

УДК 612.826.33:612.017.2

## УЛЬТРАЦИТОАРХІТЕКТОНІКА НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПУ ЩУРІВ ЗА РІЗНОЇ ТРИВАЛОСТІ ФОТОПЕРІОДУ

Булик Р.Є.

*Буковинський державний медичний університет, кафедра медичної біології, генетики та гістології, м. Чернівці*

**РЕЗЮМЕ:** робота виконана з метою визначення особливостей ультраструктурних порушень клітин гіпокампу щурів, які перебували за різної тривалості світлового режиму. Встановлено, що при постійній темряві ультраструктурна організація гіпокампа характеризується порушенням ритмічності та зниженням функціональної активності нейронів гіпокампа як о 14.00 год, так і о 02.00 год. За умов цілодобового постійного освітлення субмікроскопічна організація нейронів гіпокампа віддзеркалюється більш вираженими порушеннями реактивного характеру на тлі пригнічення внутрішньоклітинних регенеративних процесів. Зокрема, о 02.00 год виявлено малу кількість рибосом і полісом, каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуому мають вузькі просвіти, компоненти комплексу Гольджі погано виражені, окремі органели деструктивно змінені.

**Ключові слова:** гіпокамп, ультраструктура, фотоперіод, шишкоподібна залоза

**Вступ.** Для будь-якого організму – від найпростіших до ссавців, включаючи людину – характерною загальною властивістю є ритмічність усіх процесів життєдіяльності [9]. Найбільш вивченими є білядобові (циркадіанні) ритми, які синхронізуються відповідно з зовнішнім циклом світло/темрява, здебільшого при впливі світла на ретину [3, 10]. Порушення світлового режиму (тривале освітлення, постійна темрява) є одним з стресорів, що призводить до розвитку десинхронізації [2]. Особливе значення в розвитку стрес-синдрому належить лімбічній системі головного мозку й особливо її центральному відділу – гіпокампу [6]. Останній разом із шишкоподібною залозою (епіфізом мозку) формує т.з. функціональний хронобіологічний блок [1]. Шишкоподібна залоза є частиною блоку, який здатний сприймати зміни рівня освітленості навколишнього середовища і забезпечувати циркадіанні ритми функціонування організму, зокрема шляхом синтезу її провідного індолу – мелатоніну [3]. Показано, що секреція мелатоніну підпорядкована чітким добовим варіаціям з мінімальним значенням вдень і максимумом близько 02.00 год [12]. Ефекти епіфізарного індолу реалізуються шляхом впливу на власні рецептори, які ідентифіковані в різних структурах, у т. ч. й гіпокампі [10, 11].

Існують докази безпосереднього залучення гіпокампа в організацію відповіді на стрес [6]. Про важливу роль гіпокампа в регуляції механізмів стресової відповіді та адаптаційних процесів до дії стресорів свідчать ультраструктурні зміни нейронів у щурів при впливі різних чинників [5, 8]. Критерієм активності гіпокампа на морфологічному рівні є такі показники, як об'єм ядер і ядерець, характер каріоплазми, стан органел, вмісту секреторних міхурців, кількість синапсів та їх типів [4, 7]. Однак механізми порушень діяльності гіпокампа за умов різної тривалості світлового періоду у циркадіанному аспекті вивчені недостатньо.

**Мета дослідження** – з'ясувати ультраструктурні зміни нейронів гіпокампу в циркадіанній залежності при різному режимі освітлення.

**Матеріали та методи.** Експерименти проведені на 36 статевозрілих самцях безпородних білих щурів масою 0,15-0,18 кг. Тварин утримували в твариннику при сталій температурі, вологості повітря та вільному доступі до води і їжі. Об'єктом дослідження в експериментальних тварин обрано гіпокамп.

Експериментальні тварини поділені на три серії, у кожній з яких забір біоматеріалу здійснювався о 14.00 і о 02.00 год. Обрані терміни проведення експерименту зумовлені різною функціональною активністю шишкоподібною залозою у вказані часові періоди доби.

Тварини першої серії перебували 7 діб за умов стандартного світлового режиму – LD (світло з 08.00 до 20.00 год, освітленість люмінесцентними лампами на рівні кліток 500 лк). Щури другої серії перебували за умов світлової депривації – тривалої темряви (DD – моделювання гіперфункції шишкоподібною залозою) впродовж 7-ми діб. Тварини третьої серії перебували за умов постійного освітлення (LL – моделювання гіпофункції шишкоподібною залозою) впродовж 7-ми діб. Після закінчення 7-денного експерименту наступного дня о 14.00 і 02.00 год здійснювали виведення тварин з експерименту шляхом одномоментної декапітації під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг внутрішньочеревино).

Для електронно-мікроскопічного дослідження гіпокампу забір матеріалу проводили згідно з загальноприйнятими правилами [4]. Після трепанації вилучали структуру і фіксували її в 2,5% розчині глутаральдегіду, який готували на фосфатному буфері Міллонга з активною реакцією середовища рН 7,2-7,4. Фіксований матеріал переносили у буферний розчин і промивали протягом 20-30 хв. Після цього впродовж 60 хв здійснювали постфіксацію матеріалу, використовуючи для цього 1%

розчин чотириокису осмію на буфері Міллонга. Далі проводили дегідратацію матеріалу в спиртах і ацетоні та заливали в суміш епоксидних смол відповідно до загальноприйнятої методики [4]. Дослідження в інтактних тварин у нічний період доби та в шурів другої серії проводили при слабкому (2 лк) червоному світлі, яке практично не впливає на біосинтез мелатоніну шишкоподібною залозою [2]. Всі етапи експерименту проведено з дотриманням основних вимог Європейської конвенції щодо гуманного ставлення до тварин.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Електронномікроскопічно в умовах стандартного освітлення о 14.00 год експерименту нейронити гіпокампа розташовані щільно групами. До їх складу входять здебільшого клітини з округло-овальними ядрами, які займають більшу площу цитоплазми, мають світлу каріоплазму, окремі різної величини грудочки гетерохроматину, багато рибосомальних гранул. Каріолема має рівні контури, неширокі перинуклеарні простори, добре виражені ядерні пори. Нейроплазма займає невелику площу і нешироким обідком оточує ядро. У ній наявна помірна щільність органел, проте багато рибосом і полісом. Невеликі округло-овальні і ви-

довженої форми мітохондрії мають помірної електронної щільності матрикс і чіткі кристи. Короткі неширокі каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму оточені мембранами, на поверхні яких багато рибосом, наявні окремі первинні лізо-соми (рис. 1А).

Субмікроскопічні дослідження гіпокампа тварин о 02.00 год в умовах стандартного фотоперіоду виявлено, що в досліджуваній структурі ядра нейронитів займають значний об'єм цитоплазми. Каріоплазма містить багато дрібних грудочок гетерохроматину, ядерця спостерігаються зрідка, наявні інвагінації каріолеми, перинуклеарний простір вузький, ядерних пор обмаль. Нейроплазма нешироким обідком оточує ядро, яке має підвищену осміофілію і мало органел (рис. 1Б). Невеликі мітохондрії спостерігаються не часто, їх матрикс осміофільний і містить мало крист. Така ультраструктурна організація нейронитів відповідає їх низькій функціональній активності. Гемокапіляри з неширокими просвітами, ущільненою цитоплазмою ендотеліоцитів, в якій мало органел і піноцитозних пухирців. Наявні також нейронити з осміофільною нейроплазмою, розширеними каналцями гранулярного ендоплазматичного ретикулуму.

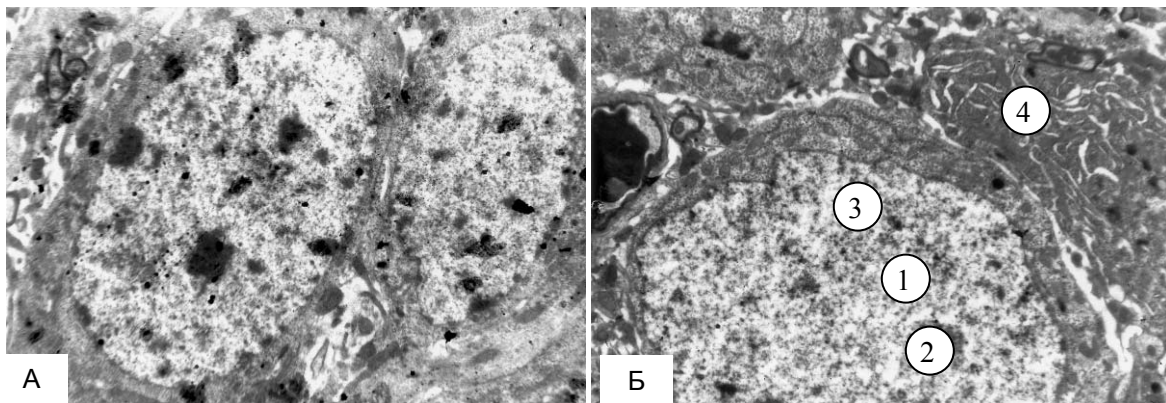


Рис. 1. Субмікроскопічний стан клітин гіпокампа тварини за стандартних умов освітлення А – о 14.00 год; округло-овальні ядра (1), світла каріоплазма (2), окремі грудочки гетерохроматину (3), невеликий об'єм цитоплазми (4). Зб. x 10 000. Б – о 02.00 год; великі ядра (1), грудочки гетерохроматину (2), каріолема з явищами інвагінації (3), гемокапіляр (4). Зб. x 10 000.

Субмікроскопічні дослідження гіпокампа тварин, які перебували в цілодобовій темряві о 14.00 год експерименту, показали, що на фоні просвітлення і набряку нейропіля, наявні нейронити з помірно осміофільною каріоплазмою та електронно-щільною нейроплазмою. У ядрах спостерігаються грудочки гетерохроматину, компактне темне ядро, що часто розташовується поблизу каріолеми. Ядерна оболонка має локально збільшений перинуклеарний простір. У нейроплазмі багато рибосом, розширені каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму та цистерни комплексу Гольджі, що утворюють направленої форми світлі порожнини. Невеликі мітохондрії заповнені осміофільним матриксом, тому кристи в них погано

виявляються (рис. 2А). Такий стан нейронитів відповідає їхній низькій функціональній активності.

Електронномікроскопічні дослідження гіпокампа тварин, які перебували в умовах світлової депривації о 02.00 год вказували на зростання кількості нейронитів з темною нейроплазмою і зміни, подібні до попереднього терміну. Проте ядерна оболонка має нерівні контури внаслідок інвагінацій і випинів. Ядерця в каріоплазмі спостерігалися зрідка, помітні невеликі грудочки гетерохроматину. Перинуклеарні простори також нерівномірні, а ядерні пори нечіткі. У нейроплазмі багато рибосом і полісом, каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму створюють електронно-прозорі неправильної форми порожнини. Окремі

мітохондрії гіпертрофовані, містять вогнищево просвітлений матрикс і пошкоджені кристи (рис. 2Б). Неширокі просвіти гемокапілярів оточе-

ні підвищеної осміюфільності вузькими цитоплазматичними ділянками ендотеліоцитів, а також нерівномірною базальною мембраною.

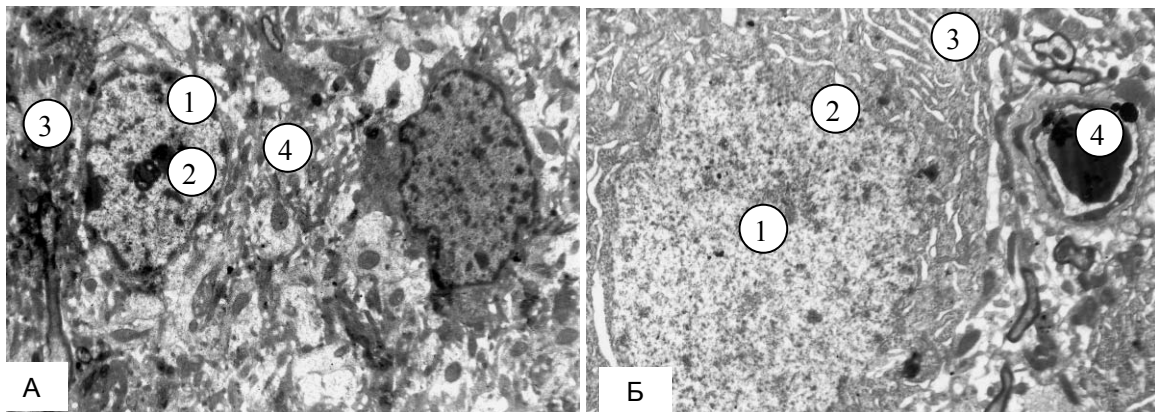


Рис. 2. Вплив світлової депривації на ультраструктурну організацію клітин гіпокампа щура  
 А – о 14.00 год; щільне темне ядерце (1) в ядрі (2), електроннощільна нейроплазма (3), розширені канальці гранулярного ендоплазматичного ретикулу (4). 36. x 17 000. Б – о 02.00 год; ядро (1) з нерівною каріоплазмою (2), нерівномірні просвіти канальців гранулярного ендоплазматичного ретикулу (3), вузький просвіт гемокапіляра (4). 36. x 10 000

Субмікроскопічні дослідження гіпокампа при цілодобовому освітленні о 14.00 год показали, що для нейроцитів характерні округло-овальні ядра, в їх каріоплазмі домінує еухроматин. Наявні великі ядерця, які в окремих випадках розташовуються близько до каріолеми. Нейроплазма має невеликий об'єм, у ній небагато рибосом і полісом. Окремі канальці гранулярного ендоплазматичного ретикулу, цистерни і вакуолі комплексу Гольджі розширені. Невеликі мітохондрії з світлим матриксом і частково порушеними кристами (рис. 3А). Такий ультраструктурний стан нейроцитів відповідає їх активації і частковому виснаженню. Гемокапіляри в таких умовах дослідження мають розширені просвіти, в яких наявні формені елементи крові. Ендотеліоцити зі світлою цитоплазмою, органел мало, помітні піноцитозні міхурці і мікроворсинки.

О 02.00 год вивченням ультраструктури гіпокампа при тривалій експозиції світлом встановлено, що у більшості нервових клітин ядра округлої форми займають більшу площу цитоплазми і мають світлу каріоплазму. Проте наявні нейроцити з нерівними контурами каріолеми внаслідок явищ інвагінації, а в їх світлій каріоплазмі спостерігаються грудочки гетерохроматину та великі ядерця, що зміщені до каріолеми (рис. 3Б). Нейроплазма більшості клітин вміщує небагато рибосом і полісом, канальці гранулярного ендоплазматичного ретикулу мають вузькі просвіти, компоненти комплексу Гольджі погано виражені. Виявляються також нейроцити, у яких нейроплазма електроннощільна, а органи деструктивно змінені. Такий стан нервових клітин свідчить про їх функціональне виснаження і пригнічений перебіг внутрішньоклітинних регенеративних процесів.

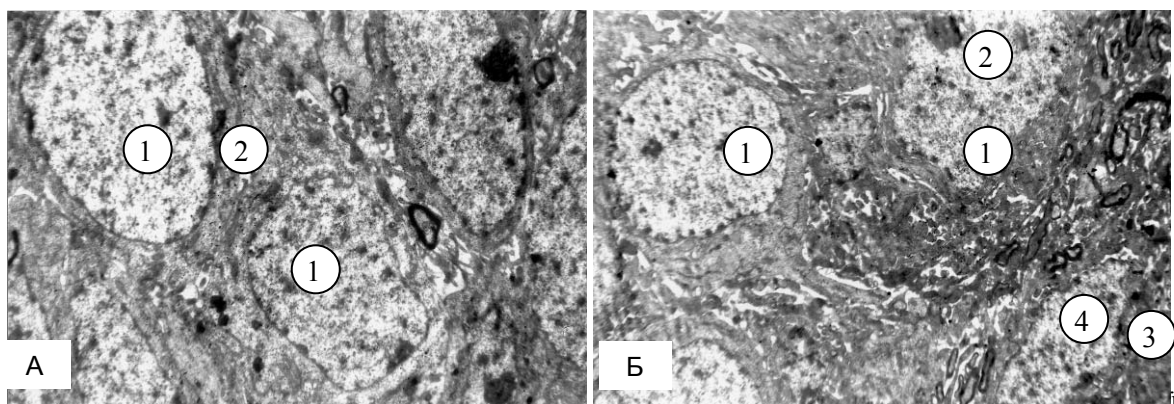


Рис. 3. Електронно-мікроскопічні зміни нейроцитів гіпокампа щурів за світлового стресу  
 А – о 14.00 год; еухроматинові ядра (1), невеликий об'єм нейроплазми (2), у ній мало рибосом і полісом. 36. x 9 000. Б – о 02.00 год; електроннопрозора каріоплазма (1) в круглих ядрах, в окремих гіпертрофія ядерця (2), фрагмент нейроплазми (3) деструктивно зміненого нейроцита (4). 36. x 8 000

**Висновки.** 1. У тварин, що перебували за умов світлової депривації ультраструктурна організація нейронів гіпокампу характеризується порушенням ритмічності та зниженням функціональної активності нейронів гіпокампа як о 14.00 год, так і о 02.00 год.

2. За умов цілодобового постійного освітлення субмікроскопічна архітектоніка нейронів гіпокампу віддзеркалюється більш вираженими порушеннями реактивного характеру на тлі пригнічення внутрішньоклітинних регенеративних

процесів. Зокрема, о 02.00 год це структурно проявляється такими ознаками: мала кількість рибосом і полісом, каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуому мають вузькі просвіти, компоненти комплексу Гольджі погано виражені, окремі органели деструктивно змінені.

У подальшому планується дослідити вплив епіфізарних пептидів і індолів на ультраструктуру нейронів гіпокампа щурів за світлового стресу.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Бейер Э.В. Место гиппокампа в биоритмологической организации поведения / Э. В. Бейер, Э. Б. Арушанян // Успехи физиол. наук. — 2001. — Т. 32, № 1. — С. 79-95.
2. Влияние постоянного освещения на суточный ритм мелатонина и структуру пинеальной железы у кроликов / Л. А. Бондаренко, Г. И. Губина-Вакулик, Н. Н. Сотник, А. Р. Геворкян // Пробл. эндокринной патологии. — 2005. — № 4. — С. 38-45.
3. Заморский И.И. Функциональная организация фотопериодической системы головного мозга / И. И. Заморский, В. П. Пишак // Успехи физиол. наук. — 2003. — Т. 34, № 4. — С. 37-53.
4. Изменение ультраструктуры митохондрий нейронов гиппокампа при экспериментальной эпилепсии / Е. Мирошеченко, Т. Литовченко, Л. Самосудова, Л. Зайченко // Таврический медико-биологический вестник. — 2003. — Т. 5, № 3. — С. 117-118.
5. Ишемические повреждения ультраструктуры нейронов в органотипической культуре ткани гиппокампа / Л. Фрумкина, Л. Хаспеков, А. Лыжин, И. Викторов // Морфология. — 2002. — Т. 121, № 1. — С. 44-48.
6. Кудинова Е. В. Основы биорезонансной регуляции структурно-функционального состояния гиппокампа при стресс-синдроме / Е. В. Кудинова, С. С. Степанов, С. И. Есенин // Омский научный вестник. — 2004. — С. 60-63.
7. Развитие постреанимационных морфологических изменений нейронов гиппокампа и мозжечка: общие закономерности и особенности / М. Аврущенко, И. Саморукова, В. Мороз [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2003. — №2. — С. 27-30.
8. Структурна організація зони СА1 гіпокампа щурів при експериментальній ішемії мозку / Т. Коваленко, І. Осадченко, К. Сможаник [та ін.] // Фізіол. журнал. — 2004. — Т. 50, № 2. — С. 86-93.
9. Green C. Circadian rhythms. Clocks on the brain / C. Green, M. Menaker // Science. — 2003. — Vol. 301, № 5631. — P. 319-320.
10. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms / P. Witt-Enderby, J. Bennett, M. Jarzynka [et al.] // Life Sci. — 2003. — Vol. 72, № 2. — P. 2183-2198.
11. Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations / U. Musshoff, D. Riewenherm, E. Berger [et al.] // Hippocampus. — 2002. — Vol. 12, № 2. — P. 165-173.
12. Reiter R. J. Melatonin: clinical relevance / R. J. Reiter // Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. — 2003. — Vol. 17, № 2. — P. 273-285.

## SUMMARY

### ULTRACYTOARCHITECTONICS OF THE RAT HIPPOCAMPAL NEURONS UNDER CONDITIONS OF A VARYING PHOTOPERIOD DURATION

**Bulyk R.Ye.**

The research has been carried out with the purpose of evaluating the specific characteristics of ultrastructural abnormalities of the hippocampal neurons of the rats being under conditions of a varying photoperiod duration. It has been established that the ultrastructural organization of the hippocamp is characterized by deranged rhythmicity and a decrease of the functional activity of neurons under permanent darkness at 02.00 a.m. and 02.00 p.m. Under conditions of round-the-clock illumination the submicroscopic organization of the hippocampal neurons is characterized by more evident abnormalities of a reactive character against a background of inhibiting biosynthetic intracellular processes. At 02.00 a.m. it is structurally manifested by an insignificant quantity of ribosomes and polysomes, the canalculi of the granular endoplasmatic reticulum are poorly pronounced individual organelles are destructively changed.

**Key words:** hippocamp, ultrastructure, photoperiod, pineal gland