

УДК 612.826.4:612.017.2  
© Колектив авторів, 2011

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЕФЕКТІВ МЕЛАТОНІНУ Й ЕПІТАЛОНУ НА СТАН ГЕНА РАННЬОЇ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ *c-fos* У МЕДІАЛЬНИХ ДРІБНОКЛІТИННИХ СУБ'ЯДРАХ ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНИХ ЯДЕР ГІПОТАЛАМУСА СТРЕСОВАНИХ СВІТЛОМ ЩУРІВ

Булик Р.Є., Пішак В.П., Черновська Н.В., Ломакіна Ю.В., Висоцька В.Г., Сметанюк О.І., Кривчанська М.І., Волошин В.Л.

Буковинського державного медичного університету

Булик Р.Є., Пішак В.П., Черновська Н.В., Ломакіна Ю.В., Висоцька В.Г., Сметанюк О.І., Кривчанська М.І., Волошин В.Л. Характеристика ефектів мелатоніну й епіталону на стан гена ранньої функціональної активності *c-fos* у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах паравентрикулярних ядер гіпоталамуса стресованих світлом щурів // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 51-54.

Досліджено вплив мелатоніну і синтетичного біорегулятора епіталону з метою корекції стрес-індукованих змін активності гена „надранньої відповіді” *c-fos* в медіальних дрібноклітинних суб'ядрах паравентрикулярного ядра (мдПВЯ) 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. За умов світлового стресу денний показник індексу вмісту *c-Fos* у мдПВЯ тварин був вище порівняно з нічним. На фоні постійного освітлення мелатонін (0,5 мг/кг маси) сприяв наближенню до норми концентрації білка *c-Fos* у суб'ядрах мдПВЯ гіпоталамуса в нічний проміжок. Вираженої різниці у добовому аспекті при застосуванні епіталону (0,5 мкг/кг маси тіла тварини) не реєстрували.

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

Булик Р.Е., Пишак В.П., Черновская Н.В., Ломакина Ю.В., Высоцкая В.Г., Сметанюк О.И., Кривчанская М.И., Волошин В.Л. Характеристика эффектов мелатонина и эпителина на состояние гена ранней функциональной активности *c-fos* в медиальных мелкоклеточных субъядрах паравентрикулярных ядер гипоталамуса стрессированных светом крыс // Украинский морфологический альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 51-54.

Исследовано влияние мелатонина и синтетического биорегулятора эпителина с целью коррекции стресс-индуцированных изменений активности гена «сверхраннего ответа» *c-fos* в медиальных мелкоклеточных субъядрах паравентрикулярного ядра (мдПВЯ) гипоталамуса крыс в разные промежутки суток (днем и ночью). Экспрессия продукта этого гена белка *c-Fos* – у животных, которых содержали при нормальных условиях чередования освещения и темноты, демонстрировала четкий циркадианный характер. При условии светового стресса дневной показатель индекса содержания *c-Fos* в мдПВЯ животных был выше по сравнению с ночным. На фоне постоянного освещения мелатонин (0,5 мг/кг массы) приближал к норме концентрацию белка *c-Fos* в субъядрах мдПВЯ гипоталамуса в ночной промежуток суток. Выраженной разницы в суточном аспекте при использовании эпителина (0,5 мкг/кг массы тела животного) не регистрировали.

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

Bulyk R.Ye., Pishak V.P., Chernovska N.V., Lomakina Yu.V., Vysotska V.G., Smetanyuk O.I., Kryvchanska M.I., Voloshin V.L. Characteristic of melatonin's and epithalon's effects on the condition of *c-fos* gene in the medial paraventricular subnuclei of the hypothalamus in light-stressed rats // Украинский морфологический альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 51-54.

It has been studied the influence of melatonin and synthetic bioregulator epithalon against a background of the stress-induced changes of gene “over early answer” (*c-fos*) activity in the medial microcellular subnuclei of the hypothalamic rat's PVNs during different 24-hour period (day and night). Expression of gene product – protein *C-Fos* – in animals, which were held under casual light regime, demonstrated distinct circadian rhythm. Under influence of light stress the daily index of *c-Fos* contain in rat's mdpVN was higher than at night. Under influence of constant light melatonin in dosage 0,5 mg/kg the concentration of *c-Fos* protein approached to the norm of the concentration this protein in subnuclei mdpVNs of hypothalamus at night. Manifest differences in daily aspect were not found during epithalon administration in dosage 0,5mkg/kg.

**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., 2000, Заморський І. І. 2003). 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 (Бондаренко Л. А. 2005, А. J. Douglas, 2005).

У нейроендокринну відповідь при стресових реакціях залучені, насамперед, паравентрикулярні ядра гіпоталамуса 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 (Гениатуліна М. С., 1996).

При вивченні стресових реакцій і дії стреслімітувальних чинників (зокрема, мелатоніну) постає важливим дослідження вказаних субпопуляцій нейронів ПВЯ гіпоталамуса, що синтезують стрес-рилізуючі гормони, які ініціюють стресорні реакції організму (Ginsberg A. B., 2003, Reiter R. J., 2003). Медіальні дрібноклітинні суб'ядра паравентрикулярних ядер (мдПВЯ) гіпоталамуса синтезують кортикотро-

пін-рилізінг фактор і в першу чергу залучені в нейроендокринну відповідь при різноманітних стресових реакціях організму, що і визначило їх вибір для вивчення реакції нейроендокринної системи (Peng Z., 2004). При цьому важливо вивчити зміни експресії гена надранньої відповіді *c-fos* у мдПВЯ гіпоталамуса, а також проаналізувати можливість підвищення адаптації нейросекреторних клітин до пошкоджувальної дії стресового чинника.

Попередні дослідження показали, що синтезований епіфізарний тетрапептид – епіталон володіє онкостатичною, антиоксидантною та геропротекторною дією (Хавинсон В. Х., 2006). Відомості, що віддзеркалюють ефекти епіталону експресії гена *c-fos* при тривалій експозиції світлом відсутні.

**Мета.** З'ясувати вплив постійного освітлення на стан гена ранньої функціональної активності *c-fos* у мдПВЯ 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 епіталону 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 стан-

дартних умовах віварію при сталих температурі і 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 (світлотемрява 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 протягом семи діб в умовах постійного освітлення аналогічної інтенсивності. Тварини серії №3 (контроль) знаходилися за тих же умов експерименту, як і щури серії №1, проте щоденно о 19.00 год внутрішньоочередово 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 внутрішньоочередово 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 епітадона (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 непрямий імунофлуоресцентний метод. Зрізи завтовшки 14 мкм спочатку депарафінували в ксилолі, потім проводили регідратацію в розчинах етанолу шести низхідних концентрацій (100-40 %) і трічі по 10 хв відмивали у фосфатному буфері (0,1 М, рН 7,2).

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 SOHU-4922 ("SOHU 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 градациями 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  $S_n$  відповідно, мкм<sup>2</sup>). 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 зі стереотаксичним атласом мозку щура (Paxinos G. D., Watson C. S., 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. Вибірки імунопозитивних клітин лВПВЯ, у котрих вимірювали  $S_i$  та  $S_n$  та розраховували значення  $K_i$  та  $C_i$  у різних групах експериментальних тварин, складалася 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<sup>2</sup> 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.** За стандартного режиму освітлення у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах паравентрикулярного ядра (мВПВЯ) гіпоталамуса інтенсивність флуоресценції матеріалу, імунореактивного до c-Fos, вдень менша, ніж вночі. Зокрема, о 14.00 год вона дорівнювала  $26,46 \pm 1,506$  мкм<sup>2</sup>, а о 02.00 год –  $27,67 \pm 1,420$  мкм<sup>2</sup>. 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, мВПВЯ яких досліджували о 02.00 год (табл.).

Вимірювання площі перерізу суб'ядер мВПВЯ гіпоталамуса показало, що в інтактних щурів о 14.00 год вона становила  $35,70 \pm 0,576$  мкм<sup>2</sup>, а о 02.00 год вірогідно знижувалася до  $32,79 \pm 0,438$  мкм<sup>2</sup>. У тварин, яких утримували в гіперліомінізованих умовах, нами відмічено тенденцію до зростання розмірів мВПВЯ без вірогідних змін показників відносно значень інтактних тварин у досліджувані інтервали доби (табл.). Як за фізіологічної, так і за гіпофункції піщкоподібною залози відмічали міжгрупові відмінності при денному та нічному спостереженні.

В інтактних тварин нормовані площі суб'ядер становили вдень 75,1 %, а вночі – 84,4 % щодо повної площі перерізу цих структур, вірогідно відрізняючись між собою. В умовах постійного освітлення аналогічні параметри протилежні щодо інтактних тварин. Середнє значення показника о 14.00 год сягало 84,1 %, а о 02.00 год – 73,6 % відносно повної площі (табл.). Обидва згадані показники в стресованих світлом щурів при парному порівнянні з аналогічними параметрами інтактних тварин вірогідно вищі.

**Таблиця.** Характеристика cFos-імунопозитивних нейронів у медіальному дрібноклітинному суб'яздрі паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів за різної тривалості фотоперіоду та при експериментальній терапії ( $\bar{x} \pm s$ ):

Серії експериментальних тварин	Площа матеріалу, імунореактивного до c-Fos, мкм <sup>2</sup>	Концентрація білка c-Fos в нейроні, О <sub>іф</sub>	Вміст білка c-Fos у нейроні, О <sub>іф</sub>	Щільність c-Fos – імунопозитивних нейронів (мм <sup>2</sup> )	Сумарний вміст білка c-Fos у структурі, О <sub>іф</sub> /мм <sup>2</sup>
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=0,572	0,238 ± 0,0035 p<0,001	6,84 ± 0,402 p=0,002	236 ± 14 p=0,670	1614 ± 95 p=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 <sub>1</sub> =0,015	0,188 ± 0,0025 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001	4,86 ± 0,308 p=0,003 p <sub>1</sub> <0,001	260 ± 13 p=0,238 p <sub>1</sub> =0,358	1263 ± 63 p=0,012 p <sub>1</sub> <0,001
Постійне освітлення + мелатонін, 14.00 год	22,43 ± 0,971 P <sub>2</sub> <0,001	0,519 ± 0,0089 P <sub>2</sub> <0,001	11,67 ± 0,556 P <sub>2</sub> =0,002	256 ± 22 P <sub>2</sub> =0,385	2988 ± 257 P <sub>2</sub> =0,078
Постійне освітлення + мелатонін, 02.00 год	26,78 ± 1,773 p <sub>1</sub> =0,050 p <sub>2</sub> =0,495	0,235 ± 0,0030 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> =0,001	6,40 ± 0,450 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> =0,018	257 ± 21 p <sub>1</sub> =0,974 p <sub>2</sub> =0,906	1644 ± 134 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> =0,028
Постійне освітлення + епіталон, 14.00 год	32,42 ± 1,095 p <sub>2</sub> =0,425	0,242 ± 0,0021 p <sub>2</sub> =0,012	8,17 ± 0,312 p <sub>2</sub> =0,684	327 ± 18 p <sub>2</sub> =0,133	2672 ± 147 p <sub>2</sub> =0,229
Постійне освітлення + епіталон, 02.00 год	25,51 ± 0,921 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> =0,867	0,208 ± 0,0029 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	5,46 ± 0,239 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> =0,155	232 ± 12 p <sub>1</sub> =0,001 p <sub>2</sub> =0,145	1267 ± 66 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> =0,966

**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.

Моделювання різної функціональної активності шишкоподібної залози віддзеркалялося і на концентрації білка c-Fos у суб'яздрах 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 таких в інтактних тварин.

Отримані зміни визначали і коливання індексу вмісту білка c-Fos у суб'яздрах мДПВЯ гіпоталамуса. В інтактних тварин цей індекс уночі вірогідно менший (на 28,9 %), ніж удень. У стресованих світлом щурів 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 інтактних щурів більші показники щільності розташування c-Fos-позитивних нейронів у суб'яздрах мДПВЯ реєстрували в нічний проміжок дослідження, то при гіпофункції шишкоподібної залози, навпаки, – щільність вдень вірогідно зростає відносно такої в щурів, які знаходилися за фізіологічних умов. Слід відмітити відсутність міжгрупової різниці у всіх досліджуваних серіях, що, ймовірно, зумовлено значною похибкою цього параметра у випадково відібраних зонах зрізів досліджуваних суб'яздер (табл.).

Отримані результати дозволяють припустити, що визначальними чинниками, які вплинули на індекс інтегральної щільності c-Fos у тканині мДПВЯ гіпоталамуса щурів були зміни концентрації даного білка та індексу вмісту c-Fos в суб'яздрах нейронів. Показники індексу інтегральної щільності c-Fos у серіях експерименту о 02.00 год вірогідно нижчі, ніж о 14.00 год, а саме в інтактних тварин – на 26,3 %, при світловій стимуляції – на 47,0 % відповідно.

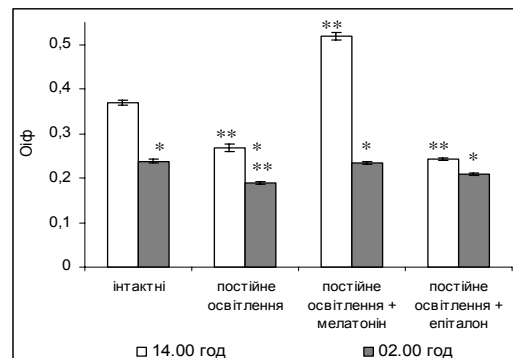
Уведення щурам, які знаходилися за стандартного світлового режиму розчинника (1,0 мл 0,9% розчину етанолу на фізіологічному розчині натрію хлориду) впродовж семи діб суттєво не змінювали характеристики cFos-імунопозитивних нейронів у мДПВЯ гіпоталамуса.

Ін'єкції мелатоніну (у дозі 0,5 мг/кг маси тіла тварини) на фоні постійного освітлення нормалізували добовий ритм показника досліджуваної площі. А саме, більшу площу імунофлуоресценції, як і в інтак-

тних тварин, реєстрували вночі, коли вона сягала 26,78±1,690 мкм<sup>2</sup>. О 14.00 год показник нижчий від такого в контролі (p<0,05).

На відміну від мелатоніну, введення епіталону (у дозі 0,5 мг/кг маси тіла тварини) за світлового стресу не проявляло корегуальної дії. Картина залишалася подібною до такої в щурів без ін'єкцій тетрапетиду (табл.). О 14.00 год площа матеріалу, імунореактивного до c-Fos у суб'яздрах мДПВЯ гіпоталамуса складала 32,42±1,095 мкм<sup>2</sup>, набуваючи вірогідної різниці о 02.00 год, коли вона становила 25,51±0,921 мкм<sup>2</sup> (табл.).

Згідно з розрахунками концентрації білка c-Fos у суб'яздрах мДПВЯ у групі тварин, яким вводили хронобіотик за стандартного фотоперіоду, вдень вона становила 0,331±0,0109 О<sub>іф</sub>, а вночі вірогідно знижувалася до 0,221±0,0034 О<sub>іф</sub>. Водночас на фоні постійного освітлення мелатонін сприяв наближенню до норми концентрації білка c-Fos у суб'яздрах мДПВЯ гіпоталамуса в нічний проміжок (табл.). Удень спостерігали підйом показника до 0,519±0,0089 О<sub>іф</sub>. Такої вираженої різниці у добовому аспекті не реєстрували при застосуванні епіталону. У цій серії щурів концентрація білка о 14.00 год вірогідно нижча (на 10,0 %), а о 02.00 год вища (на 10,6 %) щодо такої в тварин, яких піддали дії світлового стресора і корекцію не проводили (рис. 1).



**Рис. 1.** Вплив препаратів (мелатоніну й епіталону) за тривалого освітлення на індекс концентрації білка c-Fos у нейроні мДПВЯ 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 (\*\*).

Вираженою була і добова динаміка такого інтегрального показника, як індекс вмісту білка c-Fos у суб'ядрах мдПВЯ у всіх експериментальних групах, особливо при ін'єкції стресованим щуром мелатоніну (табл.). У цій серії денні значення на 45,1 % перевищували такі в зрізах, узятих вночі. При застосуванні епіталоно істотної корекції стрес-індукованих світловим чинником змін у даному випадку не спостерігали.

Як при нічному, так і при денному етапі експерименту, індекс вмісту білка у суб'ядрах мдПВЯ залишався подібним до такого в тварин з епіфізарною гіпофункцією без терапії епіталоном (табл.).

Характеризуючи інтегральну щільність матеріалу, імунореактивного до c-Fos, у досліджуваних структурах потрібно вказати, що за звичайного світлового режиму індола призводило до вірогідного її підвищення вночі (на 30,1 %) порівняно з показниками інтактних щурів в аналогічні часові терміни. Уведення мелатоніну тваринам з гіпофункцією шишкоподібної залози нівелювало добові відмінності між показниками зразків, зокрема о 14.00 год щільність матеріалу, імунореактивного до c-Fos, перебувала в межах  $256 \pm 22 \text{ мм}^2$ , а о 02.00 год –  $257 \pm 21 \text{ мм}^2$ . Протилежну картину відмічали при корекції епіталоном. Удень щільність нейронів на 29,1 % вища, ніж вночі ( $p < 0,001$ ), а також на 44,0 % перевищувала значення інтактних тварин в аналогічний проміжок доби ( $p < 0,001$ ). Відповідно, міжрупові відмінності ресстрували тільки при застосуванні тетрапептиду (табл.).

Ймовірно, що визначальне значення на індекс інтегральної щільності c-Fos у суб'ядрах мдПВЯ гіпоталамуса мали зміни концентрації даного білка та індексу вмісту c-Fos в структурах, що описуються. Визначення індексу показало, що індола істотно не змінював його денних значень, однак за фізіологічних умов викликає зростання індексу вночі. Так, о 02.00 год він на 41,6 % перевищував такий в інтактних особин (табл.).

Крім того, чітко простежується його корегувальний ефект щодо порушень, спричинених гіпофункцією епіфіза мозку. Мелатонін майже повністю відновлював індекс інтегральної щільності c-Fos у суб'ядрах мдПВЯ відносно норми в нічний період. У той же час вдень індекс схожий до такого в щурів, яким вводили індола на фоні фізіологічної функції шишкоподібної залози. Інший препарат – епіталоно – не проявляв тенденції до нормалізації вказаного показника. Як і на фоні постійного освітлення без застосування тетрапептиду, сумарний вміст білка c-Fos у структурі о 14.00 год вищий на 22,3 %, а вночі нижчий на 21,5 % ніж в інтактних тварин (рис. 2).

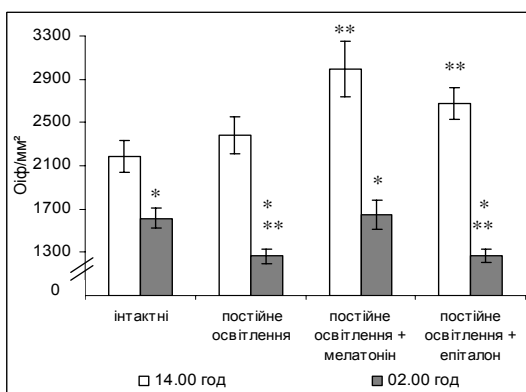


Рис. 2. Ефекти мелатоніну та епіталоно на добові коливання індексу сумарного вмісту білка c-Fos у нейронах мдПВЯ гіпоталамуса щурів за тривалого світлового режиму.

**Висновки:** 1. У медіальних дрібноклітинних суб'ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів динаміка експресії продукту активності гена „надранньої відповіді” *c-fos* – білка c-Fos – має чітку циркадіанну ритмічність. Отримані результати дозволяють припустити, що визначальними чинниками, які вплинули на індекс інтегральної щільності c-Fos у тканині мдПВЯ гіпоталамуса щурів були зміни концентрації даного білка та індексу вмісту c-Fos в суб'ядрах нейронів. Показники індексу інтегральної щільності c-Fos за фізіологічної, гіпер- та гіпофункції епіфіза мозку о 02.00 год вірогідно нижчі, ніж о 14.00 год, а саме в інтактних тварин – на 26,3 %, при світловій стимуляції – на 47,0 %, в мовах постійної темряви на 62,8 % відповідно.

2. На фоні постійного освітлення мелатонін сприяв наблизенню до норми концентрації білка c-Fos у суб'ядрах мдПВЯ гіпоталамуса в нічний проміжок. Удень спостерігали різкий підйом показника до  $0,519 \pm 0,0089 \text{ О}_{\text{дф}}$ . Такої вираженої різниці у добовому аспекті не ресстрували при застосуванні епіталоно ( $0,5 \text{ мкг/кг}$  маси тіла тварини), коли концентрація білка о 14.00 год вірогідно нижча (на 10,0 %), а о 02.00 год вища (на 10,6 %) щодо такої в тварин, яких піддали дії світлового стресора і корекцію не проводили.

**Перспективи подальших розробок.** У даному напрямку дозволять глибше пізнати місце і роль суб'ядер паравентрикулярних ядер гіпоталамуса в механізмах формування циркадіанних ритмів головного мозку ссавців.

#### ЛІТЕРАТУРА:

1. Влияние постоянного освещения на суточный ритм мелатонина и структуру пинеальной железы у кроликов / Л. А. Бондаренко, Г. И. Губина-Вакулук, Н. Н. Сотник, А. Р. Геворкян // Пробл. эндокринной патологии. — 2005. — № 4. — С. 38—45.
2. Гениталина М. С. Ультраструктура субпопуляций нейронів паравентрикулярних ядер гіпоталамуса при стрессе и стресс-лимитирующем действии импульсного электрического тока / М. С. Гениталина, Ю. Н. Королев // Морфология. — 1996. — Т. 110, № 4. — С. 37—41.
3. Гончарук В. Д. Функционально-морфологический статус супрахиазматического ядра гипоталамуса при первичной гипертензии / В. Д. Гончарук, Р. М. Багос // Кардиология. — 2000. — Т. 40, № 4. — С. 36—39.
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. 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.
6. 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, N 11. — P. 1075—1083.
7. Paxinos G. D. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates / G. D. Paxinos, C. C. Watson // Acad. Press: New York, 1985.
8. 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, N 11. — P. 101—116.
9. 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, N 1. — P. 40—48.
10. Reiter R. J. Melatonin: clinical relevance / R. J. Reiter // Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. — 2003. — Vol. 17, N 2. — P. 273—285.

Надійшла 13.09.2011 р.

Рецензент: доц. А.І. Чистолінова