоплазми нейрона.

6. Доведено, що в основі змін морфометричних показників пейсмеркерних нейронів супрахіазматичних ядер гіпоталамуса при гіпофункції шишкоподібної залози лежить виснаження їх функціональної активності, що підтверджується значним гальмуванням біосинтетичних процесів. Зокрема, о 14.00 год концентрація РНК в ядрі перебувала в межах $0,276 \pm 0,0045$ од.опт.щільності, в ядерці – $0,382 \pm 0,0062$ од.опт.щільності, в цитоплазмі – $0,147 \pm 0,0024$ од.опт.щільності і вірогідно нижча щодо аналогічних показників інтактних тварин.
7. Аналіз площ перерізів компонентів нейронів, концентрації в них РНК, ядерно-цитоплазматичного співвідношення, питомих об'ємів ядер і цитоплазми медіальних дрібноклітинних та латеральних великоклітинних суб'ядер паравентрикулярних ядер гіпоталамуса в циркадіанному аспекті показав інверсію (зростання величин у нічні години замість звичайного їх зниження в цей добовий період) циркадіанної ритміки при гіперпінеалізмі та широкий діапазон пластичності структур при гіпопінеалізмі.
8. Виявлено, що експресія продукту активності гена „надранньої відповіді” *c-fos* – білка c-Fos – у пейсмеркерних нейронах супрахіазматичних і кортикотропін-релізінг-гормонпродукувальних та вазопресин-сиинтезувальних суб'ядер паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів, утримуваних в умовах нормальної фотоперіодики (12 год світло / 12 год темрява), зазнає чітких циркадіанних коливань з максимальним значенням індексу концентрації білка c-Fos $0,250 \pm 0,0095$ од. імунофлуоресценції о 14.00 год. Експериментально обґрунтовано, що індикатором раннього десинхронозу механізмів циркадіанних ритмів у щурів є порушення експресії гена *c-fos* і детермінованого ним імуноспецифічного білка c-Fos у нейронах досліджуваних ядер переднього гіпоталамуса при зміні фотоперіоду.
9. Встановлено тісні кореляційні зв'язки між морфофункціональними перебудовами досліджуваних параметрів супрахіазматичних ядер переднього гіпоталамуса та нонапептидергічних нейросекреторних популяцій суб'ядер паравентрикулярних ядер переднього гіпоталамуса на фоні зміненої тривалості циклу світло-темрява в різні періоди доби.
10. Показано доцільність застосування синтетичного біорегулятора – епіталону (у дозі $0,5 \text{ мкг/кг}$), який підвищує резистентність ультраструктур компонентів циркадіанної системи до світлового стресора та істотно покращує показники площі перерізів компонентів нейронів СХЯ, а мелатонін (у дозі $0,5 \text{ мг/кг}$) – концентрацію в них РНК. Мелатонін не корегує стрес-індукованого порушення ритму активності нейронів СХЯ, а застосування епіталону нормалізує зазначений ритм.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Встановлені в роботі стрес-протективні властивості синтетичного тетрапептиду епіталону визначають доцільність подальшого всебічного дослідження біорегулятора з метою корекції змін, викликаних різноманітними стресорами.
2. При призначенні медикаментозної терапії доцільно враховувати добову залежність мелатонінотворювальної функції шишкоподібної залози.
3. Дисбаланс вмісту мелатоніну в організмі може бути використаний як патогенетичний критерій у розвитку органної та системної патології внутрішніх органів.
4. Особам, робота яких пов'язана з вахтовим режимом, при широтних перельотах, для попередження десинхронозу фізіологічних функцій рекомендується проводити періодичний контроль за показниками концентрації мелатоніну.
5. Враховуючи високу ефективність застосування мелатоніну як протекторного засобу в попередженні ендокринних, неврологічних, вікових, онкологічних розладів, тощо рекомендується провести подальші клінічні випробовування препарату.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Пішак В. П. Центральні механізми циркадіанних ритмів у ссавців / В. П. Пішак, Р. Є. Булик. — Чернівці : Медуніверситет, 2009. — 320 с. (Докторант написав 2-5 розділи монографії).
2. Булик Р. Є. Активність гена „надранньої відповіді” *c-fos* у суб'ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса за зміненої тривалості циклу світло-темрява / Р. Є. Булик // Клін. та експерим. патол. — 2009. — Т. 8, № 1. — С. 9—15.
3. Булик Р. Є. Корекція стрес-індукованих змін активності гена „надранньої відповіді” *c-fos* у латеральних великоклітинних суб'ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів / Р. Є. Булик // Морфологія. — 2009. — Т. 3, № 1. — С. 32—37.
4. Булик Р. Є. Вплив зруйнування супрахіазматичних ядер гіпоталамуса на циркадіанну щільність рецепторів мелатоніну 1A у нейронах гіпокампа щурів / Р. Є. Булик // Патологія. — 2008. — Т. 5, № 1. — С. 54—57.
5. Булик Р. Є. Щільність мелатонінових рецепторів 1a типу в нейронах гіпокампа білих щурів впродовж доби: імуногістохімічний аналіз / Р. Є. Булик // Вісник морфології. — 2008. — Т. 14, №1 — С. 69—71.
6. Булик Р. Є. Вплив епіталону на субмікроскопічні зміни пінеалоцитів при тривалому освітленні / Р. Є. Булик // Український морфологічний альманах. — 2008. — Т. 6, № 1. — С. 57—60.
7. Булик Р. Є. Вплив тетрапептиду епіталону на стрес-індуковані ультрамікроскопічні зміни нейронів супрахіазматичних ядер гіпоталамуса / Р. Є. Булик // Експериментальна та клінічна медицина. — 2008. — № 3. — С. 32-36.
8. Булик Р. Є. Структурна організація нейросекреторних клітин супрахіазматичних ядер гіпоталамуса під дією світлової стимуляції / Р. Є. Булик // Галицький лікарський вісник. — 2008. — Т. 15, № 2. — С. 11—13.

9. Булик Р. Є. Ультраструктура нейронів супрахіазматичних ядер гіпоталамуса за умов світлової депривації / Р. Є. Булик // Вісник наукових досліджень. — 2008. — № 1 (50). — С. 78—80.
10. Булик Р. Є. Світлооптичне дослідження нейронів гіпокампа щурів при епіфізарній дисфункції / Р. Є. Булик // Вісник проблем біології і медицини. — 2008. — Вип. 3. — С. 61—64.
11. Булик Р. Є. Динаміка порушень ультраструктури клітин мозкової речовини надниркових залоз щурів під впливом світлової депривації / Р.Є.Булик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. — 2008. — № 4 (44). - С. 7-10.
12. Булик Р. Є. Стрес-індуковані морфофункціональні зміни нейронів супрахіазматичних ядер гіпоталамуса щурів / Р. Є. Булик // Одеський медичний журнал. — 2008. — № 5 (109). — С. 4—6.
13. Булик Р. Є. Ультрацитохімія нейронів гіпокампа щурів за різної тривалості фотоперіоду / Р. Є. Булик // Науковий вісник Ужгородського університету, серія “Медицина”. — 2008. — Вип. 34. — С. 6—9.
14. Pishak V. Effect of melatonin on the state of neurons of the suprachiasmatic nuclei of the rat hypothalamus under conditions of permanent illumination / V. Pishak, R. Bulyk // Annales UMCS, Pharmacia. — 2008. — Vol. XXI, N 1, 29. — P. 187—190. (Докторантом особисто проведені дослідження на статевозрілих щурах з моделлю експериментального гіпопінеалізму).
15. Пішак В. П. Залежність морфофункціонального стану супрахіазматичних ядер гіпоталамуса щурів від тривалості освітлення / В. П. Пішак, Р.Є.Булик // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти — 2008. — Т. 4, № 1. — С. 44—47 (Здобувач особисто провів експериментальне дослідження, узагальнив отримані результати, підвів висновки та підготував результати до друку).
16. Пішак В. П. Сравнительная характеристика действия мелатонина и эпителина на состояние нейронов супрахiasmатических ядер гипоталамуса крыс, находящихся в условиях постоянного освещения / В. П. Пишак, Р. Е. Булык // Архив клинической и экспериментальной медицины. — 2008. — Т. 17, № 1. — С. 33—36 (Дисертант провів огляд літератури, брав участь у дослідженнях, підготував матеріали до публікації).
17. Пішак В. П. Добові зміни щільності мелатонінових рецепторів 1А у нейронах супрахіазматичних ядер гіпоталамуса за умов різної функціональної активності шишкоподібної залози / В. П. Пішак, Р. Є. Булик // Фізіол. журн. — 2008. — Т. 54, № 4. — С. 11—15. (Докторант особисто провів дослідження на щурах з моделлю експериментального гіпо- та гіперпінеалізму).
18. Пішак В. П. Стан гена ранньої функціональної активності c-fos у нейронах супрахіазматичних ядер гіпоталамуса щурів в умовах модифікацій фотоперіоду / В. П. Пішак, Р. Є. Булик, Д. А. Василенко // Нейрофізіологія. — 2008. — Т. 40, № 2. — С. 112-119 (Здобувач провів огляд літератури, проаналізував отримані матеріали, брав участь у підготовці їх до друку).
19. Пішак В. П. Хрономікроскопічна характеристика пінеалоцитів в умовах гіпофункції шишкоподібної залози / В. П. Пішак, Р. Є. Булик // Клін. та

- експерим. патол. — 2008. — Т. 7, № 2. — С. 91—94 (Автор особисто провів статистичну обробку отриманих результатів, підготував матеріали до видання).
20. Булик Р. Є. Хроногістологічна характеристика надниркових залоз щурів на тлі гіперфункції шишкоподібної залози / Р.Є.Булик, В. П. Пішак, І. С. Давиденко // Бук. мед. вісник. — 2007. — Т. 11, № 4. — С. 91—94 (Автор провів огляд літератури та аналіз отриманих результатів).
 21. Пішак В. П. Залежність ультраструктури пінеалоцитів у щурів від світлового режиму / В. П. Пішак, Р. Є. Булик // Проблеми ендокринної патології. — 2008. — № 3. — С. 62—67. (Здобувач провів огляд літератури, виконав дослідження на статевозрілих щурах з моделлю експериментального гіпер- та гіпопінеалізму).
 22. Булик Р. Є. Циркадіанні зміни мелатонінових рецепторів 1А у супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса / Р. Є. Булик // Інтегративна антропологія. — 2007. — № 2 (10). — С. 22—24.
 23. Булик Р. Є. Морфологічні зміни надниркових залоз щурів за умов тривалої експозиції постійним світлом / Р. Є. Булик // Актуальні проблеми сучасної медицини: вісник Української медичної стоматологічної академії. — 2007. — Т. 7, Вип. 4 (20). — С. 242—245.
 24. Пішак В. П. Механізми участі шишкоподібної залози в забезпеченні циркадіанної ритмічності фізіологічних функцій / В. П. Пішак, Р. Є. Булик // Бук. мед. вісник. — 2006. — Т. 10, № 4. — С. 5-8.
 25. Булик Р. Є. Спосіб дослідження циркадіанних змін мелатонінових рецепторів 1 А у супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса / Р. Є. Булик, В. П. Пішак, В. М. Магальяс, І. С. Давиденко / Патент № 36648, UA, МПК А61 В 10/00, Заявка № u 200707859, Заявл. 12.07.2007. Опубл. 10.11.2008, Бюл. № 21.
 26. Булик Р. Є. Залежність морфологічної структури шишкоподібної залози від періоду доби / Р. Є. Булик // Вчені майбутнього: міжнар. наук.-практ. конф. мол. вчених 18—19 жовт. 2005 р. : тези доп. — Одеса : Одес. держ. мед. ун-т, 2005. — С. 16.
 27. Булик Р. Є. Добові особливості морфологічної структури пінеалоцитів / Р. Є. Булик // Актуальні питання імунології, алергології та ендокринології : регіон. наук.-практ. конф. 10—11 трав. 2006 р. : тези доп. — Чернівці : Бук. держ. мед. ун-т, 2006. — С. 6—7.
 28. Булик Р.Є. Ембріотопографічні особливості шишкоподібної залози / Р. Є. Булик // Клін. анат. та операт. хірургія. — 2006. — Т. 5, № 2. — С. 73.
 29. Булик Р.Є. Ультрамикроскопічна характеристика нейрогіпофіза за умов звичайної довжини фотоперіоду / Р. Є. Булик // Фізіол. журн. — 2006. — Т. 52, № 2. — С.147.
 30. Пішак В. П. Імуногістохімічна характеристика мелатонінових рецепторів 1А у нейронах супрахіазматичних ядер гіпоталамуса / В. П. Пішак, Р. Є. Булик, І. С. Давиденко // Патологоанатомічна діагностика хвороб людини: здобутки, проблеми, перспективи : Всеукр. наук.-практ. конф., присв. 100-річчю з дня

- народження Н. М. Шінкермана 21—22 трав. 2007 р. : тези доп. — Чернівці : Бук. держ. мед. ун-т, 2007. — С. 136—140 (Автор самостійно провів забір матеріалу, здійснив пошук та аналіз літературних даних).
31. Пішак В. П. Імуногістологічні та морфометричні кореляти фотоперіодизму в супрахіазматичному ядрі щурів / В. П. Пішак, Р. Є. Булик, Д. А. Василенко // *Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти.* — 2008. — Т. 4, № 1 (додаток). — С. 8—9 (Здобувач особисто провів експеримент та статистичну обробку результатів).
32. Пішак В. П. Характеристика медіального дрібноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса при світловому стресі / В. П. Пішак, А. В. Абрамов, Р. Є. Булик // *Сучасні проблеми патофізіології : від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів : V Нац. конгрес патофізіологів України з міжнар. участю 17—19 вер. 2008 р. : тези доп.* — Запоріжжя : Запорізький. держ. мед. ун-т, 2008. — С. 115 (Дисертант статистично обробив отримані результати, підготував тези до публікації).
33. Пішак В. П. Коррекция состояния нейронов супрахиазматических ядер гипоталамуса крыс, находящихся в условиях световой стимуляции / В. П. Пишак, Р. Е. Булык // *Адаптационная физиология и качество жизни: проблемы традиционной и инновационной медицины : междунар. симпоз., посвящ. 80-летию акад. РАМН Н. А. Агаджаняна 14—16 мая 2008 г. : тезисы докл.* — М. : Рос. ун-т дружбы народов, 2008. — С. 269—271 (Автор самостійно провів дослідження, здійснив статистичну обробку даних).
34. Булик Р. Є. Вплив мелатоніну на стан нейронів супрахіазматичних ядер гіпоталамуса щурів при світловій стимуляції / Р. Є. Булик : *V міжнар. мед.-фарм. конф. студ. і мол. вчених, присв. 600-річчю Чернівців 1—3 квіт. 2008 р. : тези доп.* — Чернівці : Бук. держ. мед. ун-т, 2008. — С. 197.
35. Булик Р. Є. Мікроскопічні зміни гіпокампа за умов різної тривалості фотоперіоду та їх корекція епіталоном / Р. Є. Булик / *матеріали Всеукр. наук.—практ. конф. ["Прикладні аспекти морфології експериментальних і клінічних досліджень"]*, (Тернопіль, 29—30 трав. 2008 р.) / Терноп. держ. мед. ун-т ім. І. Я. Горбачевського. — Тернопіль : Терноп. держ. мед. ун-т ім. І. Я. Горбачевського, 2008. — С. 19—21.

АНОТАЦІЯ

Булик Р.Є. Морфофункціональне обґрунтування механізмів циркадіанних ритмів у щурів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальностями 14.03.01 – нормальна анатомія, 14.03.03 – нормальна фізіологія. – Вінницький національний медичний університет ім. М.І.Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2009.

Дисертацію присвячено з'ясуванню центральних механізмів циркадіанних ритмів у щурів, а також ролі шишкоподібної залози в механізмах корекції відхилень

морфологічного та функціонального стану структур фотоперіодичної системи щурів за різної тривалості фотоперіоду. Проаналізовано ефекти постійного освітлення та тривалої темряви на хрономорфологічний та ультраструктурний стан супрахіазматичних (СХЯ) і паравентрикулярних ядер (ПВЯ) гіпоталамуса, гіпокампа, надниркових залоз, тісно пов'язаних з організацією та реалізацією циркадіанної ритміки. Вивчено щільність мелатонінових рецепторів у супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса, гіпокампі залежно від періоду доби та при блокаді пейсмейкера циркадіанних ритмів. Доведено, що індикатором раннього десинхронозу центральних механізмів циркадіанних ритмів головного мозку щурів є порушення експресії гена швидкої функціональної відповіді *c-fos* і детермінованого ним імуноспецифічного білка c-Fos у пейсмейкерних нейронах СХЯ і кортикотропін-рилізинг-гормонпродукувальних та вазопресин-синтезуювальних суб'ядрах ПВЯ гіпоталамуса при зміні фотоперіоду. Вперше розкрито морфометричний та функціональний стан СХЯ, а також кортикотропін-рилізинг-синтезуювальних медіальних дрібноклітинних суб'ядер та вазопресин-продукувальних латеральних великоклітинних суб'ядер ПВЯ гіпоталамуса в нормі та при гіпер- і гіпофункції шишкоподібної залози. Встановлено тісні кореляційні зв'язки між морфофункціональними перебудовами СХЯ та нонапептидергічних нейросекреторних популяцій суб'ядер ПВЯ гіпоталамуса на фоні зміненої тривалості циклу світло-темрява в різні періоди доби. Синтетичний біорегулятор – епіталон (у дозі 0,5 мкг/кг) корегує інтенсивність синтезу і секреції гормонів досліджуваних структур, підвищує резистентність ультраструктур до світлового стресора та більш покращує показники площі перерізів компонентів нейронів СХЯ, а мелатонін (у дозі 0,5 мг/кг) – концентрацію в них РНК. Індол не корегує стрес-індукованого порушення ритму активності нейронів СХЯ, а застосування тетрапептиду нормалізує зазначений ритм.

Ключові слова: циркадіанні ритми, шишкоподібна залоза, фотоперіод, десинхроноз, мелатонінові рецептори, епіталон, мелатонін.

АННОТАЦІЯ

Булык Р.Е. Морфофункциональное обоснование механизмов циркадианных ритмов у крыс. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 14.03.01 – нормальная анатомия, 14.03.03 – нормальная физиология. – Винницкий национальный медицинский университет им. М.И.Пирогова, МЗО Украины, Винница, 2009.

Диссертация посвящена установлению механизмов циркадианных ритмов головного мозга крыс, а также роли шишковидной железы в механизмах коррекции отклонений морфологического и функционального состояния структур фотоперіодической системы крыс при различной продолжительности фотопериода. Проанализированы эффекты постоянного освещения и темноты на хрономорфологическое и ультраструктурное состояние супрахіазматических (СХЯ) и паравентрикулярных

ядер (ПВЯ) гипоталамуса, гиппокампа, надпочечников, вовлеченных в организацию и реализацию циркадианной ритмики.

Изучено плотность мелатониновых рецепторов в СХЯ гипоталамуса, гиппокампе в зависимости от периода суток и при блокаде пейсмекера циркадианнных ритмов. На основании комплексного исследования характера плотности мелатониновых рецепторов в нейронах СХЯ и гиппокампе в течение суток получено убедительные доказательства фотоиндуцированного ее нарушения с прекращением суточных колебаний в средних тенденциях, а также с усилением вариации индивидуальной реакции структуры лимбической системы животных на разрушение пейсмекерных нейронов.

Доказано, что индикатором раннего десинхроноза механизмов циркадианнных ритмов у крыс является нарушение экспрессии гена раннего функционального ответа *c-fos* и детерминированного им иммуноспецифического белка *c-Fos* в пейсмекерных нейронах СХЯ, кортикотропин-рилизинг-гормонпродуцирующих и вазопрессин-синтезирующих субъядрах ПВЯ гипоталамуса при изменении фотопериода.

Исследовано влияние модификаций нормальной фотопериодики на состояние гена ранней функциональной активности *c-fos* в нейронах СХЯ гипоталамуса крыс в различные промежутки суток (днем и ночью). Экспрессия продукта этого гена – белка *c-Fos* – у животных, которых содержали в нормальных условиях чередования освещения и темноты демонстрировала довольно четкий циркадианный характер (с большим уровнем днем). Условия постоянного освещения в течение семи суток приводили к нарушению ритмики активности гена *c-fos* и нивелированию суточных вариаций уровня белка *c-Fos*. В условиях световой депривации в течение аналогичного периода наблюдалось очень значительное (более чем двукратное) увеличение концентрации белка *c-Fos* и его суммарного содержания в нейронах СХЯ в дневной период.

Обсуждаются возможные механизмы влияния модификаций фотопериодики на состояние гена *c-fos* в клетках данного ядра, в частности связь таких изменений с колебаниями уровня мелатонина. Отмечено, что естественные и экспериментально модифицированные изменения фотопериодики обуславливают заметные изменения геометрических размеров ядер нейронов СХЯ.

Впервые изучено морфометрическое и функциональное состояние СХЯ, а также кортикотропин-рилизинг-синтезирующих медиальных мелкоклеточных субъядер и вазопрессин-продуцирующих латеральных крупноклеточных субъядер ПВЯ гипоталамуса в норме и при гипер- и гипофункции шишковидной железы. Установлены тесные корреляционные связи между морфофункциональными перестройками СХЯ и нонапептидергических нейросекреторных популяций субъядер ПВЯ гипоталамуса на фоне измененной длительности свет-темнота в разные периоды суток. Синтетический биорегулятор – эпиталон (в дозе 0,5 мкг/кг) корректирует интенсивность синтеза и секреции гормонов исследованных структур, повышает резистентность ультра-

структур к световому стрессору и существенно улучшает показатели площади компонентов нейронов СХЯ, а мелатонин (в дозе 0,5 мг/кг) – концентрацию в них РНК. Мелатонин не корректирует стресс-индуцированное нарушение ритма активности нейронов СХЯ, а применение эпیتالона нормализует указанный ритм.

Ключевые слова: циркадианные ритмы, шишковидная железа, фотопериод, десинхроноз, мелатониновые рецепторы, эпیتالон, мелатонин.

SUMMARY

Bulyk R.Ye. Morphofunctional substantiation of the circadian rhythms mechanisms in rats. – Manuscript.

The thesis for obtaining the academic degree of a Doctor of Medical Sciences in specialities – 14.03.01 – Normal Anatomy, 14.03.03 – Normal Physiology – M.I.Pyrogov Vinnytsia National Medical University of Ukraine's MPH, Vinnytsia, 2009.

The dissertation deals with ascertaining the central mechanisms of the circadian rhythms in rats, as well as the pineal gland role in the correcting mechanisms of morphological and functional deviations of the rat photoperiodic system under a diverse duration of a photoperiod. It has been analyzed the effects of steady illumination and prolonged darkness on the chromomorphologic and ultrastructural condition of the hypothalamic suprachiasmatic (SCN) and paraventricular nuclei (PVN), hippocamp, suprarenal glands closely connected with the organization and realization of circadian rhythmicity. The density of melatonin receptors have been studied in the SCN, hippocamp depending on the diurnal period and while blocking the pacemaker of the circadian rhythms. It has been proved that the indicator of early desynchronization of the central mechanisms of the circadian rhythms of the rat brain is a disturbance of the expression of quick functional response c-fos and determined by its immunospecific c-Fos protein in the pacemaker neurons of the SCN and corticotropin-releasing-hormone-producing and vasopressin-producing subnuclei of the PVN in case of a photoperiodic changes. For the first time, it has been disclosed the morphometric and functional condition of the SCN, as well as corticotrophin-releasing-hormone-producing medial tiny cellular subnuclei and vasopressin-producing lateral great cellular subnuclei of PVN in intact, hyper- and hypofunctioning pineal gland. Close correlations between morphofunctional structural changes of the SCN and nonapeptidergic neurosecretory populations of the PVN subnuclei has been established against the background of a changed duration of the cycle "light-darkness" during a 24-hour period. The synthetic bioregulator – epithalon (in a dose of 0,5 µg/kg) has corrected the hormones synthesis and secretion intensity of the structures under study, has raised the resistance of ultrastructures to a light stressor and has improved the indices of the square of the components of the SCN neurons, while melatonin (in a dose of 0,5 mg/kg) – the concentration of RNA. Indole has not corrected stress-induced rhythm disturbances of the SCN neurons activity, whereas the use of tetrapeptide normalized the rhythm in question.

Key words: circadian rhythms, pineal gland, photoperiod, desynchronization, melatonin receptors, epithalon, melatonin.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЕПР – ендоплазматичний ретикулум
КГ – комплекс Гольджі
КРФ – кортикотропін-релізинг фактор
лвПВЯ – латеральні великоклітинні суб'ядра ПВЯ
мдПВЯ – медіальні дрібноклітинні суб'ядра ПВЯ
од.опт.щільності – одиниця оптичної щільності
O_{1ф} – одиниця імунофлуоресценції
ПВЯ – паравентрикулярне ядро
РНК – рибонуклеїнова кислота
СХЯ – супрахіазматичне ядро
ЦР – циркадіанний ритм
ШЗ – шишкоподібна залоза

Примітка до табл. 5-7: р – вірогідні зміни щодо параметрів тварин, які перебували в умовах стандартного фотоперіоду того ж часового інтервалу; р₁ – щодо параметрів тварин попереднього часового інтервалу в межах серії; р₂ – щодо тварин, яким вводили розчинник; р₃ – щодо тварин, яким ін'єкували мелатонін за стандартного фотоперіоду; р₄ – щодо тварин, яких піддали дії постійного освітлення.