

В. Мартинюк, д-р біол. наук,
Т. Берегова, д-р біол. наук,
Ю. Цейслер, канд. біол. наук,
Л. Степанова, канд. біол. наук,
Т. Кондратюк, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОПТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ПІСЛЯ ІНТРАГАСТРАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ МЕЛАНІНУ

Попередні дослідження біологічної активності меланіну, продуцентами якого є антарктичні чорні дріжджоподібні гриби *Pseudonadsoniella brupnea*, показали, що меланін виявляє антиоксидантну, стрес-адаптогенну, дерматотропну, ранозагоювальну та антибактеріальну дію. Однак первинні фізико-хімічні механізми системної дії меланіну залишаються недостатньо дослідженими. У зв'язку із цим метою дослідження було з'ясування ефектів інтрагастрального введення меланіну на оптичні властивості білкової компоненти у водної фази сироватки крові щурів. У досліді використовували білих нелінійних статевозрілих щурів-самців із масою 180–200 г. Застосовували інтрагастральний шлях уведення препарату меланіну катетером м'яким шлунковим у дозі 3 мг/кг (10-кратна терапевтична). Щурам контрольної групи таким саме чином вводили дистильовану воду. За 1 год тварин умертвляли методом цервікальної дислокації та отримували сироватку крові, яку використовували для подальших досліджень. Реєстрацію спектрів поглинання зразків сироватки крові проводили на спектрофотометрі "Shimadzu Biospec-mini" в діапазоні 190–1100 нм. Аналіз спектрів поглинання сироватки крові у широкому діапазоні від УФ до ближнього ІЧ свідчить про те, що за годину після підшкірного введення щурам меланіну в дозі 3 мг/кг оптичні властивості білків у крові не змінюються, однак достовірно змінюються властивості водної фази крові в бік зменшення кількості водневих зв'язків. Автори припустили, що поява речовин, які руйнують мережу водневих зв'язків у крові, є однією із причин таких змін. Зміни властивостей води як розчинника і структуроутворюючого фактора можуть мати подальші системні наслідки через зміни гідратації біологічних полімерів і низькомолекулярних метаболітів, їхньої розчинності та міжмолекулярних взаємодій, проникності клітинних мембран, молекулярної динаміки та функціональної активності біомакромолекули тощо.

Ключові слова: меланін, сироватка крові, білки сироватки, вода.

В. Мартинюк, д-р біол. наук,
Т. Берегова, д-р біол. наук,
Ю. Цейслер, канд. біол. наук,
Л. Степанова, канд. біол. наук,
Т. Кондратюк, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ ИНТРАГАСТРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ МЕЛАНИНА

Предыдущие исследования биологической активности меланина, продуцентами которого являются антарктические черные дрожжеподобные грибы *Pseudonadsoniella brupnea*, показали, что меланин проявляет антиоксидантное, стресс-адаптогенное, дерматотропное, ранозаживляющее и антибактериальное действие. Однако первичные физико-химические механизмы системного действия меланина остаются недостаточно исследованными. В связи с этим целью исследования было выявление эффектов интрагастрального введения меланина на оптические свойства белковой компоненты и водной фазы сыворотки крови крыс. В опытах использовали белых нелінійних половозрелых крыс-самцов с массой 180–200 г. Применяли интрагастральный путь введения препарата меланина катетером мягким желудочным в дозе 3 мг/кг (10-кратная терапевтическая). Крысам контрольной группы таким же образом вводили дистиллированную воду. Через 1 час животных умерщвляли методом цервикальной дислокации и получали сыворотку крови, которую использовали для дальнейших исследований. Регистрацию спектров поглощения образцов сыворотки крови проводили на спектрофотометре "Shimadzu Biospec-mini" в диапазоне 190–1100 нм. Анализ спектров поглощения сыворотки крови в широком диапазоне от УФ до ближнего ИК свидетельствует о том, что через час после подкожного введения крысам меланина в дозе 3 мг/кг оптические свойства белков в крови не изменяются, однако достоверно изменяются свойства водной фазы крови в сторону уменьшения количества водородных связей. Авторы предположили, что появление веществ, разрушающих сеть водородных связей в крови, является одной из причин таких изменений. Изменения свойств воды как растворителя и структурообразующего фактора могут иметь дальнейшие системные последствия в результате изменений гидратации биологических полимеров и низкомолекулярных метаболитов, их растворимости и межмолекулярных взаимодействий, проницаемости клеточных мембран, молекулярной динамики и функциональной активности биомакромолекул и др.

Ключевые слова: меланин, сыворотка крови, белки сыворотки, вода.

УДК 576.315.2; 577.352.522; 57.045
DOI 10.17721/1728_2748.2020.83.10-17

^{1,2}О. Тарнопольська, студ.,

¹А. Котлярова, канд. біол. наук

¹Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна,

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

РЕЄСТРАЦІЯ ІОННИХ СТРУМІВ КРИЗЬ LCC-КАНАЛИ ЯДЕРНОЇ МЕМБРАНИ: ХРОНОБІОЛОГІЧНИЙ АСПЕКТ

Протягом семи років досліджень транспортних систем ядерних мембран із застосуванням методу patch-clamp спостерігали певну закономірність: узимку ефективність роботи цим методом значно знижувалась. Оскільки різні сезони/пори року характеризуються різними світловими і температурними показниками, то ми вирішили перевірити ймовірний вплив останніх на успішність виконання досліджень. Тому метою цієї роботи було перевірити вплив таких сезонних факторів, як зміна тривалості світлового дня, температура, атмосферний тиск, кількість опадів і хмарність на якість patch-clamp-реєстрацій іонних струмів кризь LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів і нейронів Пуркінє мозочка. Ми припустили, що зі зменшенням тривалості світлового дня і зниженням температури зменшуються якісні та кількісні показники patch-clamp-реєстрацій. Для перевірки цього припущення застосовано кореляційний аналіз Пірсона із вихідними даними про тривалість світлового дня, метеорологічні умови та розрахованою успішністю реєстрацій (%) за конкретний день. На основі результатів такого аналізу встановлено, що існує пряма виражена лінійна залежність якості та кількості реєстрацій від тривалості світлового дня ($r = 0,6$) і температури ($r = 0,6$), а також слабка обернена залежність від хмарності ($r = 0,3$). На основі дисперсійного аналізу (ANOVA) підтверджено достовірно більшу успішність реєстрацій, виконаних у літній період, порівняно із зимовими того самого року. Отримані результати можуть стати основою для оптимізації дослідницької діяльності робочих груп, які вивчають функціонування внутрішньоклітинних транспортних систем електрофізіологічними методами, зокрема patch-clamp.

Ключові слова: біоритми, хронобіологія, метеорологічні умови, patch-clamp, ядерна мембрана, іонні канали, LCC-канали.

Вступ. Ядро є однією із ключових органел еукаріотичної клітини: воно зберігає, реалізує та передає генетичну інформацію, регулює синтетичні процеси у клітині

тощо. Від цитоплазми, у якій містяться решта органел, ядро відмежоване ядерною оболонкою, яка утворена зовнішньою і внутрішньою мембранами та перинуклео-

рним простором між ними. Ядерна оболонка містить транспортувальні системи, такі як ядерні порові комплекси [1–6], що забезпечують малоселективний транспорт між цитоплазмою та нуклеоплазмою, а також іонні канали, що розміщені як на зовнішній, так і на внутрішній мембрані та служать для високоселективного транспорту між перинуклеарним простором і нуклеоплазмою і/або цитоплазмою [3, 7–12]. Зовнішня мембрана каріолеми та, відповідно, перинуклеарний простір продовжуються в ендоплазматичний ретикулум (ЕПР) [13]. Просвіт ЕПР разом із перинуклеарним простором депонують іони кальцію [1, 13, 14]. Останні у клітині опосередковують чимало важливих процесів, зокрема регуляцію експресії генів, реплікацію ДНК, транскрипцію, участь у процесах екзоцитозу, апоптозу, синаптичної передачі, скорочення, транспортування білків, регуляції секреції тощо [10, 15–19]. Саме тому вивчення механізмів Ca^{2+} -сигналізації важливе для розуміння як багатьох фізіологічних процесів, так і патогенезу захворювань; дає змогу детальніше розібратися в механізмах впливу деяких лікарських засобів і відкриває поле для пошуку нових фармакологічних препаратів [15]. Із внутрішньоклітинних депо Ca^{2+} вивільняється крізь іонні канали в мембранах. Станом на сьогоднішній день найкраще вивченим механізмом вивільнення внутрішньоклітинного Ca^{2+} є інозитол-1,4,5-трифосфатні (IP3R) та ріанодинові (RyRs) рецептори [1, 15, 16, 20–24].

Одним із сучасних методів дослідження властивостей іонних каналів є patch-clamp, суть якого полягає у вимірюванні струмів крізь іонні канали, що робить можливим отримання інформації про електрофізіологічні властивості цих каналів, дає змогу спостерігати за їх активністю в реальному часі, зокрема за зміною кінетичних властивостей, швидкістю проходження іонів крізь канал, забезпечує можливість дослідження чутливості каналу до заданих значень потенціалу, фармакологічних речовин тощо [25]. Цей метод широко застосовується для визначення характеристик транспортних систем плазматичної мембрани клітин, однак його можна застосувати і на внутрішньоклітинних мембранах. Виконання patch-clamp-реєстрації іонного струму крізь канали зовнішньої або внутрішньої ядерної мембрани схоже на таке на плазматичній мембрані ізольованих клітин, однак складніше, полягає у виділенні необхідного біоматеріалу та ізоляції конкретних мембран у такий спосіб, щоб вони були придатними для електрофізіологічних досліджень. Серед внутрішньоклітинних мембран найзручнішими для дослідження є саме ядерні, оскільки ядра зазвичай мають достатньо великий розмір для проведення patch-clamp-реєстрації іонного струму, завдяки чому можна досить точно ідентифікувати, чи маніпуляції проводяться саме на них, на відміну від спроб реєстрації від мембрани ЕПР або внутрішньоклітинних везикул.

Дослідження властивостей іонних каналів ядерної мембрани методом patch-clamp у нашій лабораторії розпочав у 2005 році Сергій Михайлович Марченко [10]. Тоді за допомогою цього методу було зареєстровано струми крізь катіонні канали великої провідності (LCC-канали – Large-Conductance Cation channels) у ядерній мембрані нейронів Пуркінє мозочка. Згодом канали з такими самими характеристиками було зареєстровано й у мембрані ядер кардіоміоцитів [26] та інших об'єктів.

За роки досліджень каналів методом patch-clamp ми звернули увагу, що в деякі дні особливо складно реєструвати струми крізь іонні канали, оскільки майже неможливо встановити гігаомний контакт між мікропіпеткою та ядерною мембраною. Якщо ж його вдавалося встановити, то на більшості ділянок мембрани струм крізь канали був відсутній. Така проблема виникала зазвичай

у холодну пору року (кінець листопада/грудень – лютий/початок березня) і повторювалася щороку із 2013 до 2020 року. Якість реєстрації іонного струму крізь канал методом patch-clamp може залежати від якості зразка біоматеріалу, на якому виконується дослідження, а також від властивостей боросилікатного скла, що використовується для patch-піпеток, і температури, за якої їх виготовлено. Крім того, може впливати людський фактор на будь-якому з етапів виконання експерименту, наприклад недотримання методики виготовлення піпеток або ж порушення протоколу виконання patch-clamp-реєстрації струму крізь іонний канал. Однак періодичне виникнення ускладнень при реєстраціях у холодну пору року спостерігали незалежно від вищеперерахованих чинників, і така проблема, звісно, значно сповільнювала дослідження.

Оскільки для кожної пори року характерні свої світлові й температурні показники, то ми вирішили звернути увагу саме на вплив зміни тривалості світлового дня і погодних умов, оскільки такі сезонні коливання впливають на біологічні ритми живих організмів [27–30]. Метою роботи стало перевірити, чи існує статистично достовірна залежність кількості та якості patch-clamp-реєстрацій іонних струмів крізь ядерні мембрани нейронів Пуркінє мозочка і кардіоміоцитів від тривалості світлового дня і метеорологічних умов.

Отримані результати матимуть важливе значення для оптимізації робочого процесу в лабораторії, побудови ефективнішої схеми експерименту, яка дозволить економити необхідні для проведення дослідження матеріали, не застосовуючи їх у несприятливих для реєстрацій дні.

Матеріали та методи. Дослідження виконано на ядрах кардіоміоцитів і нейронів Пуркінє мозочка 3–4-тижневих щурів ліній Wistar та Fisher відповідно до положень Європейської конвенції із захисту тварин, яких використовують у експериментах (Страсбург, 1986), а також положень Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Ізолювання ядер нейронів Пуркінє мозочка та кардіоміоцитів. Для виділення ядер щурів анестезували та декапітували, після чого виділяли серце або мозок (з нього відокремлювали мозочок) і виготовляли зрізи завтовшки до 400 мкм. Зразки серця заморожували в розчині (концентрації у ммоль/л): сахароза – 300, KCl – 60, HEPES – 10 (pH 7,2; доводили KOH), а зразки мозочка – у розчині (ммоль/л): калію глюконат – 150; EDTA – 1; HEPES – 10; HEPES-калієва сіль – 10 (pH 7,2; доводили KOH). До обох розчинів додавали суміш інгібіторів протеаз (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail tablets, "Roche", Німеччина) у концентрації 1,6 мг/мл. Безпосередньо перед виконанням електрофізіологічного дослідження зразки розморожували, частково гомогенізували пропусканням крізь голку для зразків мозочка або скляним гомогенізатором об'ємом 2 мл для зразків міокарда та центрифугували. Після центрифугування відбирали надосадову рідину та ресуспендували осад у розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EDTA – 1 (pH 7,2; доводили KOH); далі – робочий розчин. Наступним етапом було власне проведення patch-clamp-реєстрації струмів. Детально методику виділення ядер кардіоміоцитів [31] і ядер нейронів Пуркінє мозочка [10] описано раніше.

Реєстрація іонних струмів крізь ядерну мембрану. Струми крізь канали реєстрували методом patch-clamp у конфігурації nucleus-attached або excised patch у режимі фіксації потенціалу. Значення показників отримували за допомогою підсилювача Visual-Patch 500 ("Bio-Logic", Франція). Patch-піпетки з опором від 9 до 14 МОм виготовляли з боросилікатного скла ("Sutter

Instruments", США). Індиферентний електрод Ag-AgCl був сполучений із робочою камерою 0,3 %-м агаровим містком, заповненим робочим розчином.

Статистична обробка. Статистично-математичне опрацювання результатів досліджень, а саме кореляційний і дисперсійний аналізи, виконано з використанням програми "OriginPro 9.1" ("OriginLab Corporation", США) за вбудованими алгоритмами.

Для проведення аналізу взято оригінальні реєстрації іонних струмів крізь ядерні мембрани і ретельні нотатки з лабораторного протоколу про проведення відповідних досліджень за період із вересня 2015 по лютий 2020 року. Серед них було 449 днів, у які виконували patch-clamp-реєстрації іонних струмів від ядерних мембран нейронів Пуркінє та кардіоміоцитів. Для аналізу враховано 205 днів роботи на кардіоміоцитах і 89 – на нейронах Пуркінє, оскільки до уваги брали лише дні, у які реєстрували струми крізь LCC-канали саме на цих об'єктах за вже розробленим протоколом. Не враховано дні постановки методики чи оптимізації умов ізолювання біоматеріалу, дні, у які завданням було реєструвати ліганд-чутливі канали, дні з реєстраціями від ядер інших об'єктів (ядра гепатоцитів, кишечника тощо), а також реєстрації, виконані студентами з досвідом менше одного року роботи із цим методом. Успішність реєстрацій виражали у відсотках: для цього визначали кількість спроб, у яких було встановлено гігаомний контакт і наявні струми крізь канал, від усіх спроб встановлення контакту та виявлення іонних струмів під час досліджень у конкретний день.

Досліджуваними факторами були тривалість світлового дня (від сходу до заходу сонця, хв) і деякі метеорологічні впливи. Дані метеорологічних умов у дні проведення електрофізіологічних дослідів узяті з архіву метеостанції № 33345 (аеропорт Жуляни), оскільки саме ця станція з архівом відкритого доступу є найближчою до місця проведення експериментів. До аналізу враховано температурні показники (°C), показники тиску (мм рт. ст.), хмарності (%) – середні по годинах проведення дослідів, а також кількість опадів (мм). Температуру враховували середньодобову для виявлення ймовірного впливу на дослідних шурів, а також середньоденну за годинами для виявлення впливу саме на етапі електрофізіологічних досліджень. Зіставивши перераховані вище сезонні показники із показниками якості patch-clamp-реєстрацій, ми провели аналіз на перевірку статистичної залежності.

Для дослідження тісноти взаємозв'язку між сезонними впливами та якістю проведених електрофізіологічних реєстрацій проведено попарний кореляційний аналіз сезонних показників із відсотком успішних реєстрацій за

день. Розрахунок коефіцієнта кореляції Пірсона (лінійний коефіцієнт кореляції) здійснювали за формулою

$$r_{xy} = \frac{\sum (x_i - M_x)(y_i - M_y)}{\sqrt{\sum (x_i - M_x)^2 \cdot \sum (y_i - M_y)^2}},$$

де x_i, y_i – змінні; M_x – середнє за X ; M_y – середнє за Y .

Коефіцієнт кореляції Пірсона – це показник лінійної залежності між двома змінними x_i, y_i , який набуває значень від -1 на позначення негативної кореляції, тобто відображення зменшення y за зростання x , до +1 на позначення позитивної кореляції, тобто зростання y за зростання x . Якщо коефіцієнт кореляції Пірсона дорівнює 0, то лінійної кореляції між змінними немає. Достовірність розрахованого коефіцієнта кореляції (P) на рисунках умовно позначено зірочками (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).

Для врахування можливого впливу набуття дослідниками досвіду із застосуванням дисперсійного аналізу (ANOVA) ми порівнювали успішність реєстрацій однакового (літнього/зимового) сезону із дворічним проміжком. ANOVA – це статистичний метод аналізу результатів, які залежать від якісних ознак, у нашому випадку – від досвіду дослідника, що виконував реєстрацію струму крізь канал. Щоб зробити висновок про наявність статистично достовірних змін між обома вибірками, ми розраховували значення критерію Фішера F на основі середніх квадратичних відхилень усередині групи та між ними, а також відповідної кількості ступенів свободи. Зміну вважали достовірною, якщо розраховане значення критерію F було більшим, ніж його критичне значення (F крит.), тобто розрахована дисперсія між групами робила більш вагомий внесок у суму дисперсій, ніж така всередині однієї вибірки.

Побудову графіків і діаграм здійснено з використанням програми "Microsoft Excel 2010".

Результати та їх обговорення. Реєстрації іонних струмів крізь LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє та кардіоміоцитів виконано методом patch-clamp. Раніше на основі таких реєстрацій нам вдалось встановити такі характеристики даних каналів: повільну кінетику, чітку потенціалозалежність, високу щільність і ймовірність перебування у відкритому стані, велику провідність (198 ± 27 і 209 ± 13 пСм у ядерних мембранах нейронів Пуркінє мозочка та кардіоміоцитів, відповідно) і спонтанну активність [10]. Типові фрагменти реєстрацій іонних струмів крізь LCC-канали ядерної мембрани клітин різного типу представлено на рис. 1.

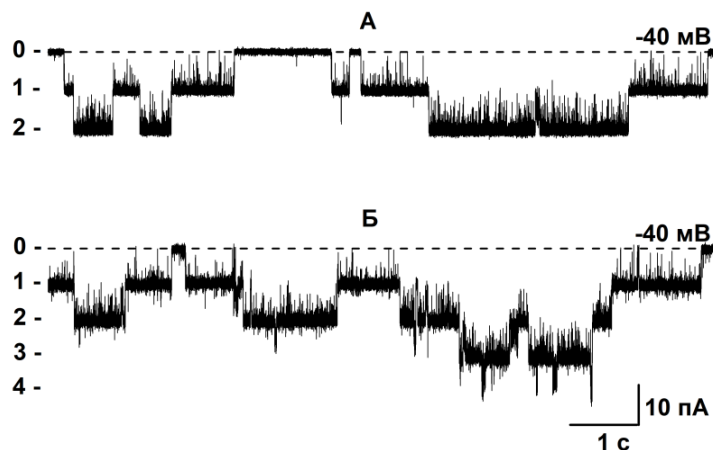


Рис. 1. Типова реєстрація струму крізь LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка (а) та кардіоміоцитів (б) при потенціалі -40 мВ: 0 – нульовий рівень струму (усі канали закриті), 1–4 – відповідна кількість відкритих каналів

Досліджуючи канали ядерних мембран методом patch-clamp, ми виявили залежність якості реєстрацій іонних струмів від сезонності. Застосовували кореляційний аналіз, ми перевірили вплив тривалості світлового дня (від сходу до заходу сонця, хв), температури (середньоденної – за годинами виконання дослідів – і середньодобової, °C), тиску (мм рт. ст.), хмарності (%), опадів (мм).

За результатами кореляційного аналізу вищеперахованих факторів і якістю реєстрацій, здійснених від ядерної мембрани нейронів Пуркінє, було виявлено позитивну лінійну залежність між якістю реєстрацій

струмів, тривалістю світлового дня (коефіцієнт кореляції $r = 0,60$, $P = 4,98E-10$) і температурою ($r = 0,64$, $P = 1,09E-11$ для середньодобової та $r = 0,62$, $P = 7,05E-11$ для середньоденної), а також слабо виражену обернену кореляційну залежність від хмарності ($r = -0,34$, $P = 0,00123$). Атмосферний тиск ($r = -0,20$, $P = 0,06$) і кількість опадів ($r = -0,03$, $P = 0,79$), незалежно від їхньої інтенсивності, достовірно не впливали на досліджуваний показник (рис. 2 а, б).

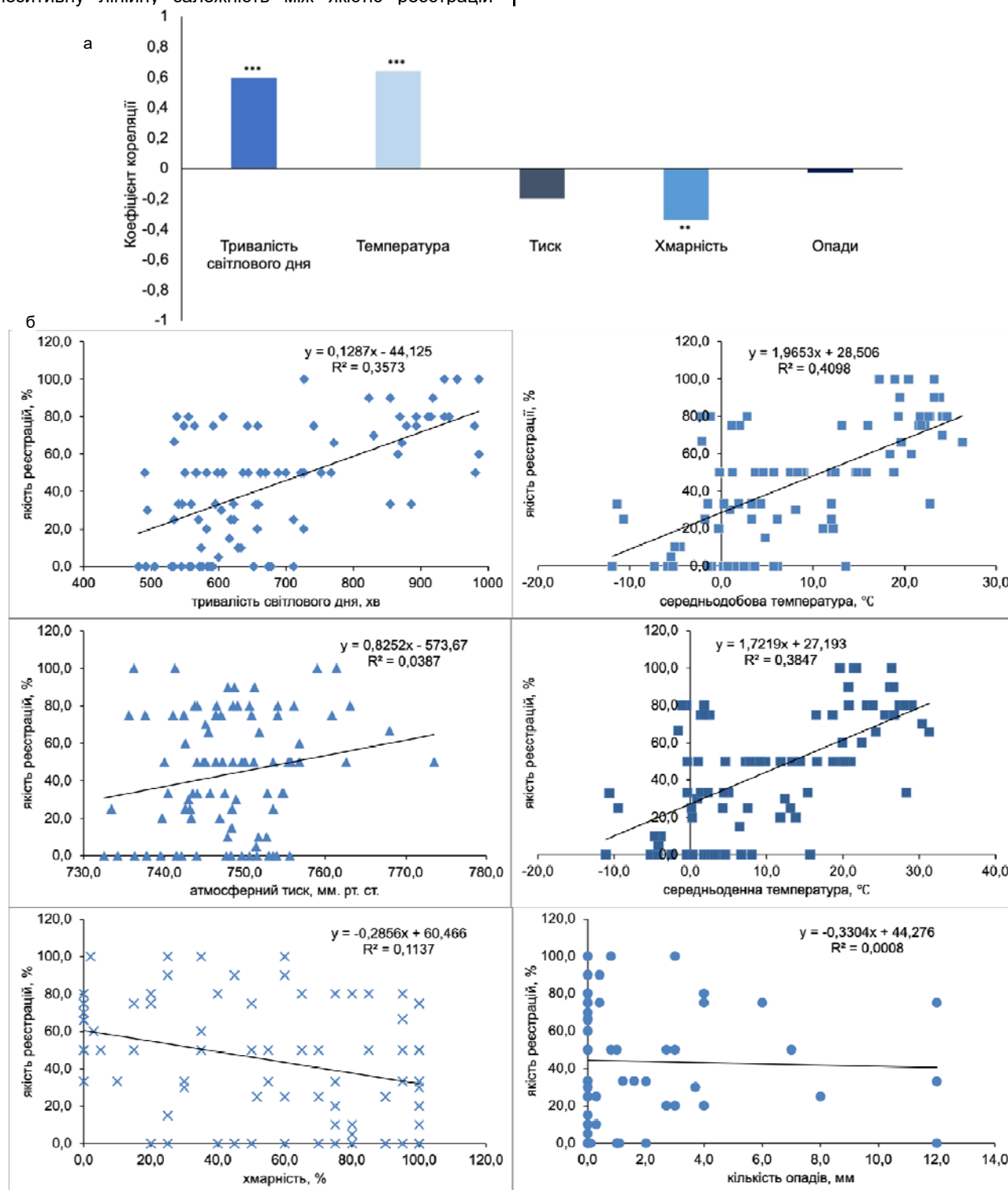


Рис. 2. Залежність якості patch-clamp-реєстрацій іонних струмів крізь ядерні мембрани нейронів Пуркінє мозочка від тривалості світлового дня і метеорологічних умов (а) (узагальнені дані за результатами кореляційного аналізу; * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$) і графічне зображення сукупної вибірки залежності якості реєстрацій від кожного з показників (тривалість світлового дня, температура, атмосферний тиск, хмарність, кількість опадів) із зазначенням лінії тренда, рівняння, яке її описує, і середнього квадратичного відхилення (б)

Аналіз реєстрацій від ядерної мембрани кардіоміоцитів також виявив кореляцію із сезонними впливами, а саме тривалістю світлового дня (коефіцієнт кореляції $r = 0,55$, $P = 0$), температурою ($r = 0,56$, $P = 0$), хмарністю ($r = -0,26$, $P = 1,69E-4$); статистично значущої

кореляції з кількістю опадів не виявлено ($r = -0,07$, $P = 0,29345$), а для атмосферного тиску значення коефіцієнта кореляції було наближеним до достовірного ($r = -0,13$, $P = 0,055$) (рис. 3 а, б).

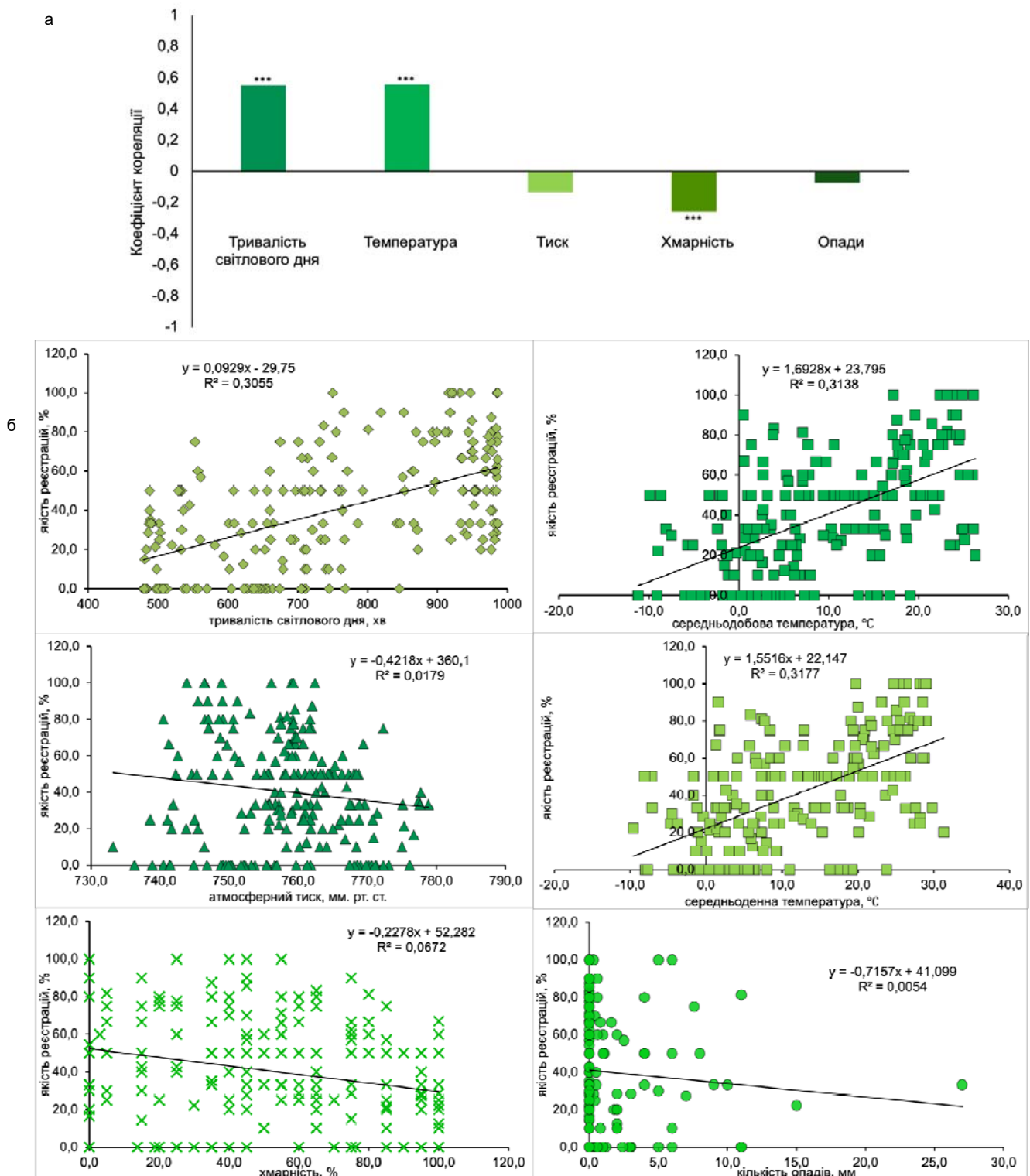


Рис. 3. Кореляційний аналіз залежності якості patch-clamp-реєстрацій іонних струмів крізь ядерні мембрани кардіоміоцитів від тривалості світлового дня і факторів середовища, $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,001$ (а), і залежності якості реєстрацій від кожного з факторів (тривалість світлового дня, температура, атмосферний тиск, хмарність, кількість опадів) із зазначенням лінії тренда і рівняння, яке її описує (б)

Ми також проводили кореляційний аналіз на виявлення ступеня впливу різноманітних погодних явищ, таких як дощ, димка, туман, однак ступінь кореляції

кожного з них окремо із якістю реєстрацій був незначним – $r = -0,18$ – $+0,13$. Зважаючи на відносно невелику кількість днів, у які спостерігали туманні явища, для

аналізу ми об'єднали дані, отримані на обох об'єктах (ядрах кардіоміоцитів і нейронів Пуркінє мозочка), а сам фактор градували за інтенсивністю, присвоївши умовне значення інтенсивності фактору 1 у дні, у які спостерігали димку (або серпанок – легка туманна повітря), і значення 2, якщо виникав повноцінний туман. За таких умов спостерігали середню негативну кореляційну залежність ($r = -0,25$, $P = 1,64E-5$) між якістю отриманих реєстрацій та інтенсивністю туману.

Крім цього, із використанням дисперсійного аналізу ми порівнювали успішності реєстрацій між зимовим і літнім періодом 2016 та окремо такими самими періодами 2018 року. Можна стверджувати, що існує достовірна сезонна різниця успішності реєстрацій, при цьому розраховані значення F і $F_{кр.}$ для результатів, отриманих 2016 року становили 0,78 і 0,59, а для таких 2018 року – 0,71 і 0,69, відповідно.

Ураховуючи складність методу patch-clamp, особливо на субклітинних структурах, потрібно врахувати також вплив набуття досвіду експериментаторами. Для цього ми провели дисперсійний аналіз успішності експериментів за певний сезон і певним часовим проміжком і порівняли успішність реєстрацій за грудень 2015 – лютий 2016 року (зимові місяці) з таким самим періодом на межі 2017–2018 років, а також літні місяці: червень – серпень 2016 і відповідні у 2018 році. Встановлено, що patch-clamp-реєстрації, виконані влітку 2018 року, були достовірно більш успішними (середня успішність 69,53 %), ніж у 2016 (середня 50,35 %), оскільки $F > F_{кр.}$ ($F = 0,74$, $F_{кр.} = 0,68$). Це можна пояснити як набуттям дослідниками досвіду, так і метеорологічними умовами, оскільки температура влітку 2018 року була на 2,7 °C вищою, ніж у такий самий період 2016, а за нашими дослідженнями відсотковий вихід якісних реєстрацій зростає з підвищенням температури. Щодо аналізу успішності в зимові періоди, то у 2018 році (середня успішність 22,71 %) реєстрації виявилися достовірно менш успішними, ніж у 2016 (успішність 30,21 %), із $F = 0,74$, а $F_{кр.} = 0,69$. Таку зміну можна пояснити і неоднаковими умовами, оскільки середня температура (у дні досліджень) узимку 2016 року (+0,62 °C) була на 4 °C вищою, ніж у відповідний період 2018 року (-3,48 °C), що узгоджується із результатами аналізу впливу температури на якість реєстрацій.

Зіставивши дані про проведення експериментів із застосуванням методу patch-clamp і такими сезонними змінами, як тривалості довжини світлового дня метеорологічних умов, ми виявили, що якість утворення гігаомного контакту і реєстрацій крізь іонні канали справді має періодичність. Була виявлена значна пряма лінійна залежність якості реєстрацій від тривалості світлового дня і температури. Чим довша тривалість світлового дня і вища температура, тим краща якість patch-clamp-реєстрацій як від ядерних мембран кардіоміоцитів, так і від ядерних мембран нейронів Пуркінє.

Такий ефект можна пояснити фотоперіодизмом – здатністю рослин і тварин реагувати на зміни тривалості світлового дня в навколишньому середовищі. Тваринам це потрібно для раціонального розподілу енергетичних ресурсів протягом року, необхідних для репродукції та реалізації сезонних стратегій виживання [27, 30, 32]. У ссавців секреція мелатоніну епіфізом зворотно пропорційна до довжини світлового дня. Таким чином, секреція мелатоніну влітку менша, аніж узимку. Мелатонін чинить значний вплив на гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникову і гіпоталамо-гіпофізарно-гонаду ось, вісь мозок – кишечник, діяльність автономної нервової та імунної систем [28, 29, 33, 34]. Варто зазначити, що узимку обмінні процеси сповільнюються, змінюється

плинність мембрани та її ліпідний склад. Зокрема, адаптація тварин до холодних умов існування пов'язана зі збільшенням вмісту ненасичених жирних кислот [35], що, у свою чергу, збільшує плинність мембрани і може впливати на якість утворення гігаомного контакту. Імовірно, також відбуваються певні зміни в експресії рецепторів і каналів різного типу на поверхні мембран залежно від кількості секретованого мелатоніну і/або змін у будові біологічних мембран, що пов'язані із сезонними змінами температури.

Висновки. На основі кореляційного та дисперсійного аналізів підтверджено закономірність, що взимку значно складніше, ніж улітку, встановлювати гігаомний контакт між patch-піпеткою і ядерною мембраною та проводити реєстрацію струмів крізь іонні канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка/кардіоміоцитів. Установлено кореляцію між якістю реєстрацій струмів крізь іонні канали і тривалістю світлового дня (коефіцієнт кореляції $r = 0,6$, $P = 4,98E-10$ для реєстрацій на ядрах нейронів Пуркінє та $r = 0,55$, $P = 0$ для реєстрацій на ядрах кардіоміоцитів), а також температурою ($r = 0,6$, $P = 7,05E-11$ та $r = 0,56$, $P = 0$). Менш значного впливу завдають зміни хмарності: для нейронів Пуркінє $r = -0,34$, $P = 0,00123$ та для кардіоміоцитів $r = -0,26$, $P = 1,69E-4$ відповідно.

Отже, виконувати такі електрофізіологічні дослідження за теплої пори року і тривалішого світлового дня є ефективнішим із погляду як кількості можливих реєстрацій, так і їхньої якості. Це має важливе значення для оптимізації досліджень, що проводяться із застосуванням електрофізіологічних методів, зокрема методом patch-clamp, на внутрішньоклітинних біологічних мембранах. Володіючи інформацією про статистично достовірне погіршення якості та кількості реєстрацій зі скороченням світлового дня, що, імовірно, пов'язано зі зменшенням рівня секреції мелатоніну, а також зниженням температури і змінами у складі біологічних мембран, робочі групи електрофізіологічних лабораторій зможуть скласти план дослідження із максимально можливим коефіцієнтом корисної дії та мінімальними витратами необхідних для досліджень матеріалів.

Список використаних джерел

1. Mauger J. P. Role of the nuclear envelope in calcium signalling / J. P. Mauger // *Biol. Cell.* – 2012. – Vol. 104, № 2. – P. 70–83.
2. Zuleger N. Inner nuclear membrane protein transport is mediated by multiple mechanisms / N. Zuleger, N. Korfali, E. C. Schirmer // *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – Vol. 36, № 6. – P. 1373–1377.
3. Mazzanti M. Electrical dimension of the nuclear envelope / M. Mazzanti, J. O. Bustamante, H. Oberleithner // *Physiol. Rev.* – 2001. – Vol. 81, № 1. – P. 1–19.
4. Grossman E. Functional Architecture of the Nuclear Pore Complex / E. Grossman, O. Medalia, M. Zwergler // *Annu. Rev. Biophys. Annual Reviews.* – 2012. – Vol. 41, № 1. – P. 557–584.
5. Kabachinski G. The nuclear pore complex – Structure and function at a glance / G. Kabachinski, T. U. Schwartz // *J. Cell Sci.* – 2015. – Vol. 128, № 3. – P. 423–429.
6. Beck M. The nuclear pore complex: Understanding its function through structural insight / M. Beck, E. Hurt // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature Publishing Group. – 2017. – Vol. 18, № 2. – P. 73–89.
7. Ion channels in the nuclear envelope / M. Mazzanti et al. // *Nature.* – 1990. – Vol. 343, № 6260. – P. 764–767.
8. Matzke A. J. M. Ion channels at the nucleus: Electrophysiology meets the genome / A. J. M. Matzke, T. M. Weiger, M. Matzke // *Mol. Plant. The Authors.* All rights reserved. – 2010. – Vol. 3, № 4. – P. 642–652.
9. Marchenko S. Nuclear Ca^{2+} signalling in cerebellar Purkinje neurons / S. Marchenko, R. Thomas // *Cerebellum.* – 2006. – Vol. 5, № 1. – P. 36–42.
10. Spontaneously active and $InsP_3$ -activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones / S. M. Marchenko et al. // *J. Physiol.* – 2005. – Vol. 565, № 3. – P. 897–910.
11. Identification of ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes / A. B. Kotliarova et al. // *The Animal Biology.* – 2016. – Vol. 18, № 4. – P. 157.
12. Fedorenko O. A. Ion channels of the nuclear membrane of hippocampal neurons / O. A. Fedorenko, S. M. Marchenko // *Hippocampus.* – 2014. – Vol. 24, № 7. – P. 869–876.

13. Subramanian K. Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores / K. Subramanian, T. Meyer // *Cell. Cell Press.* – 1997. – Vol. 89, № 6. – P. 963–971.
14. Gerasimenko O. New aspects of nuclear calcium signalling / O. Gerasimenko, J. Gerasimenko // *Journal of Cell Science.* – 2004. – Vol. 117, № 15. – P. 3087–3094.
15. Islam M. S. Calcium Signaling: From Basic to Bedside / M. S. Islam // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer New York LLC. – 2020. – Vol. 1131. – P. 1–6.
16. Martin N. Calcium signaling and cellular senescence / N. Martin, D. Bernard // *Cell Calcium.* Elsevier Ltd. – 2018. – Vol. 70. – P. 16–23.
17. Zheng J. Calcium ion as cellular messenger / J. Zheng, X. H. Zeng, S. Q. Wang // *Sci. China Life Sci.* – 2015. – Vol. 58, № 1. – P. 1–5.
18. Carafoli E. Why calcium? How calcium became the best communicator / E. Carafoli, J. Krebs // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 291, № 40. – P. 20849–20857.
19. Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum / P. Marius et al. // *Cell Calcium.* – 2006. – Vol. 39, № 1. – P. 65–73.
20. Kotliarova A. B. IP3-sensitive Ca(2+)-channels of endoplasmic reticulum in secretory cells of the rat exorbital lacrimal gland / A. B. Kotliarova, V. V. Man'ko // *Ukrains'kyi biokhimichnyi zhurnal.* – 2013. – Vol. 85, № 5. – P. 27–36.
21. Intracellular calcium release channels: an update / G. Santulli et al. // *J. Physiol.* – 2017. – Vol. 595, № 10. – P. 3041–3051.
22. Berridge M. J. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease / M. J. Berridge // *Physiol. Rev.* – 2016. – Vol. 96, № 4. – P. 1261–1296.
23. Voolstra O. Ca2+ Signaling in Drosophila Photoreceptor Cells / O. Voolstra, A. Huber // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2020. – Vol. 1131. – P. 1–1110.
24. An update on nuclear calcium signalling / M. D. Bootman et al. // *J. Cell Sci.* – 2009. – Vol. 122, № 14. – P. 2337–2350.
25. Conforti L. Patch-clamp techniques / L. Conforti // *Cell Physiology Source Book.* Fourth Edi. Elsevier Inc. – 2012. – P. 369–381.
26. Single-Channel Ion Currents in the Nuclear Envelope of Rat Cardiomyocytes / O. A. Kotyk et al. // *Fiziol. Zh.* – 2016. – Vol. 62, № 6. – P. 3–8.
27. Hazlerigg D. The evolutionary physiology of photoperiodism in vertebrates / D. Hazlerigg // *Progress in Brain Research.* – 1st ed. B. V. Elsevier – 2012. – Vol. 199. – P. 413–422.
28. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin / B. Malpaux et al. // *J. Biol. Rhythms.* – 2001. – Vol. 16, № 4. – P. 336–347.
29. Goldman B. D. Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement / B. D. Goldman // *Journal of Biological Rhythms.* – 2001. – Vol. 16, № 4. – P. 283–301.
30. Walton J. C. Influence of photoperiod on hormones, behavior, and immune function / J. C. Walton, Z. M. Weil, R. J. Nelson // *Frontiers in Neuroendocrinology.* NIH Public Access. – 2011. – Vol. 32, № 3. – P. 303–319.
31. Котик О. А. Оптимізація методу ізолювання ядер для електрофізіологічних досліджень іонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура / О. А. Котик, А. Б. Котлярова, С. М. Марченко. – 2018.
32. Tahara Y. The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise / Y. Tahara, S. Aoyama, S. Shibata // *Journal of Physiological Sciences.* Springer Tokyo. – 2017. – Vol. 67, № 1.
33. Claustrat B. Melatonin: Physiological effects in humans / B. Claustrat, J. Leston // *Neurochirurgie.* Elsevier Masson SAS. – 2015. – Vol. 61, № 2–3. – P. 77–84.
34. From implantation to birth: Insight into molecular melatonin functions / G. Carlomagno et al. // *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG. – 2018. – Vol. 19, № 9.
35. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure / J. A. Logue et al. // *J. Exp. Biol.* – 2000. – Vol. 203, № 14. – P. 2105–2115.
8. Matzke, A.J.M., Weiger, T.M., Matzke, M. Ion channels at the nucleus: Electrophysiology meets the genome. *Mol. Plant* 2010, 3(4), 642–652, doi:10.1093/mp/ssq013.
9. Marchenko, S., Thomas, R. Nuclear Ca2+ signalling in cerebellar Purkinje neurons. *Cerebellum* 2006, 5(1), 36–42, doi:10.1080/14734220600554438.
10. Marchenko, S.M., Yarotsky, V. V., Kovalenko, T.N., Kostyuk, P.G., Thomas, R.C. Spontaneously active and InsP3-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones. *J. Physiol.* 2005, 565(3), 897–910, doi:10.1113/jphysiol.2004.081299.
11. Kotliarova, A.B., Kotyk, O.A., Polishchuk, A.O., Pavlova, N.I., Marchenko, S.M. Identification of ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. *The Animal Biology* 2016, 18(4), 157.
12. Fedorenko, O.A., Marchenko, S.M. Ion channels of the nuclear membrane of hippocampal neurons. *Hippocampus* 2014, 24(7), 869–876, doi:10.1002/hipo.22276.
13. Subramanian, K., Meyer, T. Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell* 1997, 89(6), 963–971, doi:10.1016/S0092-8674(00)80281-0.
14. Gerasimenko, O., Gerasimenko, J. New aspects of nuclear calcium signalling. *J. Cell Sci.* 2004, 117, 3087–3094.
15. Islam, M.S. Calcium Signaling: From Basic to Bedside. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer New York LLC, 2020; Vol. 1131, pp. 1–6.
16. Martin, N., Bernard, D. Calcium signaling and cellular senescence. *Cell Calcium* 2018, 70 16–23, doi:10.1016/j.ceca.2017.04.001.
17. Zheng, J., Zeng, X.H., Wang, S.Q. Calcium ion as cellular messenger. *Sci. China Life Sci.* 2015, 58(1), 1–5, doi:10.1007/s11427-014-4795-y.
18. Carafoli, E., Krebs, J. Why calcium? How calcium became the best communicator. *J. Biol. Chem.* 2016, 291(40), 20849–20857, doi:10.1074/jbc.R116.735894.
19. Marius, P., Guerra, M.T., Nathanson, M.H., Ehrlich, B.E., Leite, M.F. Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 2006, 39(1), 65–73, doi:10.1016/j.ceca.2005.09.010.
20. Kotliarova, A. B., Man'ko, V. V. IP3-sensitive Ca(2+)-channels of endoplasmic reticulum in secretory cells of the rat exorbital lacrimal gland. *Ukrains'kyi biokhimichnyi zhurnal* 2013, 85(5), 27–36. <https://doi.org/10.15407/ubj85.05.027>.
21. Santulli, G., Nakashima, R., Yuan, Q., Marks, A.R. Intracellular calcium release channels: an update. *J. Physiol.* 2017, 595(10), 3041–3051, doi:10.1113/JP272781.
22. Berridge, M.J. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev.* 2016, 96(4), 1261–1296, doi:10.1152/physrev.00006.2016.
23. Voolstra, O., Huber, A. Ca2+ Signaling in Drosophila Photoreceptor Cells; 2020; Vol. 1131; ISBN 97803030124564.
24. Bootman, M.D., Fearnley, C., Smyrniak, I., MacDonald, F., Roderick, H.L. An update on nuclear calcium signalling. *J. Cell Sci.* 2009, 122(14), 2337–2350, doi:10.1242/jcs.028100.
25. Conforti, L. Patch-clamp techniques; Fourth Edi.; Elsevier Inc., 2012; ISBN 9780123877383.
26. Kotyk, O.A., Kotliarova, A.B., Polishchuk, A.O., Marchenko, S.M. Single-Channel Ion Currents in the Nuclear Envelope of Rat Cardiomyocytes. *Fiziol. Zh.* 2016, 62(6), 3–8, doi:10.1615/intjphysiopathophys.v8.i4.70.
27. Hazlerigg, D. The evolutionary physiology of photoperiodism in vertebrates; 1st ed.; Elsevier B.V., 2012; Vol. 199; ISBN 9780444594273.
28. Malpaux, B., Migaud, M., Tricoire, H., Chemineau, P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J. Biol. Rhythms* 2001, 16(4), 336–347, doi:10.1177/074873001129002051.
29. Goldman, B.D. Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J. Biol. Rhythms* 2001, 16, 283–301.
30. Walton, J.C., Weil, Z.M., Nelson, R.J. Influence of photoperiod on hormones, behavior, and immune function. *Front. Neuroendocrinol.* 2011, 32, 303–319.
31. Котик, О.А., Котлярова, А.Б., Марченко, С.М. Оптимізація методу ізолювання ядер для електрофізіологічних досліджень іонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура. 2018.
32. Tahara, Y., Aoyama, S., Shibata, S. The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise. *J. Physiol. Sci.* 2017, 67.
33. Claustrat, B., Leston, J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie* 2015, 61(2–3), 77–84, doi:10.1016/j.neuchi.2015.03.002.
34. Carlomagno, G., Minini, M., Tilotta, M., Unfer, V. From implantation to birth: Insight into molecular melatonin functions. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19.
35. Logue, J.A., De Vries, A.L., Fodor, E., Cossins, A.R. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. *J. Exp. Biol.* 2000, 203(14), 2105–2115.

Reference

1. Mauger, J.P. Role of the nuclear envelope in calcium signalling. *Biol. Cell* 2012, 104(2), 70–83, doi:10.1111/boc.201100103.
2. Zuleger, N., Korfali, N., Schirmer, E.C. Inner nuclear membrane protein transport is mediated by multiple mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* 2008, 36(6), 1373–1377, doi:10.1042/BST0361373.
3. Mazzanti, M., Bustamante, J.O., Oberleithner, H. Electrical dimension of the nuclear envelope. *Physiol. Rev.* 2001, 81(1), 1–19, doi:10.1152/physrev.2001.81.1.1.
4. Grossman, E., Medalia, O., Zwerger, M. Functional Architecture of the Nuclear Pore Complex. *Annu. Rev. Biophys.* 2012, 41(1), 557–584, doi:10.1146/annurev-biophys-050511-102328.
5. Kabachinski, G., Schwartz, T.U. The nuclear pore complex – Structure and function at a glance. *J. Cell Sci.* 2015, 128(3), 423–429, doi:10.1242/jcs.083246.
6. Beck, M., Hurt, E. The nuclear pore complex: Understanding its function through structural insight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017, 18(2), 73–89, doi:10.1038/nrm.2016.147.
7. Mazzanti, M., DeFelice, L.J., Cohen, J., Malter, H. Ion channels in the nuclear envelope. *Nature* 1990, 343(6260), 764–767, doi:10.1038/343764a0.

Надійшла до редколегії 1.10.2020
Отримано виправлений варіант 2.11.2020
Підписано до друку 2.11.2020

Received in the editorial 1.10.2020
Received a revised version on 2.11.2020
Signed in the press on 2.11.2020

^{1,2}О. Тарнопольская, студ.,¹А. Котлярова, канд. биол. наук¹Институт физиологии имени О. О. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина,²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

РЕГИСТРАЦИЯ ИОННЫХ ТОКОВ СКВОЗЬ ЛСС-КАНАЛЫ ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ: ХРОНОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

На протяжении семи лет исследований транспортных систем ядерных мембран с применением метода patch-clamp наблюдалась определенная закономерность: зимой эффективность работы этим методом значительно снижалась. Поскольку разные сезоны/времена года характеризуются различными световыми и температурными показателями, мы решили обратить внимание на возможное воздействие последних на успешность выполнения исследований. Целью этой работы стала проверка влияния таких сезонных факторов, как изменение продолжительности светового дня, температура, атмосферное давление, количество осадков и облачность на качество patch-clamp-регистраций ионных токов через ЛСС-каналы ядерной мембраны кардиомиоцитов и нейронов Пуркинье мозжечка. Было выдвинуто предположение, что с уменьшением продолжительности светового дня и понижением температуры уменьшаются качественные и количественные показатели patch-clamp-регистраций. Для проверки этого предположения был применен корреляционный анализ Пирсона с исходными данными о продолжительности светового дня, метеорологических условиях и рассчитанной успеваемостью регистраций (%) за конкретный день. На основе результатов такого анализа было установлено, что существует прямая выраженная линейная зависимость качества и количества регистраций от продолжительности светового дня ($r = 0,6$) и температуры ($r = 0,6$), а также слабая обратная зависимость от облачности ($r = 0,3$). На основе дисперсионного анализа (ANOVA) подтверждено достоверно большую успешность регистраций, выполненных в летний период, по сравнению с зимними того же года. Полученные результаты могут стать основой для оптимизации исследовательской деятельности рабочих групп, изучающих функционирование внутриклеточных транспортных систем электрофизиологическими методами, в частности patch-clamp.

Ключевые слова: биоритмы, хронобиология, метеорологические условия, patch-clamp, ядерная мембрана, ионные каналы, ЛСС-каналы.

^{1,2} O. Tarnopolska, stud.,¹ A. Kotliarova, PhD¹ Bogomolets Institute of Physiology NASU, Kyiv, Ukraine,² Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ION CURRENTS REGISTRATION THROUGH LCC-CHANNELS OF THE NUCLEAR MEMBRANES: CHRONOBIOLOGICAL ASPECT

For seven years of researching the transport systems of nuclear membranes using the patch-clamp method, we observed a certain pattern: in winter, this method's efficiency significantly decreased. Since different seasons are characterized by different light and temperature indicators, we decided to pay attention to the latter's possible impact on the success of the research. Therefore, the purpose of this work was to test the influence of seasonal factors such as changes in daylight hours, temperature, atmospheric pressure, precipitation, and cloudiness on the quality of patch-clamp recordings of ion currents through the LCC channels of the nuclear membrane of cardiomyocytes and cerebellar Purkinje neurons. We assumed that with decreasing daylength and decreasing temperature, the patch-clamp registrations' qualitative and quantitative indicators also decrease. We applied Pearson's correlation analysis with initial data on daylight hours, meteorological conditions, and calculated progress of registrations (%) for a specific day to test this assumption. Based on the results of this analysis, we found out that there is a direct pronounced linear dependence of the quality and number of registrations on the length of daylight hours ($r = 0.6$) and temperature ($r = 0.6$), as well as a weak inverse dependence on cloudiness ($r = 0.3$). Analysis of variance (ANOVA) also confirmed a significantly greater success of registrations performed in the summer compared to the winter of the same year. The obtained results can become the basis for optimizing the research activities of working groups studying intracellular transport systems' functioning by electrophysiological methods, in particular, patch-clamp.

Keywords: biorhythms, chronobiology, meteorological conditions, patch-clamp, nuclear membrane, ion channels, LCC channels.

UDK 57.084.1:615.357:616-091.83:591.881

DOI 10.17721/1728_2748.2020.83.17-23

O. Kalmukova, PhD,

M. Dzerzhynsky, Dr. Sci.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF RATS PINEAL GLAND AND SUPRACHIASMATIC NUCLEUS OF HYPOTHALAMUS AFTER DIFFERENT REGIMES OF EXOGENOUS MELATONIN ADMINISTRATION

In modern society increase of digitalization associated with grown exceed level of light at night – a new type of pollution. Presence of light at night inhibited endogenous melatonin synthesis by pineal gland, that influence on circadian system work cycles, so organism often broken regime of wake/sleep, meals, physical activity. Also, a lack of melatonin in some certain time of day and low melatonin concentration both, were shown take some intervention in diseases development through incorrect regulation of clock-dependent genes expression. In connect with this, some latest clinical protocol in therapy or clinical trials of many different pathologies (for example, insomnia, metabolic syndrome, cardiovascular diseases, central nervous and immune system trouble, cancer, viral infection, etc.) include exogenous melatonin usage. As melatonin perform his function via endocrine and paracrine ways in variety types of cell, his application take place in wide range of doses and in different time of day (chronotherapeutic approach). Therefore, important to control state of circadian system central elements – pineal gland (main producer of endogenous melatonin) and suprachiasmatic nucleus (SCN) of hypothalamus (central pacemaker of circadian rhythm) in conditions of exogenous melatonin treatment. Thus, the main goal of our research were analysis of rats pineal gland and hypothalamic SCN morpho-functional state after different time (morning, evening and continuously with drinking water) melatonin daily administration. Melatonin was administered by gavage for 7 weeks in dose 30 mg/kg 1 h before lights-off (M ZT11, evening), or 1 h after lights-on (M ZT01, morning), or continuously with drinking water during day-night period (MW). After melatonin use only in MW group pineal gland demonstrates changes in morphology (pinealocytes nucleus had mild basophilic color) and morphometric (increased cross-sectional area of the pinealocytes nucleus in compare with control group) analysis data. Besides, some similar changes were observed in SCN: the cross-sectional area of the SCN neurons nucleus grown in case of usage each of regime melatonin administration, while morphology characteristic remains without any alteration. In general, it suggesting about having by melatonin non-inhibiting features in context of circadian system feedback loop and supposing wide potential for melatonin use with absent huge side effect on central elements of above mentioned system.

Keywords: melatonin, feedback loop, chronobiology, pinealocytes, neuron, histology, circadian system, side effect.

Introduction. Melatonin – the main signal molecule of circadian system, pineal gland hormone, that has pleiotropic effect on organism insofar as may influence at most

different cells in tissue [1]. This action mediated by both: 1) presentation in many cells melatonin's receptors (through membrane receptors 1 MT₁ and 2 types MT₂ [2],

© Kalmukova O., Dzerzhynsky M., 2020