

УДК 612.826.4:612.017.2

Р.Є. Булик

ЕФЕКТИ ЕПІТАЛОНУ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНА „НАДРАННЬОЇ ВІДПОВІДІ” *c-fos* У СУБ’ЯДРАХ ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЗА УМОВ ПОСТІЙНОГО ОСВІТЛЕННЯ

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Резюме. Досліджено вплив епіталону на стан гена ранньої функціональної активності *c-fos* у суб’ядрах паравентрикулярного ядра (ПВЯ) 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 десинхронозу. На фоні постійного освітлення синтетичний

тетрапептид епіталон (0,5 мкг/кг) о 14.00 год спричинив вірогідне зниження (на 10,0 %) концентрації імуноспецифічного білка *c-Fos*, а о 02.00 год підвищення (на 10,6 %) щодо тварин, яких піддали дії світлового стресора і корекцію епіталоном не проводили.

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

Вступ. На даний час дослідження місця і ролі нейроендокринних структур у центральних механізмах циркадіанних ритмів є одним з актуальних питань сучасної хронофізіології [11]. Зміни тривалості основного часозадавача – фотоперіоду, як стресовий чинник, десинхронізують ритми соматичних і вісцеральних функцій, а також координацію і модуляцію механізмів адаптації організму до впливу різних чинників [3-5].

Для вивчення стресових реакцій і дії стреслімітувальних чинників (зокрема, мелатоніну) постає важливим дослідження вказаних субпопуляцій нейронів ПВЯ гіпоталамуса, що синтезують стрес-релізінг гормони, які ініціюють стресорні реакції організму [4,10]. Серед пептидів, що проявляють сумісний ефект у регуляції секреції АКТГ, є кортикотропін-релізінг фактор (КРФ). КРФ-імунореактивна мітка виявлена, здебільшого, у медіальному дрібноклітинному суб’ядрі паравентрикулярних ядер (мдПВЯ) гіпоталамуса. Викликає зацікавленість з’ясування впливу світлового стресора на стан вказаних суб’ядер ПВЯ. При цьому важливо вивчити зміни морфофункціональної активності і рівень експресії гена надранньої відповіді *c-fos* у структурах, а також проаналізувати можливості підвищення адаптації нейросекреторних клітин до пошкоджувальної дії стресового чинника шляхом уведення екзогенно 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].

Попередні дослідження показали, що синтезований епіфізарний тетрапептид – епіталон воло-

діє онкостатичною, антиоксидантною та геропротекторною дією [6]. Відомості, що віддзеркалюють ефекти епіталону на експресію гена *c-fos* при тривалій експозиції світлом відсутні.

Мета дослідження. З’ясувати вплив епіталону на активність гена „надранньої відповіді” *c-fos* у суб’ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса за тривалого освітлення.

Матеріал і методи. Експерименти проведені на 36 статевозрілих самцях безпородних білих щурів масою 150-180 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію при сталій температурі і вологості повітря та вільному доступі до води і їжі. Експериментальні щури розподілені 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 08.00 до 20.00 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, і вони щоденно о 19.00 год підшкірно отримували ін’єкцію епіталону (Санкт-Петербурзький інститут біорегуляції і геронтології ПЗО РАМН, Росія) у дозі 0,5 мкг/кг, у 0,5 мл фізіологічного розчину.

Після закінчення семиденного періоду наступного дня о 14.00 і 02.00 тварин виводили з експерименту, здійснюючи одномоментну декапітацію під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг, внутрішньоочеревинно). 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 (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 гаммаглобулін, котрий є антитілом щодо глобулінів кролика, кон’югований із флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC; “Sigma-Aldrich”, США).

Ідентифікацію c-Fos у нейронах гіпоталамуса і визначення вмісту цього протеїну здійснювали із застосуванням комп’ютерної системи цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (“Kontron Elektronik”, Німеччина) 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”, Німеччина). 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 ядер нейронів СХЯ, котрі вміщували імунопозитивний матеріал (S_i та S_n відповідно, мкм^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, – $K_i = \left| \lg(D_i/D_0) \right|$ та $C_i = K_i \cdot S_i$ (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 із стереотаксичним атласом мозку шура.

Отримані експериментальні дані обробляли з використанням пакета прикладних і статистичних програм VIDAS-2.5 (“Kontron Elektronik”, Німеччина) і EXCEL-2003 (“Microsoft Corp.”, США). Для вибірок усіх показників розраховували значення середнього арифметичного, середньоквадратичного відхилення та похибки середнього. Вибіркі імунопозитивних клітин СХЯ, у

котрих вимірювали S_i та S_n та розраховували значення K_i та C_i у різних групах експериментальних тварин, склалися 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 мм^2 площі зрізу. Вірогідність відмінностей значень у дослідних і контрольних групах тварин визначали за критерієм Ст’юдента (t). Вірогідними вважали значення, для яких $P < 0.05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

За стандартного режиму освітлення в медіальних дрібноклітинних суб’ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса (мдПВЯ) інтенсивність флуоресценції матеріалу, імунореактивного до c-Fos, удень менша, ніж уночі. Зокрема, о 14.00 год вона дорівнювала $26,46 \pm 1,506 \text{ мкм}^2$, а о 02.00 год – $27,67 \pm 1,420 \text{ мкм}^2$. Утримування тварин за зміненого фотоперіоду спонукало до зміщення інтенсивності флуоресценції досліджуваного матеріалу з нічних на денні години (табл.). Моделювання дослідним особинам епіфізарної гіпофункції спричинило о 14.00 год вірогідне зростання (на 17,0 %) площі матеріалу, імунореактивного до c-Fos порівняно з контрольними величинами в аналогічний період та на 22,8 % щодо показників цієї серії тварин, мдПВЯ яких досліджували о 02.00 год (табл.).

У цій серії шляхом кореляційного аналізу встановлено о 14.00 год обернений ($r = -0,66$), а о 02.00 год прямий ($r = 0,64$) зв’язок між площами ядра нейрона і матеріалу, імунореактивного відносно c-Fos.

Моделювання пригніченої функціональної активності шишкоподібної залози (світловий стрес) віддзеркалилося і на концентрації білка c-Fos у суб’ядрах мдПВЯ. Індекс концентрації білка c-Fos в умовах епіфізарної гіпофункції о 14.00 год менший на 27,3 %, а о 02.00 год – на 21,0 % щодо такого в інтактних тварин (табл.).

Отримані зміни визначали і коливання індексу вмісту білка c-Fos у суб’ядрах мдПВЯ гіпоталамуса. В інтактних тварин цей індекс уночі вірогідно менший (на 28,9 %), ніж удень. У стресованих світлом шурів добова динаміка подібна, проте більш виражена: денний показник на 42,4 % перевищував нічний. Порівняно з контрольними величинами о 14.00 год вірогідних змін не виявлено, а о 02.00 год індекс на 28,9 % нижчий (табл.).

Охарактеризовуючи інтегральну щільність матеріалу, імунореактивного до c-Fos, ми отримали наступні дані. Якщо в контрольних шурів більші показники щільності розташування c-Fos-позитивних нейронів у суб’ядрах мдПВЯ реєстрували в нічний проміжок дослідження, то при світловому стресі, навпаки, – щільність вдень вірогідно зростає відносно такої в шурів, які зна-

Таблиця

Характеристика c-Fos-імунорезистивних нейронів у медіальному дрібноклітинному суб'яздрі паравентрикулярного ядра гіпоаламуса щурів за уведення епіталону на фоні світлового стресу ($\bar{x} \pm S_x$)

Серії експериментальних тварин	Площа матеріалу, імунореактивного до c-Fos, мм^2	Концентрація білка c-Fos у нейроні, $O_{\text{Ф}}$	Вміст білка c-Fos у нейроні, $O_{\text{Ф}}$	Щільність c-Fos-імунорезистивних нейронів (мм^2)	Сумарний вміст білка c-Fos у структурі, $O_{\text{Ф}}/\text{мм}^2$
Інтактні, 14.00 год	26,46±1,506	0,370±0,0064	9,63±0,533	227±15	2185±144
Інтактні, 02.00 год	27,67±1,420 $p_1=0,572$	0,238±0,0035 $p_1<0,001$	6,84±0,402 $p_1=0,002$	236±14 $p_1=0,670$	1614±95 $p_1=0,008$
Постійне освітлення, 14.00 год	30,96±1,372 $p=0,052$	0,269±0,0085 $p<0,001$	8,43±0,537 $p=0,144$	283±20 $p=0,049$	2385±169 $p=0,389$
Постійне освітлення, 02.00 год	25,22±1,413 $p=0,249$ $p_1=0,015$	0,188±0,0025 $p<0,001$ $p_1<0,001$	4,86±0,308 $p=0,003$ $p_1<0,001$	260±13 $p=0,238$ $p_1=0,358$	1263±63 $p=0,012$ $p_1<0,001$
Постійне освітлення + епіталон, 14.00 год	32,42±1,095 $p_2=0,425$	0,242±0,0021 $p_2=0,012$	8,17±0,312 $p_2=0,684$	327±18 $p_2=0,133$	2672±147 $p_2=0,229$
Постійне освітлення + епіталон, 02.00 год	25,51±0,921 $p_2=0,867$ $p_1<0,001$	0,208±0,0029 $p_2<0,001$ $p_1<0,001$	5,46±0,239 $p_2=0,155$ $p_1<0,001$	232±12 $p_2=0,145$ $p_1=0,001$	1267±66 $p_2=0,966$ $p_1<0,001$

Примітка. p – вірогідні зміни щодо параметрів тварин, які перебували в умовах стандартного фотоперіоду того ж часового інтервалу; p_1 – щодо параметрів тварин попереднього часового інтервалу в межах серії, p_2 – щодо тварин, яких піддали дії постійного освітлення

ходилися за фізіологічних умов. Слід відмітити відсутність міжгрупової різниці в досліджуваних серіях, що, ймовірно, зумовлено значною похибкою цього параметра у випадково відібраних зонах зрізів досліджуваних суб'ядер (табл.).

З метою корекції змін, викликаних перебуванням шурів за умов постійного освітлення, нами застосований синтетичний тетрапептид епіталон (Санкт-Петербурзький інститут біорегуляції і геронтології ПЗВ РАМН, Росія) у дозі 0,5 мкг/кг, у 0,5 мл фізіологічного розчину.

Після уведення епіталону о 14.00 год площа матеріалу, імунореактивного до *c-Fos* у суб'ядрах мдПВЯ гіпоталамуса складала $32,42 \pm 1,095$ мкм², набуваючи вірогідної різниці о 02.00 год, коли вона становила $25,51 \pm 0,921$ мкм² (табл.). Щодо концентрації імуноспецифічного білка, то о 14.00 год показник був вірогідно нижчим (на 10,0 %), а о 02.00 год вищим (на 10,6 %) щодо такого у тварин, яких піддали дії світлового стресора і корекцію не проводили.

При застосуванні епіталону істотної корекції стрес-індукованих світловим чинником змін добової динаміки такого інтегрального показника, як індекс вмісту білка *c-Fos* у суб'ядрах мдПВЯ, не спостерігали. Як при нічному, так і при денному етапах експерименту, індекс вмісту білка в суб'ядрах мдПВЯ залишався подібним до такого у тварин, які зазнали дії світлового стресу без терапії епіталонем. Характеризуючи інтегральну щільність матеріалу, імунореактивного до *c-Fos*, у досліджуваних структурах потрібно вказати, що при корекції епіталонем удень щільність нейронів на 29,1 % вища, ніж уночі ($p < 0,001$), а також на 44,0 % перевищувала значення інтактних тварин в аналогічний проміжок доби ($p < 0,001$) (табл.).

Висновки

1. У медіальних дрібноклітинних суб'ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса шурів динаміка експресії продукту активності гена „надранньої відповіді” *c-fos* – білка *c-Fos* – має чітку циркадіанну ритмічність. Визначальними чинниками, які вплинули на індекс інтегральної щільності *c-Fos* у тканині мдПВЯ гіпоталамуса шурів, були зміни концентрації даного білка та індексу вмісту *c-Fos* у суб'ядрах нейронів.

2. На фоні постійного освітлення о 14.00 год епіталон (0,5 мкг/кг маси тіла тварини) спричинив вірогідне зниження (на 10,0 %) концентрації імуноспецифічного білка *c-Fos*, а о 02.00 год – підвищення (на 10,6 %) щодо такої у тварин, яких піддали дії світлового стресора і корекцію не проводили.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується провести ультрамікроскопічні, морфометричні та імуногістохімічні дослідження суб'ядер ПВЯ гіпоталамуса за зміненого фотоперіоду та уведення епіталону з метою

глибшого пізнання властивостей синтетичного тетрапептиду епіталону.

Література

1. Анисимов В.Н. Мелатонин: перспективы применения для профилактики рака и преждевременного старения / В.Н. Анисимов // Вестн. восстановит. мед. – 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. эндокринол. патол. – 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 иммуно-эндокринных 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. 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.
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.

**ЭФФЕКТЫ ЭПИТАЛОНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА «СВЕРХРАННЕГО ОТВЕТА»
C-FOS В СУБЪЯДРАХ ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА
В УСЛОВИЯХ ПОСТОЯННОГО ОСВЕЩЕНИЯ**

R. E. Bulyk

Резюме. Исследовано влияние эпителина на состояние гена ранней функциональной активности *c-fos* в медиальных мелкоклеточных субъядрах паравентрикулярного ядра (ммПВЯ) 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 десинхронозу. На фоне постоянного освещения синтетический тетрапептид эпителин (0,5 мкг/кг), в 14.00 ч вызывал снижение (на 10,0 %) концентрации иммуноспецифического белка *c-Fos*, а в 02.00 ч повышение (на 10,6 %) показателя относительно крыс, содержащихся в условиях светового стрессора без введения эпителина.

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

**THE EFFECTS OF EPITHALON ON THE EXPRESSION OF THE C-FOS GENE OF
«EARLY RESPONSE» IN THE SUBNUCLEI OF THE PARAVENTRICULAR
NUCLEUS OF THE HYPOTHALAMUS UNDER THE CONDITIONS
OF PERMANENT LIGHTING**

R. Ye. Bulyk

Abstract. The effect of epithalon on the state of the gene of an early immediate functional activity – *c-fos* in the subnuclei of the paraventricular nuclei (PVN) of the rat hypothalamus has been studied during different intervals of the circadian period (in the day-time and at night). The expression of the product of this gene – *c-Fos* protein – in the animals kept under normal conditions of alternating lighting and darkness demonstrated a rather clear – cut circadian pattern. A light stress results in marked desynchronization. Against a background of permanent lighting synthetic tetrapeptide epithalon (0,5 µg/kg) caused a significant decrease (by 10,0 %) of the concentration of the immunospecific protein *c-Fos* at 14.00 hours, and at 02.00 a.m. – an increase (by 10,6 %) in relation to the animals subjected to the action of the light stressor without performing an epithalon correction.

Key words: *c-fos* gene, immunospecific *c-Fos* protein, hypothalamic paraventricular nucleus, permanent lighting, epithalon.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. В.Ф. Мислицький

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 3 (63), part 1. – P. 21-25

Надійшла до редакції 07.07.2012 року

© Р.Е. Булик, 2012

УДК 616-018.2-053.2-07-092+616-053.2-084:614.212

М.М. Васюкова, Т.В. Починок

**ПРОГНОЗУВАННЯ ФОРМУВАННЯ І ПЕРЕБІГУ НЕДИФЕРЕНЦІЙОВАНОЇ
ДИСПЛАЗІЇ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ ТА ДИСПАНСЕРНЕ
СПОСТЕРЕЖЕННЯ ДІТЕЙ ЦЬОЇ ГРУПИ**

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ

Резюме. Проведено аналіз анамнестичних, клінічно-лабораторних та інструментальних даних дітей із недиференційованою дисплазією сполучної тканини (НДСТ) віком 3-14 років. Визначена частота різних фенотипових варіантів та тяжкість перебігу НДСТ у дітей м. Києва. Верифікована провідна патологія вагітних, за наявності якої певною мірою можна прогнозувати народження дітей із НДСТ. Виявлена гранична кількість дисморфогенетичних ознак, що дозволяє прогнозувати наявність малих аномалій внутрішніх орга-

нів, а також прямий кореляційний зв'язок між рівнем загального Са у сироватці венозної крові дітей з НДСТ з рівнем лейкоцитів, лімфоцитів, фагоцитарною активністю нейтрофілів та інтенсивністю фагоцитозу, що потребує проведення відповідного додаткового обстеження та диспансерного спостереження.

Ключові слова: діти, недиференційована дисплазія сполучної тканини (НДСТ), прогнозування розвитку та перебігу, диспансерне спостереження.

© М.М. Васюкова, Т.В. Починок, 2012