

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 612.826.4:612.017.2

©Р. Є. Булик

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

ХАРАКТЕРИСТИКА ЕФЕКТІВ МЕЛАТОНІНУ НА СТАН ГЕНА РАННЬОЇ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ C-FOS У СУБ'ЯДРАХ ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНИХ ЯДЕР ГІПОТАЛАМУСА СТРЕСОВАНИХ СВІТЛОМ ЩУРІВ

ХАРАКТЕРИСТИКА ЕФЕКТІВ МЕЛАТОНІНУ НА СТАН ГЕНА РАННЬОЇ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ c-fos У СУБ'ЯДРАХ ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНИХ ЯДЕР ГІПОТАЛАМУСА СТРЕСОВАНИХ СВІТЛОМ ЩУРІВ – Досліджено вплив мелатоніну на стан гена ранньої функціональної активності c-fos у латеральних великоклітинних суб'ядрах паравентрикулярного ядра (лвПВЯ) гіпоталамуса щурів у різні проміжки доби (вдень і вночі). Експресія продукту цього гена – білка c-Fos – у тварин, котрі утримувалися в нормальних умовах чергування освітлення та темряви, демонструвала досить чіткий циркадіанний характер. Світловий стрес призводить до вираженого десинхронізму. Ін'єкції мелатоніну на тлі постійного освітлення нормалізували добовий ритм показника площі матеріалу, імунореактивного до c-Fos у суб'ядрах ПВЯ гіпоталамуса щурів.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТОВ МЕЛАТОНИНА НА СОСТОЯНИЕ ГЕНА РАННЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ c-fos В СУБЪЯДРАХ ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА СТРЕССИРОВАННЫХ СВЕТОМ КРЫС – Исследовано влияние мелатонина на состояние гена ранней функциональной активности c-fos в латеральных крупноклеточных субъдрах паравентрикулярного ядра (лкПВЯ) гипоталамуса крыс в различные промежутки суток (днем и ночью). Экспрессия продукта этого гена – белка c-Fos – у животных, которых содержали в нормальных условиях чередования освещения и темноты, демонстрировала довольно четкий циркадианный характер. Световой стресс приводит к выраженному десинхронизму. Инъекции мелатонина на фоне постоянного освещения нормализовали суточный ритм показателя площади материала, иммунореактивного к c-Fos в субъдрах ПВЯ гипоталамуса крыс.

A CHARACTERISTIC OF MELATONIN EFFECTS ON THE CONDITION OF THE GENE OF AN EARLY FUNCTIONAL ACTIVITY c-fos IN THE SUBNUCLEI OF THE PARAVENTRICULAR NUCLEI OF THE HYPOTHALAMUS OF STRESSSED WITH LIGHT RATS – The influence of melatonin on the condition of the gene of an early functional activity-c-fos in the lateral magnocellular subnuclei of the paraventricular nucleus (l-mPVN) of the rat's hypothalamus during different spells of the circadian period (in the day-time and at night) has been studied. The expression of the product of this gene-c-Fos protein – in animals kept under normal conditions of alternating lighting and darkness demonstrated a rather clear cut circadian pattern. A light stress results in marked desynchronization. Melatonin injections under light stress normalized the circadian rhythm of the index of the area of the material, immunoreactive to c-Fos in the PVN subnuclei of the rat hypothalamus.

Ключові слова: ген c-fos, імуноспецифічний білок c-Fos, паравентрикулярне ядро гіпоталамуса, постійне освітлення, мелатонін.

Ключевые слова: ген c-fos, иммуноспецифический белок c-Fos, паравентрикулярное ядро гипоталамуса, постоянное освещение, мелатонин.

Key words: c-fos gene, immunospecific c-Fos protein, hypothalamic paraventricular nuclei, permanent lighting, melatonin.

ВСТУП Вегетативним центром координації функцій є паравентрикулярні ядра (ПВЯ) гіпоталамуса, що складаються з низки нейронних популяцій – суб'ядер, які різняться структурно-функціональними особливостями і характером нервових зв'язків із різними відділами нервової і нейроендокринної систем [3, 5].

Для вивчення стресових реакцій і дії стрес-лімітвальних чинників (зокрема мелатоніну) постає важливим дослідження вказаних субпопуляцій нейронів ПВЯ гіпоталамуса, що синтезують стрес-релізінг-гормони, які ініціюють стресорні реакції організму [4, 10]. Основними пептидами, що проявляють сумісний ефект у регуляції секреції АКТГ, є кортикотропін-релізінг-фактор (КРФ) і вазопресин (ВП). ВП-імунореактивна мітка виявлена, здебільшого, в латеральному великоклітинному суб'ядрі паравентрикулярного ядра (лвПВЯ) гіпоталамуса. Викликає зацікавленість з'ясування впливу світлового стресора на стан вказаних суб'ядер ПВЯ. При цьому важливо вивчити зміни морфофункціональної активності й рівень експресії гена надранньої відповіді c-fos у структурах, а також проаналізувати можливості підвищення адаптації нейросекреторних клітин до пошкоджувальної дії стресового чинника шляхом уведення екзогенного мелатоніну.

Найнадійнішим і найстабільнішим синхронізуювальним чинником для гомойотермних тварин, включаючи людину, є фотоперіод [2, 8]. Порушення світлового режиму (тривале освітлення) пригнічує синтез ендогенного мелатоніну та викликає в ПВЯ негайні зміни експресії гена c-fos [6, 7, 11]. Посилення його експресії інтенсифікує синтез відповідного імуноспецифічного білка c-Fos [5, 9]. Згаданий пептид бере участь у механізмах синхронізації даної активності зовнішніми циклічними впливами, зокрема циркадіанними, пов'язаними з чергуванням світла й темряви [1, 4].

Водночас відомості щодо впливу хронобіотика мелатоніну на діяльність лвПВЯ гіпоталамуса, залучених у формування механізмів циркадіанних ритмів, за модифікацій фотоперіоду в доступній літературі відсутні.

Метою дослідження стало з'ясувати вплив мелатоніну на активність гена “надранньої відповіді” c-fos у лвПВЯ гіпоталамуса за тривалого освітлення.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Експерименти проведені на 36 статевозрілих безпородних білих щурах-самцях масою 150–180 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію при сталих температурі й вологості повітря та вільному доступі до води і їжі. Експериментальних щурів поділили на три групи, 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, LD, освітлення з 08⁰⁰ до 20⁰⁰ за допомогою люмінесцентних ламп, рівень освітленості в клітках із тваринами 500 лк). Щури другої групи перебували протягом семи діб в умовах постійного освітлення аналогічної інтенсивності (LL, індукція епіфізарної гіпофункції). Тварини третьої групи знаходилися за умов експерименту, як і щури другої групи, їм щоденно о 19⁰⁰ внутрішньочеревно 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).

Після закінчення семиденного періоду наступного дня о 14⁰⁰ і 02⁰⁰ тварин виводили з експерименту, здійснюючи одномоментну декапітацію під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг, внутрішньочеревно). 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 про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

Для ідентифікації c-Fos у гістологічних зрізах гіпоталамуса застосовували непрямий імунофлуоресцентний метод. Як первинні антитіла застосовували кролячі антитіла (імуноглобулін – IGG) до c-Fos (“Sigma-Aldrich”, США). Як вторинні антитіла застосовували козячий гамма-глобулін, котрий є антитілом щодо глобулінів кролика, кон’югований із флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC; “Sigma-Aldrich”, США). Топографічну приналежність імунопозитивних нейронів до окремих структур гіпоталамуса картували згідно із стереотаксичним атласом мозку щура.

Отримані експериментальні дані обробляли з використанням пакета прикладних і статистичних програм VIDAS-2.5 (“Kontron Elektronik”, Німеччина) і EXCEL-2003 (“Microsoft Corp.”, США). Вірогідність відмінностей значень у дослідних і контрольних групах тварин визначали за t-критерієм Стьюдента. Вірогідними вважали значення для яких $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Шляхом ідентифікації продукту експресії гена “надранньої відповіді” c-fos імунофлуоресцентним методом у 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 підгрупах щурів, які перебували в умовах світлової стимуляції, в яких зразки лВПВЯ для дослідження відбирали о 14⁰⁰ та о 02⁰⁰, 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 світловий стрес вірогідно більші (на 7,8 %), ніж відповідні значення в інтактній групі. Різна й циркадіанна дина-

міка варіацій площі перерізу суб’ядер. В інтактних щурів площа о 02⁰⁰ на 13,5 % менша, ніж о 14⁰⁰. У групі тварин, які перебували в умовах постійного освітлення, середні значення площі перерізу суб’ядер вночі й вдень майже однакові. Попарним порівнянням відповідних величин, виміряних у різних серіях о 14⁰⁰ виявлено, що площа перерізу суб’ядра в стресованих світлом щурів – майже співпадає з тією, що спостерігали в фізіологічних умовах. Аналізуючи значення в зразках, відібраних вночі, при гіпо-, світловому стресі показники вірогідно вищі (на 16,1%) щодо інтактної групи.

В умовах світлового стресу індекс концентрації білка c-Fos вдень менший на 29,4 %, а вночі – на 16,5 % стосовно аналогічних величин в інтактній групі. У тварин, які перебували за стандартного світлового режиму і при світловій депривації, індекс концентрації білка c-Fos вдень, вірогідно вищий ($p < 0,01$), ніж аналогічне значення вночі. В інтактній групі нічна величина становила в середньому тільки 71,5 % денного показника. При цьому в щурів, яких піддали постійному освітленню, денні та нічні величини індексу концентрації c-Fos вірогідно не різнилися між собою.

За таких умов експерименту індекс вмісту білка c-Fos у суб’ядрах нейронів лВПВЯ в інтактній групі о 02⁰⁰ 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 вказаній групі порівняння.

Щодо інтегральної щільності матеріалу, імунореактивного до c-Fos, у тканині лВПВЯ цей параметр у досліджуваних підгрупах коливався від 120 до 204 нейронів на 1 мм² 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 оборотного характеру – щільність більша вдень.

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.).

Ін’єкції мелатоніну (0,5 мг/кг маси тіла) тваринам, які зазнали дії постійного освітлення, нормалізували циркадіанний ритм показника площі матеріалу, імунореактивного до c-Fos. На тлі постійного освітлення гормон призвів до різкого зростання ($(0,467 \pm 0,0212) O_{\text{ф}}$) концентрації білка в суб’ядрах лВПВЯ гіпоталамуса в денний та менш вираженого ($(0,279 \pm 0,0110) O_{\text{ф}}$) у нічний проміжки (табл.).

Ін’єкції хронобіотика тваринам віддзеркалилися і на добовій динаміці індексу вмісту білка c-Fos у суб’ядрах лВПВЯ (табл.). Зокрема, о 14⁰⁰ показник майже вдвічі (192,1 %) перевищував дані експерименту на стресованих тваринах без уведення гормону, наближаючи його до норми (табл.). Крім того, він вірогідно вищий, порівняно з таким у зрізах, узятих о 02⁰⁰.

Уведення гормону тваринам з гіпофункцією епіфізи відновлювало добову ритмічність, однак о 14⁰⁰ викли-

Таблиця. Вплив мелатоніну на стан с-Fos-імунопозитивних нейронів у латеральному великоклітинному суб'ядрі паравентрикулярного ядра гіпоталамуса стресованих щурів ($\bar{x} \pm S_x$)

Серії експериментальних тварин	Площа матеріалу, імунореактивного до с-Fos, мкм ²	Концентрація білка с-Fos в нейроні, O _{юф}	Вміст білка с-Fos у нейроні, O _{юф}	Щільність с-Fos - імунопозитивних нейронів, мм ²	Сумарний вміст білка с-Fos у структурі, O _{юф} /мм ²
Інтактні, 14 ⁰⁰	130,88±9,933	0,330±0,0229	44,40±5,132	190±39	8436±1731
Інтактні, 02 ⁰⁰	105,53±4,969 p=0,046	0,236±0,0105 p=0,004	24,65±1,599 p=0,004	204±27 p=0,774	5029±665 p=0,096
Постійне освітлення, 14 ⁰⁰	129,27±10,461 p=0,913	0,233±0,0198 p=0,009	29,73±3,474 p=0,039	127±23 p=0,194	3775±684 p=0,031
Постійне освітлення, 02 ⁰⁰	124,25±7,683 p=0,068 p ₁ =0,707	0,197±0,0128 p=0,040 p ₁ =0,158	23,43±1,359 p=0,574 p ₁ =0,122	120±25 p=0,046 p ₁ =0,841	2811±586 p=0,031 p ₁ =0,310
Постійне освітлення + мелатонін, 14 ⁰⁰	124,48±11,992 p ₂ =0,770	0,467±0,0212 p ₂ <0,001	57,11±5,548 p ₂ =0,002	120±22 p ₂ =0,830	6854±1257 p ₂ =0,051
Постійне освітлення + мелатонін, 02 ⁰⁰	111,57±15,883 p ₁ =0,531 p ₂ =0,489	0,279±0,0110 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	30,96±4,317 p ₁ =0,004 p ₂ =0,144	132±12 p ₁ =0,642 p ₂ =0,674	4087±372 p ₁ =0,061 p ₂ =0,096

Примітки: 1. p – вірогідні зміни щодо параметрів тварин, які перебували в умовах стандартного фотоперіоду того ж часового інтервалу;

2. p₁ – щодо параметрів тварин попереднього часового інтервалу в межах серії;

3. p₂ – щодо тварин, яких піддали дії постійного освітлення.

кало зниження (на 5,51 %), а о 02⁰⁰ помірно підвищення (на 10,0 %) інтегральної щільності матеріалу, імунореактивного до с-Fos, порівняно зі стресованими тваринами без корекції (табл.). Помітні ефекти мелатоніну щодо корекції порушень інтегральної щільності с-Fos у суб'ядрах лвПВЯ, спричинених світловою стимуляцією. Після тижневого застосування індолю вдень індекс становив (6854±1257) O_{юф}/мм², а вночі – (4087±372) O_{юф}/мм². Таким чином, мелатонін на тлі постійного освітлення відновлював індекси як о 14⁰⁰, так і о 02⁰⁰ відносно таких в інтактних тварин.

ВИСНОВКИ 1. Враховуючи наведені результати добової експресії гена ранньої функціональної активності с-fos у латеральних великоклітинних суб'ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса, відмітимо її вірогідне зростання у денні години. В особин, які перебували в умовах світлового стресу, денний показник індексу вмісту с-Fos на 33,0 % нижчий, а в нічний – наближався до контрольних величин за збереженої добової динаміки.

2. Ін'єкції мелатоніну (0,5 мг/кг маси) стресованим світлом тваринам віддзеркалилися на добовій динаміці індексу вмісту білка с-Fos у суб'ядрах лвПВЯ. Зокрема, о 14⁰⁰ показник майже вдвічі перевищував дані експерименту на стресованих тваринах без уведення гормону, наближаючи його до норми.

Перспективи подальших досліджень У подальшому планується провести ультрамікроскопічні, морфометричні та імуногістохімічні дослідження суб'ядер ПВЯ гіпоталамуса за зміненого фотоперіоду з метою глибшого розуміння місця їх ролі у механізмах циркадіанних ритмів головного мозку щурів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Анисимов В. Н. Мелатонін: перспективи применения для профилактики рака и преждевременного старения /

В. Н. Анисимов // Вестник восстановительной медицины. – 2007. – №1 (19). – С. 4–7.

2. Бондаренко Л. А. Влияние постоянного освещения на суточный ритм мелатонина и структуру пинеальной железы у кроликов / Л. А. Бондаренко, Г. И. Губина-Вакулик, Н. Н. Сотник // Пробл. эндокринной патологии. – 2005. – № 4. – С. 38–45.

3. 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.

4. 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.

5. Коррекция иммунноэндокринных нарушений при экспериментальном сахарном диабете введением гипоталамических нейропептидов / Ю. М. Колесник, А. В. Абрамов, В. А. Жулинский [и др.] // Клін. та експерим. патол. – 2006. – Т. 3, № 2. – С. 120–123.

6. Arendt J. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects / J. Arendt // J. Biol. Rhythms. – 2005. – Vol. 20. – P. 291–303.

7. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance / C. Ekmekcioglu // Biomed. Pharmacother. – 2006. – Vol. 60, № 3. – P. 97–108.

8. Decker M. J. Paradoxical sleep suppresses immediate early gene expression in the rodent suprachiasmatic nuclei / M. J. Decker, D. B. Rye, S. Y. Lee // Front. Neurol. – 2010. – Vol. 22. – № 1. – P. 122.

9. Golombek D. A. Neurochemistry of mammalian entrainment: Signal transduction pathways in the suprachiasmatic nuclei / D. A. Golombek, G. A. Ferreyra, M. E. Katz // Biol. Rhythm Res. – 2000. – Vol. 31, № 1. – P. 56–70.

10. Reiter R. J. The photoperiod, circadian regulation and chronodisruption: the requisite interplay between the suprachiasmatic nuclei and the pineal and gut melatonin / R. J. Reiter, S. Rosales-Corral, A. Coto-Montes // J. Physiol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 62, № 3. – P. 269–274.

11. Schwartz W. J. Circadian rhythms: a tale of two nuclei / W. J. Schwartz // Curr. Biol. – 2009. – Vol. 19, № 11. – P. 460–462.

Отримано 29.08.12