

УДК 578.63:611.81.018

Р. Є. Булик, канд. мед. наук

ЦИРКАДІАННІ ЗМІНИ МЕЛАТОНІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ 1А У СУПРАХІАЗМАТИЧНИХ ЯДРАХ ГІПОТАЛАМУСА

Буковинський державний медичний університет, Чернівці, Україна

УДК 578.63:611.81.018

Р. Е. Булык

ЦИРКАДИАНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕЛАТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ 1А В СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКИХ ЯДРАХ ГИПОТАЛАМУСА

Буковинский государственный медицинский университет, Черновцы, Украина

В статье охарактеризованы мелатониновые рецепторы 1А в нейронах ведущего пейсмекера циркадианных ритмов в головном мозге млекопитающих — супрахиазматических ядрах гипоталамуса. Показано, что плотность указанных рецепторов подчинена четкой циркадианной организации с максимумом в 02.00 и 20.00, а в 08.00 и 14.00 она существенно снижается.

Ключевые слова: мелатониновые рецепторы, супрахиазматические ядра гипоталамуса.

UDC 578.63:611.81.018

R. Ye. Bulyk

CIRCADIAN CHANGES OF MELATONIN RECEPTORS 1A IN THE SUPRACHIASMATIC NUCLEI OF THE HYPOTHALAMUS

The Bucovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

The paper characterizes melatonin receptors 1A in the neurons of the leading pacemaker of circadian rhythms in the brain of mammals — suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus. It has been established that the density of the receptors in question is subject to accurate circadian organization with the maximum value at 02.00 a. m. and 8.00 p. m., whereas at 08.00 a. m. and at 2 p. m. it decreases sufficiently.

Key words: melatonin receptors, hypothalamic suprachiasmatic nuclei.

Вступ

В організмі всіх еукаріотів наявні потужні функціональні системи, які синхронізують циркадіанні (цілодобові) ритми. Згідно з сучасними уявленнями, на роль провідного водія ритму (пейсмекера) циркадіанних ритмів (ЦР) у головному мозку ссавців претендують супрахіазматичні ядра гіпоталамуса (СХЯ) [1], а ендокринним посередником у цьому процесі є шишкоподібна залоза (ШЗ) [2]. Вона синтезує значну кількість ідентифікованих біологічно активних речовин, серед яких чільне місце належить мелатоніну [4]. Через мелатонінові рецептори (мембранні та ядерні) гормон контролює стан гіпоталамо-гіпофізарної системи й активність ендокринних залоз. Окрім того, за механізмом зворотного зв'язку він втручається в діяльність самих СХЯ [5; 7].

Авторадіографія та радіоімунний аналіз показали наявність мелатонінових рецепторів у різних структурах мозку людини, кишечнику, яєчниках і кровоносних судинах [6; 8]. Припускають, що рецептори в СХЯ гіпоталамуса регулюють циркадіанний ритм [3]. Унікальним положенням на стику нервової й ендокринної систем зумовлена своєрідна модульовальна роль ШЗ, здатної інтегрувати різні екзогенні й ендогенні сигнали, трансформуючи їх у гормональну відповідь. Маючи широкий спектр дії, мелатонін також може як відігравати роль ендогенного синхронізатора ритмічних процесів, так і запускати ЦР деяких фізіологічних показників. Показано, що секреція мелатоніну підпорядкована чітким

добовим варіаціям із мінімальним значенням удень і максимумом близько 02.00.

Таким чином, ефекти гормону зумовлені як різною функціональною активністю ШЗ упродовж доби, так і різною щільністю рецепторів мелатоніну в СХЯ, через які гормон здійснює підстроювання ритмів циркадіанного осцилятора. Однак відомості щодо характеристики мелатонінових рецепторів у СХЯ гіпоталамуса мають фрагментарний характер і не дають уявлення про вказані структури.

Мета дослідження — охарактеризувати щільність мелатонінових рецепторів у супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса у циркадіанному аспекті.

Матеріали та методи дослідження

Експерименти проведені на 40 статевозрілих самцях безпородних білих шурів масою 0,15–0,18 кг. Тварин утримували у виварії при сталій температурі, вологості повітря й вільному доступі до води та їжі. Дослідних тварин поділено на 4 групи (10 особин у кожній), які перебували в умовах звичайного світлового режиму — 12.00С:12.00Т (світло з 08.00 до 20.00, лампи денного світла ЛБ-40, освітленість приміщення на рівні тварин 200 лк) упродовж 7 діб. З метою виявлення циркадіанних відмінностей мелатонінових рецепторів і з урахуванням циклічності продукції мелатоніну евтаназію шурів виконували з 6-годинним інтервалом (02.00, 08.00, 14.00 і 24.00) шляхом декапітації на 8-му добу. Всі етапи експерименту проведено з дотриманням основних вимог Європейської конвенції щодо гуманного ставлення до тварин (Страсбург, 1986).

Для імуногістохімічного дослідження ідентифіковану ділянку СХЯ гіпоталамуса фіксували у 10%-му розчині нейтрального забуференого формаліну впродовж 22 год. Після цього виконували прискорене зневоднювання у спиртах висхідної концентрації, заливали у парафін при температурі 58 °С з подальшим отриманням гістологічних зрізів 5 мкм завтовшки.

З метою виконання імуногістохімічної методики використані поліклональні антитіла до мелатонінових рецепторів 1А виробника Abscam (Велика Британія) та стрептавідинбіотинова система візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка + діамінобензидин) виробника Chemicon International Inc. (США). Максимально дотримувалися стандартизації протоколу методики для всіх зрізів. Дозабарвлення ядер виконували гематоксилином Майєра.

Кількісні дослідження інтенсивності забарвлення проводили за такою схемою. Спочатку за допомогою об'єктива мікроскопа $\times 40$ отримували цифрові копії оптичного зображення, що в подальшому аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми «Видеотест — Розмер 5.0» (ООО «Видеотест», Росія), а саме — проводили комп'ютерну мікроденситометрію. Аналіз здійснювали на підставі вимірювань за мікрозондовою методикою в місцях позитивного забарвлення за показником «Оптична щільність» (в умовних одиницях із діапазоном 0–1, причому «0» відповідає абсолютній оптичній прозорості у мікрозонді, а «1» — абсолютній оптичній непрозорості).

Через необхідність виконання численних статистичних порівнянь середніх величин у статистичних вибірках для визначення відмінностей між сукупностями використано критерій Ньюмена — Кейлса.

Результати дослідження та їх обговорення

Чітке позитивне імуногістохімічне забарвлення визначалось у нейронах СХЯ у вигляді гранул різних розмірів і щільності, які концентрувалися переважно по периферії кожної клітини, що вочевидь відображає трансмембранне розташування мелатонінових рецепторів 1А. Імуногістохімічного забарвлення ядер не спостерігали — вони забарвлювалися виключно гематоксилином і характеризувалися типовою для нейронів СХЯ морфологією. Привертало увагу те, що серед нейронів виділялися клітини дрібних розмірів (діаметром 5–10 мкм) переважно круглястої форми та великі клітини (діаметром 13–24 мкм), які мали або полігональну, або грушоподібну форму. Характерним було те, що на 8.00 порівняно з 02.00 у 4,5 рази (з $64,0 \pm 1,2$ до $14,0 \pm 0,8$ у полі зору площею 1600 мкм^2 , $P < 0,001$ за критерієм Ньюмена — Кейлса) зменшувалася кількість позитивно забарвлених дрібних нейронів (рис. 1 і 2). Слід зазначити, що мова йде не про скорочення кількості нейронів дрібних розмірів, а про зменшення щільності в них мелатонінових рецепторів до

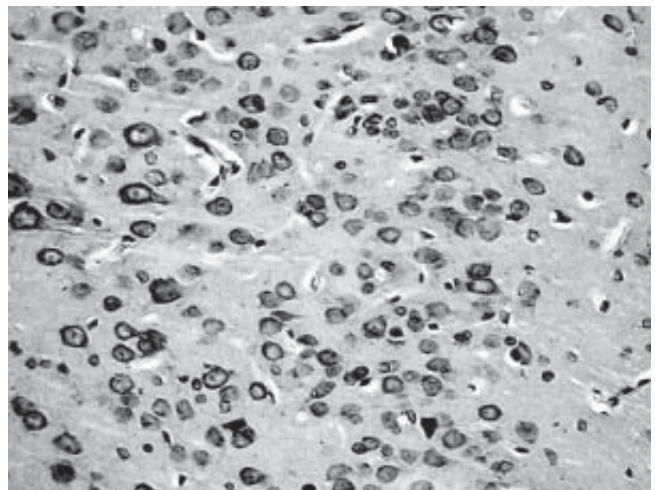


Рис. 1. Щільність мелатонінових рецепторів 1А у нейронах супрахізматичного ядра шура о 02.00

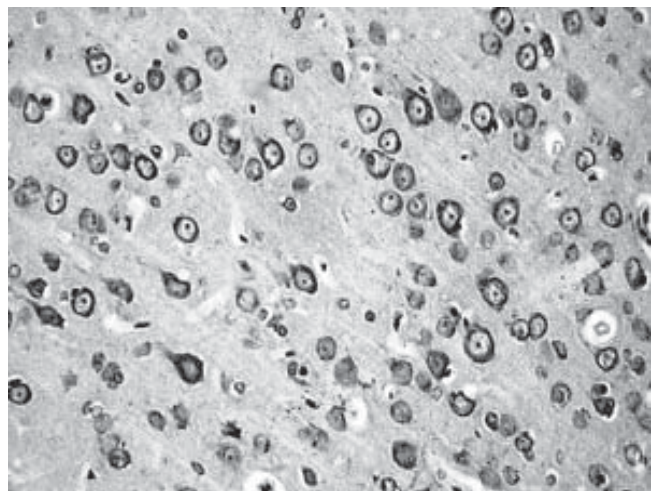


Рис. 2. Щільність мелатонінових рецепторів 1А у нейронах супрахізматичного ядра шура о 08.00

концентрації, що нижча порога чутливості застосованої імуногістохімічної методики. Крім того, за мікроденситометричними даними на 8.00 порівняно з 02.00, у великих клітинах зменшувалася оптична щільність імуногістохімічного забарвлення (таблиця), що також нами розцінювало-

Таблиця

Циркадіанна динаміка оптичної щільності забарвлення на мелатонінові рецептори 1А у «великих» нейронах супрахізматичних ядер гіпоталамуса, $\bar{x} \pm Sx$

Година доби	Оптична щільність, $n=10$	Величина вірогідності за критерієм Ньюмена — Кейлса
02.00	$0,420 \pm 0,012$	$> 0,1$ (порівняно з 20.00)
08.00	$0,340 \pm 0,008$	0,003 (порівняно з 02.00)
14.00	$0,380 \pm 0,011$	0,008 (порівняно з 08.00)
20.00	$0,410 \pm 0,013$	0,095 (порівняно з 14.00)

Примітка. n — кількість тварин.

ся як зменшення щільності мелатонінових рецепторів.

О 14.00 порівняно з 8.00 відмічали сталу картину стосовно кількості позитивно забарвлених дрібних нейронів ($16,0 \pm 1,4$ та $14,0 \pm 0,8$ у полі зору площею 1600 мкм^2 , $P=0,28$ за критерієм Ньюмена — Кейлса). Однак у великих нейронах спостерігалось зростання щільності мелатонінових рецепторів, на що вказувало підвищення оптичної щільності забарвлення (див. таблицю). Вказані закономірності проілюстровані на рис. 3.

О 20.00 відмічали «повернення» величин показників до тих, які спостерігали о 02.00. По-перше, кількість дрібних нейронів у полі зору площею 1600 мкм^2 становила $61,0 \pm 1,4$ (вірогідність розбіжностей з групою «02.00» — $P=0,079$), по-друге, величина оптичної щільності забарвлення у великих нейронах показувала аналогічну закономірність (див. таблицю та рис. 4).

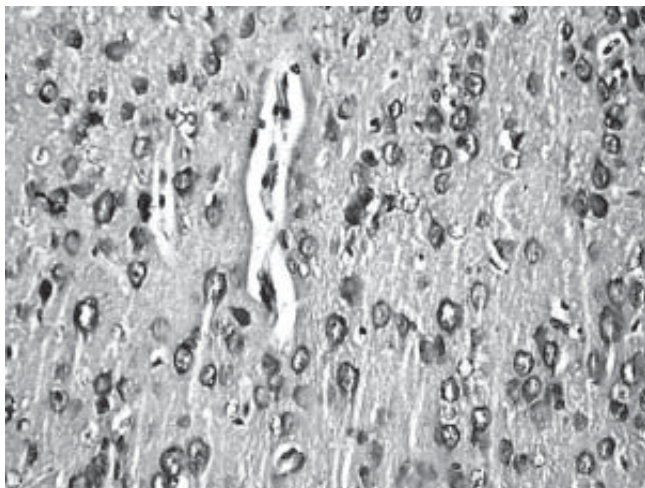


Рис. 3. Щільність мелатонінових рецепторів 1А у нейронах супрахіазматичного ядра щура о 14.00

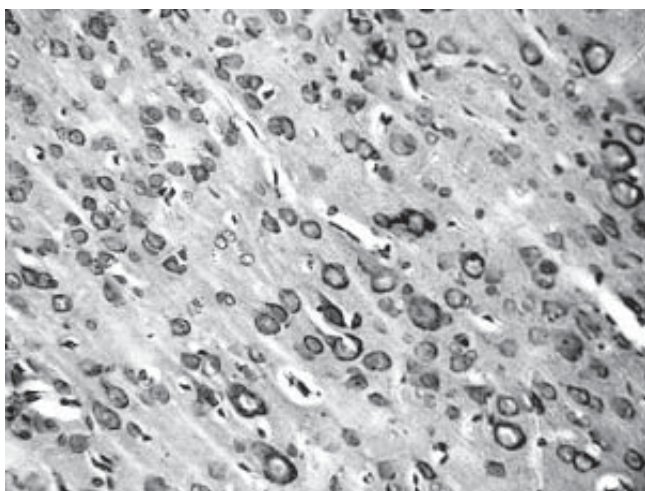


Рис. 4. Щільність мелатонінових рецепторів 1А у нейронах супрахіазматичного ядра щура о 20.00

Висновки

Щільність мелатонінових рецепторів 1А у нейронах супрахіазматичних ядер щурів підпорядкована чіткій циркадіанній організації. Найвища щільність спостерігається о 02.00 та 20.00, а о 08.00 і 14.00 вона суттєво знижується.

У подальшому планується досліджувати мелатонінові рецептори мозкових і вегетативних структур, які прямо чи опосередковано залучені до формування хроноритмічного функціонування систем органів із метою глибшого пізнання механізмів регуляції циркадіанних ритмів вищих хребетних.

ЛІТЕРАТУРА

1. Комаров Ф. И., Рапопорт С. И. Хронобиология и хрономедицина. — М.: Триада-Х, 2000. — 488 с.
2. Смирнов А. Н. Ядерные рецепторы мелатонина // Биохимия. — 2001. — Т. 66, № 1. — С. 28-36.
3. Изучение механизма связывания лигандов мелатонинных рецепторов человека методом молекулярного моделирования / А. Э. Воронков, А. И. Иванов, И. И. Баскин и др. // Докл. РАН. — 2005. — Т. 403, № 3. — С. 409-413.
4. Заморский И. И., Пишак В. П. Функциональная организация фотопериодической системы головного мозга // Успехи физиол. наук. — 2003. — Т. 34, № 4. — С. 37-53.
5. Dubocovich M. L., Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals // Endocrine. — 2005. — Vol. 2. — P. 101-110.
6. Interstrain differences in activity pattern, pineal function, and SCN melatonin receptor density of rats / G. Klante, K. Secci, M. Masson-Pevet et al. // Amer. J. Physiol. — 1999. — Vol. 276, N 4., Pt. 2. — P. R1078-R1086.
7. Reiter R. J. Melatonin: clinical relevance // Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. — 2003. — Vol. 17, N 2. — P. 273-285.
8. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms / P. A. Witt-Enderby, J. Bennett, M. J. Jarzynka et al. // Life Sci. — 2003. — Vol. 72, N 20. — P. 2183-2198.