

Р.Є.Булик

Буковинський державний медичний університет

**Ключові слова:** *c-fos*, паравентрикулярні ядра, стрес, мелатонін, епіталон.

Надійшла: 22.11.2008

Прийнята: 23.12.2008

УДК 612.826.4:612.017.2

## КОРЕКЦІЯ СТРЕС-ІНДУКОВАНИХ ЗМІН АКТИВНОСТІ ГЕНА “НАДРАННЬОЇ ВІДПОВІДІ” *c-fos* У ЛАТЕРАЛЬНИХ ВЕЛИКОКЛІТИННИХ СУБ’ЯДРАХ ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ

**Резюме.** Досліджено вплив мелатоніну і синтетичного біорегулятора епіталону з метою корекції стрес-індукованих змін активності гена “надранньої відповіді” *c-fos* у латеральних великоклітинних суб’ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів у різні проміжки доби (удень і вночі). Експресія продукту цього гена – білка *c-fos* у тварин, яких утримували за нормальних умов чергування освітлення й темряви, демонструвала чіткий циркадіанний характер (з більшим рівнем удень). За умов світлового стресу денний показник індексу вмісту *c-fos* у латеральних великоклітинних суб’ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса тварин на 33,0% нижчий, а нічний наближався до контрольних величин. Ін’єкції мелатоніну (0,5 мг/кг маси) стресованим світлом тваринам віддзеркалилися о 14.00 год підвищенням індексу вмісту білка *c-fos* у латеральних великоклітинних суб’ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса майже вдвічі порівняно з даними експерименту на стресованих щурах без уведення гормону, а також нормалізацією циркадіанної динаміки експресії досліджуваного гена. При застосуванні тетрапептиду епіталону (0,5 мкг/кг маси) виявлено збільшення індексу концентрації білка *c-fos* у структурі вночі відносно особин з епіфізарною гіпофункцією без проведення експериментальної терапії епіталоном. Удень такого ефекту препарату не зафіксовано.

**Морфологія.** – 2009. – Т. III, № 1. – С. 32-37.

© Р.Є.Булик, 2009

### **Bulyk R.Y. Correction of stress-induced changes of the activity of the gene of ultraearly response *c-fos* in the lateral large-cell subnuclei of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus.**

**Summary.** The author has studied the effect of melatonin and a synthetic bioregulator – epithalon for the purpose of correction stress-induced changes of the activity of the gene of “ultraearly response” *c-fos* in the lateral large cell subnuclei of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus at different intervals of 24-hour period (in the daytime and at night). The expression of the product of this gene – protein *c-fos* in animals kept under normal conditions of alternating illumination and darkness demonstrated a clear-cut circadian pattern (with a higher level by day). The diurnal index of the *c-fos* content in the animal lateral large cell subnuclei of the paraventricular nucleus is lower by 33,0%, under conditions of light stress, whereas the nocturnal one approximated to the control values. An injection of melatonin (0,5 mg/kg) to light-stressed animals reflected at 02.00 p.m. hundred by exceeding the index of the *c-fos* protein in the animal lateral large cell subnuclei of the paraventricular nucleus almost two fold compared to the experimental findings on stressed animals without hormone introduction, as well as by a normalization of the circadian dynamics of the expression of the gene under study. An augmentation of the index of the *c-fos* protein concentration was disclosed in the structure upon using tetrapeptide epithalon (0,5 mkg/kg) at night in relation to individuals with epiphysial hypofunction without undergoing experimental therapy with epithalon. No such effect was fixed at night.

**Key words:** *c-fos*, paraventricular nuclei, stress, melatonin, epithalon.

### **Вступ**

На даний час дослідження місця і ролі нейроендокринних структур у центральних механізмах циркадіанних ритмів є одним з актуальних питань сучасної хронофізіології (Гончарук В.Д., Баюс Р.М., 2000; Заморский И.И., Пишак В.П., 2003). Зміни тривалості основного часозадавача – фотоперіоду, як стресовий чинник, десинхронізують ритми соматичних і вісцеральних фун-

кцій, а також координацію і модуляцію механізмів адаптації організму до впливу різних чинників (Бондаренко Л.А. и соавт., 2005; Douglas A. J. et al., 2005).

У нейроендокринну відповідь при стресових реакціях залучені, насамперед, паравентрикулярні ядра гіпоталамуса, що є вегетативним центром координації функцій і складаються з низки нейронних популяцій: суб’ядер, які різняться структурно-

функціональними особливостями і характером нервових зв'язків з різними відділами нервової і нейроендокринної систем (Гениатулина М.С., Королев Ю.Н., 1996).

При вивченні стресових реакцій і дії стреслімітувальних чинників (зокрема, мелатоніну) постає важливим дослідження вказаних субпопуляцій нейронів паравентрикулярного ядра гіпоталамуса, що синтезують стрес-релізінг гормони, які ініціюють стресорні реакції організму (Ginberg A.V. et al., 2003; Reiter R.J., 2003). Одним з основних пептидів, що проявляють ефект у регуляції секреції АКТГ, є вазопресин (ВП). ВП-імунореактивна мітка виявлена здебільшого у латеральному великоклітинному суб'ядрі (лвПВЯ) (Peng Z., Bentivoglio M., 2004). Викликає зацікавленість з'ясування впливу світлового стресора на стан вказаних суб'ядер ПВЯ гіпоталамуса. При цьому важливо вивчити зміни експресії гена надранньої відповіді *c-fos* у структурі, а також проаналізувати можливості підвищення адаптації нейросекреторних клітин до пошкоджувальної дії стресового чинника.

На основі аналізу даних про амінокислотний склад пептидів шишкоподібної залози в Санкт-Петербурзькому інституті біорегуляції і геронтології ПЗВ РАМН сконструйований і синтезований епіфізарний тетрапептид епіталон. Попередні дослідження показали, що він володіє онкостатичною, антиоксидантною та геропротекторною дією (Хавинсон В.Х., Малинин В.В., 2006). Відомості, що віддзеркалюють ефекти епіталону, експресії гена *c-fos* при тривалій експозиції світлом відсутні.

#### Мета дослідження

З'ясувати вплив постійного освітлення на стан гена ранньої функціональної активності *c-fos* у суб'ядрах лвПВЯ гіпоталамуса щурів у різні проміжки доби, визначаючи інтенсивність експресії відповідного протеїну (*c-fos*) з використанням імунофлуоресцентної методики. Проаналізувати зміни активності вказаного гена при застосуванні мелатоніна та синтетичного біорегулятора епіталона на фоні дії світлового стресора.

#### Матеріали та методи

Експерименти проведені на 60 статевозрілих самцях безпорідних білих щурів масою 0,15–0,18 кг. Тварин утримували в стандартних умовах віварію при сталій температурі та вологості повітря та вільному доступі до води і їжі. Експериментальні щури розподілені на п'ять груп, кожна з яких, у свою чергу, складалася з двох підгруп (по шість тварин).

Тварини першої групи (інтактні) перебували сім діб в умовах звичайного світлового режиму (світло-темрява по 12 год, освітлення з 08.00 до 20.00 за допомогою люмінесцентних ламп, рівень освітленості в клітках із тваринами 500 лк). Щури другої групи перебували протя-

гом семи діб в умовах постійного освітлення аналогічної інтенсивності (індукція гіпофункції шишкоподібної залози). Тварини серії №3 (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). Тварини серії №4 знаходилися за умов експерименту, як і щури серії №2. 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). Тварини серії №5 знаходилися за умов експерименту, як і щури серії №2, які щоденно о 19.00 год підшкірно отримували ін'єкцію епіталона (Санкт-Петербурзький інститут біорегуляції і геронтології ПЗВ РАМН, Росія) у дозі 0,5 мкг/кг, у 0,5 мл фізіологічного розчину.

На восьму добу о 14.00 і 02.00 тварин виводили з експерименту, здійснюючи одномоментну декапітацію під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг в/о). Мозок тварин негайно вилучали і вміщували в 10 % розчин формаліну на фосфатному буфері (0,1 М, рН 7,2) на 20 год при кімнатній температурі. Після стандартної процедури зневоднення й просочення хлороформом і парафіном зразки заливали в парафін. Усі етапи експерименту проведено з дотриманням основних вимог Європейської конвенції щодо гуманного ставлення до тварин.

Для ідентифікації *c-fos* у гістологічних зрізах гіпоталамуса застосовували непрямої імунофлуоресцентний метод. Зрізи завтовшки 14 мкм спочатку депарафінували в ксилолі, потім проводили регідратацію в розчинах етанолу шести низхідних концентрацій (100-40%) і тричі по 10 хв відмивали у фосфатному буфері (0.1 М, рН 7.2).

Як первинні антитіла застосовували кролячі антитіла (IgG) до *c-fos* ("Sigma-Aldrich", США). Спочатку зрізи протягом 45 хв інкубували при 37°C у 0,3% розчині Triton X-100 ("Sigma-Aldrich", США) на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7.2) з додаванням 1% козячої сироватки. Потім на послідовні серійні зрізи наносили первинні антитіла до *c-fos* (1:1000) і протягом 24 год інкубували у вологій камері в умовах зниженої температури (4 С). Після відмивання надлишку первинних антитіл у 0,1 М фосфатному буфері зрізи інкубували 60 хв при 37°C з вторинними антитілами у розведенні 1:200. Як вторинні антитіла застосовували козячий гаммаглобулін, котрий є антитілом щодо глобулінів кролика, кон'югований із флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC; "Sigma-Aldrich", США). Після інкубації зрізи промивали фосфатним буфером (0,1 М) і вміщували в суміш гліцерину й фосфатного буфера (9:1) для подальшого дослідження за допомогою люмінесцентної мікроскопії.

Контроль специфічності зв'язування антитіл

проводили аналогічним чином, виключаючи етап інкубації з первинними антитілами до *c-fos*.

Ідентифікацію *c-fos* у нейронах гіпоталамуса і визначення вмісту цього протеїну здійснювали із застосуванням комп'ютерної системи цифрового аналізу зображення VIDAS-386 ("Kontron Elektronik", ФРН) в ультрафіолетовому спектрі. Для отримання флуоресцентного зображення використовували високоемісійний фільтр із діапазонами збудження та емісії 370–390 та 420–450 нм відповідно та спеціалізований об'єктив із широкою апертурою. Зображення за допомогою 8-бітової CCD-камери COHU-4922 ("COHU Inc.", США) вводили в комп'ютерну систему аналізу зображень VIDAS-386. При цьому унеможлилювали ефект "вигорання" препарату, пов'язаний із поступовим руйнуванням молекул FITC під впливом тривалого ультрафіолетового опромінювання. Уведене імунофлуоресцентне зображення оцифровували за денситометричною шкалою з 256 градаціями сірого кольору. Аналіз зображення проводився в автоматичному режимі за допомогою пакета прикладних програм VIDAS-2.5 ("Kontron Elektronik", ФРН). Програмно ідентифікувалися ділянки препаратів, у котрих інтенсивність флуоресценції вірогідно перевищувала фонові значення (притаманні так званій неспецифічній флуоресценції). Вимірювали площу таких ділянок та повну площу перерізу суб'ядер нейронів ПВЯ, котрі вміщували імунопозитивний матеріал ( $S_i$  та  $S_{\Sigma}$  відповідно,  $\mu\text{км}^2$ ). З урахуванням інтенсивності флуоресценції в імунопозитивних ділянках та інтенсивності флуоресценції фону ( $D_i$  та  $D_0$ ) обчислювали показники, які характеризують концентрацію *c-fos* та вміст цього протеїну в ядрах імунопозитивних клітин,  $-K_i = \left| \lg \left( \frac{D_i}{D_0} \right) \right| \cdot ma \cdot C_i = K_i \cdot S_i$  (умовні одиниці – у. о.) відповідно. Оскільки дані показники є відносними, а не абсолютними величинами, далі ми іменуватимемо їх індексами концентрації та вмісту *c-fos* в імунопозитивних клітинах.

Топографічну приналежність імунопозитивних нейронів до окремих структур гіпоталамуса картували згідно зі стереотаксичним атласом мозку щура (Paxinos G. D., Watson C. C., 1985).

Отримані експериментальні дані обробляли з використанням пакета прикладних і статистичних програм VIDAS-2.5 ("Kontron Elektronik", ФРН) і EXCEL-2003 ("Microsoft Corp.", США). Для вибірок усіх показників розраховували значення середнього арифметичного, середньоквадратичного відхилення та похибки середнього. Вибірki імунопозитивних клітин лВПВЯ, у котрих вимірювали  $S_i$  та  $S_{\Sigma}$  та розраховували значення  $K_i$  та  $C_i$  у різних групах експериментальних тварин, складалися зі 120–153 одиниць.

Окрім того, ми розраховували щільність локалізації *c-fos*-імунопозитивних нейронів у межах досліджених зрізів даного ядра. Для цього

попередньо визначали кількість таких клітин у декількох (чотирьох-семи для кожної тварини) випадково вибраних полях зору і розраховували середню кількість подібних нейронів на  $1 \text{ мм}^2$  площі зрізу. Вірогідність відмінностей значень у дослідних і контрольних групах тварин визначали за критерієм Стьюдента (*t*). Вірогідними вважали значення, для яких  $p < 0,05$ .

#### Результати та їх обговорення

Шляхом ідентифікації продукту експресії гена: "надранньої відповіді" *c-fos* імунофлуоресцентним методом у суб'ядрах лВПВЯ гіпоталамуса інтактних тварин виявлено вірогідне зниження площі імунопозитивних ділянок структур вночі на 19,4% ( $p < 0,05$ ) порівняно з денними вимірами. Середні значення площ таких імунопозитивних ділянок суб'ядер дещо варіювали і в підгрупі шурів, які перебували в умовах світлової стимуляції, в якій зразки лВПВЯ для дослідження відбирали о 14.00 год та о 02.00 год, однак міжгрупові різниці не досягали рівня вірогідності.

Усереднені для всієї групи в цілому (без урахування періоду доби) величини площі перерізу суб'ядер нейронів лВПВЯ у тварин, котрим моделювали епіфізарну гіпофункцію вірогідно більші (на 7,8%), ніж відповідні значення в інтактній групі. Різні й циркадіанна динаміка варіацій площі перерізу суб'ядер. В інтактних шурів площа о 02.00 год на 13,5% менша, ніж о 14.00 год. У групі, тварин, які перебували в умовах постійного освітлення середні значення площі перерізу суб'ядер вночі і вдень майже однакові. Парним порівнянням відповідних величин, виміряних у різних серіях о 14.00 год виявлено, що площа перерізу суб'ядра в стресованих світлом шурів майже співпадає з тією, що спостерігали в фізіологічних умовах. Аналізуючи значення в зразках, відібраних вночі, при гіпофункції шишкоподібної залози показники вірогідно більші (на 12,3%) щодо інтактної групи (табл. 1).

Моделювання епіфізарної гіпофункції суттєво вплинуло на концентрацію білка *c-fos* в суб'ядрах нейронів лВПВЯ. В умовах світлового стресу індекс концентрації *c-fos* удень менший на 29,4%, а вночі – на 16,5% стосовно аналогічних величин в інтактній групі.

За таких умов експерименту індекс вмісту білка *c-fos* у суб'ядрах нейронів лВПВЯ в інтактній групі о 02.00 год вірогідно менший (на 44,5%,  $p < 0,01$ ), ніж удень. В особин, які перебували в умовах світлового стресу, денний показник індексу вмісту *c-fos* на 33,0% нижчий від такого в інтактній групі, а нічний – наближався до значення у групі порівняння. Подібною виявилась і добова динаміка даного параметра, однак вірогідної різниці між денним і нічним рівнями в серії стресованих світлом тварин не відмічено (табл. 1).

Щодо інтегральної щільності матеріалу, імунореактивного до *c-fos*, у тканині лВПВЯ цей параметр у досліджуваних підгрупах коливався від

120 до 204 нейронів на 1 мм<sup>2</sup> площі зрізу. Відмітимо, що в інтактних щурів більші значення щільності локалізації *c-fos*-позитивних нейронів у лВПВЯ спостерігали вночі, а в групі тварин, які перебували в гіперліюмінізованих умовах циркадіанна динаміка вказаного показника набувала зворотного характеру – щільність більша

вдень. Визначаючи щільність вказаних нейронів, нами не встановлено міжгрупових відмінностей в експериментальних серіях. Проте при світловій стимуляції вночі щільність розташування *c-fos*-позитивних нейронів вірогідно нижча від такої в інтактних тварин в аналогічні проміжки доби (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристика *c-fos*-імунопозитивних нейронів у латеральному великоклітинному суб'ядрі паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів за різної тривалості фотоперіоду та при експериментальній терапії ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ )

Серії експериментальних тварин	Площа матеріалу, імунореактивного до <i>c-fos</i> , (мкм <sup>2</sup> )	Концентрація білка <i>c-fos</i> в нейроні, O <sub>1Ф</sub>	Вміст білка <i>c-fos</i> у нейроні, O <sub>1Ф</sub>	Щільність <i>c-fos</i> -імунопозитивних нейронів (мм <sup>-2</sup> )	Сумарний вміст білка <i>c-fos</i> у структурі, O <sub>1Ф</sub> /(мм <sup>-2</sup> )
Інтактні, 14.00 год	130,880±9,933	0,3300 ±0,0229	44,400±5,132	190±39	8436±1731
Інтактні, 02.00 год	105,530±4,969 p=0,046	0,2360 ±0,0105 p=0,004	24,650±1,599 p=0,004	204±27 p=0,774	5029±665 p=0,096
Постійне освітлення, 14.00 год	129,270±10,461 p=0,913	0,2330±0,0198 p=0,009	29,730±3,474 p=0,039	127±23 p=0,194	3775±684 p=0,031
Постійне освітлення, 02.00 год	124,250±7,683 p=0,068 p <sub>1</sub> =0,707	0,1970±0,0128 p=0,040 p <sub>1</sub> =0,158	23,430±1,359 p=0,574 p <sub>1</sub> =0,122	120±25 p=0,046 p <sub>1</sub> =0,841	2811±586 p=0,031 p <sub>1</sub> =0,310
Постійне освітлення + мелатонін, 14.00 год	124,480±11,992 p <sub>2</sub> =0,770	0,4670±0,0212 p <sub>2</sub> <0,001	57,110±5,548 p <sub>2</sub> =0,002	120±22 p <sub>2</sub> =0,830	6854±1257 p <sub>2</sub> =0,051
Постійне освітлення + мелатонін, 02.00 год	111,570± 15,883 p <sub>2</sub> =0,489 p <sub>1</sub> =0,531	0,2790±0,0110 p <sub>2</sub> <0,001 p <sub>1</sub> <0,001	30,960±4,317 p <sub>2</sub> =0,144 p <sub>1</sub> =0,004	132±12 p <sub>2</sub> =0,674 p <sub>1</sub> =0,642	4087±372 p <sub>2</sub> =0,096 p <sub>1</sub> =0,061
Постійне освітлення + епіталон, 14.00 год	137,740±7,251 p <sub>2</sub> =0,521	0,2550±0,0061 p <sub>2</sub> =0,313	36,310±2,229 p <sub>2</sub> =0,142	92±6 p <sub>2</sub> =0,172	3341±218 p <sub>2</sub> =0,559
Постійне освітлення + епіталон, 02.00 год	106,330±8,103 p <sub>2</sub> =0,140 p <sub>1</sub> =0,016	0,2580±0,0152 p <sub>2</sub> =0,012 p <sub>1</sub> =0,858	23,690±1,652 p <sub>2</sub> =0,906 p <sub>1</sub> =0,001	180±37 p <sub>2</sub> =0,209 p <sub>1</sub> =0,041	4265±877 p <sub>2</sub> =0,198 p <sub>1</sub> =0,331

Примітка: p – вірогідні зміни щодо параметрів тварин, які перебували в умовах стандартного фотоперіоду того ж часового інтервалу; p<sub>1</sub> – щодо параметрів тварин попереднього часового інтервалу в межах серії; p<sub>2</sub> – щодо тварин, яких піддали дії постійного освітлення.

Важливий вплив на індекс інтегральної щільності *c-fos* у тканині лВПВЯ мали зміни концентрації даного білка та індексу його вмісту в суб'ядрах нейронів. Індекс сумарної щільності білка *c-fos* у щурів, які знаходилися в умовах світлової стимуляції, вдень на 55,3%, а вночі – на 44,1% нижчий, ніж аналогічне значення в інтактній групі (табл. 1).

Уведення щурам, які знаходилися за стандартного світлового режиму розчинника (1,0 мл

0,9% розчину етанолу на фізіологічному розчині натрію хлориду) впродовж семи діб суттєво не змінювали характеристику *c-fos*-імунопозитивних нейронів у суб'ядрі лВПВЯ гіпоталамуса.

Ін'єкції мелатоніну (0,5 мг/кг маси тіла) тваринам, які зазнали дії постійного освітлення, нормалізувало циркадіанний ритм показника площі матеріалу, імунореактивного до *c-fos*. За світлового стресу подібною до мелатоніну виявилася дія епіталону (0,5 мкг/кг маси тіла тварини), проте

більш вираженою. У цій серії тварин удень площа матеріалу, імунореактивного до *c-fos* у суб'ядрах лВПВЯ гіпоталамуса, сягала  $137,74 \pm 7,251$  мкм<sup>2</sup>, вірогідно відрізняючись від групи щурів, зразки в якій відбирали в нічний проміжок, коли вона складала  $106,33 \pm 8,103$  мкм<sup>2</sup> (табл. 1).

При застосуванні мелатоніну на фоні постійного освітлення виявлено різке зростання ( $0,467 \pm 0,0212$  O<sub>1ф</sub>) концентрації білка в суб'ядрах лВПВЯ гіпоталамуса в денний та менш виражене ( $0,279 \pm 0,0110$  O<sub>1ф</sub>) в нічний проміжок (табл. 1). Щодо ефектів епіталону, то вірогідної різниці у циркадіанному аспекті при його застосуванні не спостерігали. При цьому концентрація білка вдень вища на 9,4%, а вночі на 30,9% відносно показників особин, яким моделювали гіпофункцію епіфіза мозку і корегувальну терапію не проводили (рис. 1).

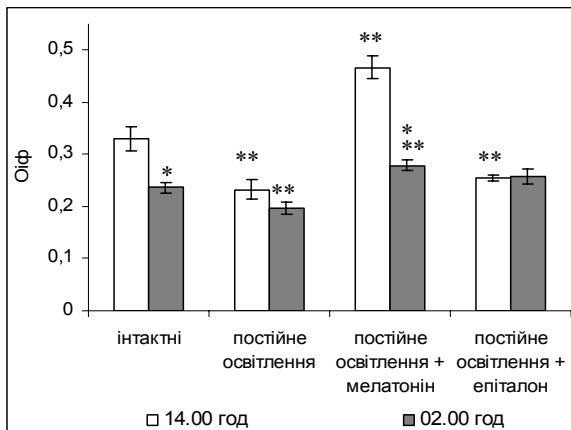


Рис. 1. Вплив препаратів (мелатоніну й епіталону) за тривалого освітлення на індекс концентрації білка *c-fos* у нейроні лВПВЯ гіпоталамуса тварин.

Примітка: вірогідні ( $p < 0,05$ ) зміни щодо параметрів тієї ж серії тварин попереднього часового інтервалу (\*); вірогідні ( $p < 0,05$ ) зміни щодо параметрів інтактних тварин того ж часового інтервалу (\*\*).

Ін'єкції хронобіотика тваринам віддзеркалилися і на добовій динаміці індексу вмісту білка *c-fos* у суб'ядрах лВПВЯ. О 14.00 год показник майже вдвічі (192,1%) перевищував дані експерименту на стресованих тваринах без введення гормону, наближаючи його до норми (табл. 1). Крім того, він вірогідно вищий і порівняно з таким у зрізах, узятих о 02.00 год. При застосуванні тетрапептиду 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 зареєстровано (табл. 1).

Уведення мелатоніну тваринам з гіпофункцією епіфіза мозку відновлювало добову ритмічність, однак о 14.00 год викликало незначне зниження (на 5,51%), а о 02.00 год помірно під-

вищення (на 10,0%) інтегральної щільності матеріалу, імунореактивного до *c-fos*, порівняно з стресованими тваринами без корекції. Невірогідні і циркадіанні відмінності між показниками зразків цієї серії. При корекції епіталоном вдень щільність нейронів суб'ядер лВПВЯ гіпоталамуса на 95,6% нижча, ніж вночі, а також майже вдвічі від параметра інтактних тварин в аналогічний добовий інтервал ( $p < 0,001$ ). Також відзначали і міжгрупові відмінності при застосуванні тетрапептиду (табл. 1).

Помітні ефекти мелатоніну щодо корекції порушень інтегральної щільності *c-Fos* у суб'ядрах лВПВЯ, спричинених гіпофункцією епіфіза мозку. Після тижневого застосування індолу вдень індекс становив  $6854 \pm 1257$  O<sub>1ф</sub>/мм<sup>2</sup>, а вночі –  $4087 \pm 372$  O<sub>1ф</sub>/мм<sup>2</sup>. Таким чином мелатонін на фоні постійного освітлення відновлював індекси як о 14.00, так і о 02.00 год відносно таких в інтактних тварин (рис. 2).

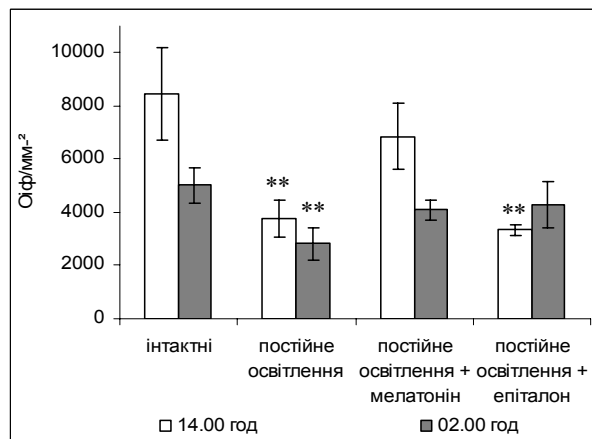


Рис. 2. Ефекти мелатоніну та епіталону на добові коливання індексу сумарного вмісту білка *c-fos* у нейронах лВПВЯ гіпоталамуса щурів за тривалого світлового режиму.

Щодо епіталону, слід відмітити, що введення тетрапептиду не тільки не відновлювало зміни досліджуваного індексу, викликані перебуванням щурів у гіперліюмінізованих умовах, але і призводило до інверсії циркадіанної ритмічності вказаного показника (рис. 2). Зокрема, на відміну від групи інтактних тварин, при денному вимірюванні індексу інтегральної щільності *c-fos* у суб'ядрах лВПВЯ гіпоталамуса знижувався на 60,4%.

## Висновки

1. Аналізуючи добову експресію гена ранньої функціональної активності *c-fos* у суб'ядрах лВПВЯ гіпоталамуса, відмічено її вірогідне зростання у денні години. 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.

2. Ін'єкції мелатоніну (0,5 мг/кг маси) стресованим світлом тваринам віддзеркалилися о

14.00 год перевищенням індексу вмісту білка *c-fos* у суб'ядрах лВПВЯ майже вдвічі порівняно з даними експерименту на стресованих тваринах без уведення гормону, а також нормалізацією циркадианної динаміки експресії досліджуваного гена.

3. При застосуванні тетрапептиду епіталону (0,5 мг/кг маси) виявлено зростання індексу концентрації білка *c-fos* у структурі вночі

відносно особин з епіфізарною гіпофункцією без проведення експериментальної терапії епіталоном. Вдень такого ефекту препарату не зафіксовано.

**Перспективи подальших досліджень** у даному напрямку дозволять глибше пізнати місце і роль суб'ядер лВПВЯ гіпоталамуса в механізмах формування циркадианних ритмів головного мозку ссавців.

### Літературні джерела

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.

Гениатулина М. С. Ультраструктура субпопуляций нейронов паравентрикулярных ядер гипоталамуса при стрессе и стресс-лимитирующем действии импульсного электрического тока / М. С. Гениатулина, Ю. Н. Королев // Морфология. - 1996. - Т. 110, № 4. - С. 37-41.

Гончарук В. Д. Функционально-морфологический статус супрахиазматического ядра гипоталамуса при первичной гипертензии / В. Д. Гончарук, Р. М. Баюс // Кардиология. - 2000. - Т. 40, № 4. - С. 36-39.

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.

Хавинсон В. Х. Механизмы адаптогенного действия пептидных биорегуляторов при старении / В. Х. Хавинсон, В. В. Малинин // Бук. мед. вісник. - 2006. - Т. 10, № 4. - С. 12-14.

Acute glucocorticoid pretreatment suppresses stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormone secretion and expression of corticotrophin-releasing hormone hnRNA but does not affect *c-fos*-mRNA or *fos* protein expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus / A. B. Ginsberg, S. Campeau, H. E. Day, R. L. Spencer // J. neuroendocrinol. - 2003. - Vol. 15, № 11. - P. 1075-1083.

Paxinos G. D. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. D. Paxinos, C.C. Watson. - New York : Acad. press., 1985.

Peng Z. The thalamic paraventricular nucleus relays information from the suprachiasmatic nucleus to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat at the light and electron microscopic levels / Z. Peng, M. Bentivoglio // J. neurocytol. - 2004. - Vol. 33, № 11. - P. 101-116.

Reduced activity of the noradrenergic system in the paraventricular nucleus at the end of pregnancy: Implications for stress hyporesponsiveness / A. J. Douglas, S. L. Meddle, N. Toshi [et al.] // J. neuroendocrinol. - 2005. - Vol. 17, № 1. - P. 40-48.

Reiter R. J. Melatonin: clinical relevance / R. J. Reiter // Best pract. res. clin. endocrinol. metab. - 2003. - Vol. 17, № 2. - P. 273-285.

**Булык Р.Е. Коррекция стресс-индуцированных изменений активности гена “раннего ответа” *c-fos* в латеральных крупноклеточных субъядрах паравентрикулярного ядра гипоталамуса крыс.**

**Резюме.** Исследовано влияние мелатонина и синтетического биорегулятора эпиталона с целью коррекции стресс-индуцированных изменений активности гена “раннего ответа” *c-fos* в латеральных крупноклеточных субъядрах паравентрикулярного ядра гипоталамуса крыс в разные промежутки суток (днём и ночью). Экспрессия продукта этого гена-белка *c-fos* у животных, содержащихся в нормальных условиях чередования освещения и темноты, демонстрировала чёткий циркадианный характер (с большим уровнем днём). В условиях светового стресса дневной показатель индекса содержания *c-fos* в латеральных крупноклеточных субъядрах паравентрикулярного ядра гипоталамуса животных на 33,0% ниже, а ночной – приближался к контрольным величинам. Инъекции мелатонина (0,5 мг/кг массы) стрессированным светом животным проявились в 14.00 ч превышением индекса содержания белка *c-fos* в латеральных крупноклеточных субъядрах паравентрикулярного ядра почти вдвое сравнительно с данными эксперимента на стрессированных животных без введения гормона, а также нормализацией циркадианной динамики экспрессии исследованного гена. При использовании тетрапептида эпиталона (0,5 мг/кг массы) выявлено увеличение индекса концентрации белка *c-fos* в структуре ночью относительно особей с эпифизарной гипофункцией без проведения экспериментальной терапии эпиталоном. Днём такого эффекта препарата не зафиксировано.

**Ключевые слова:** *c-fos*, паравентрикулярные ядра, стресс, мелатонин, эпиталон.