

Bobrova I.A.

**Concentration of Circulatory Immune Complexes in Patients with Chronic Hepatitis C Complicated by Cytokine-Associated Thyropathy**

**Summary:** Koncentration of circulatory immune complexes was studied by IFA-analysis at patients with chronic hepatitis C wич complicated cytokine-induced thyropathy.

Combined antiviral therapy got 294 patients, among them 39 patients

had developing thyropathy. The levels of immune complexes patients with thyroid pathology exceeded levels comparison group at all control therapy terms without convincing increasing in the treatment process.

**Key words:** *circulatory immune complexes, chronic hepatitis C, cytokine-induced thyropathy, antiviral treatment.*

Надійшла 24.09.2012 року.

УДК 612.826.4:612.017.2

Булик Р.С.

**Вплив мелатоніну на активність гена «Надранньої відповіді» *c-fos* у субядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса в умовах стресу**

Кафедра медичної біології, генетики та фармацевтичної ботаніки (зав. каф. – проф. В.П.Пішак)

Буковинського державного медичного університету

**Резюме.** Досліджено вплив мелатоніну на стан гена ранньої функціональної активності *c-fos* у субядрах 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 десинхронізу. Ін'єкції мелатоніну на фоні постійного освітлення нормалізували добовий ритм показника площі матеріалу, імунореактивного до *c-Fos* у субядрах ПВЯ гіпоталамуса щурів.

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

**Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.**

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

Для вивчення стресових реакцій і дії стрес-лімітувальних 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, в медіальному дрібноклітинному субядрі паравентрикулярних ядер (мдПВЯ) гіпоталамуса. Викликає зацікавленість з'ясування впливу світлового стресора на стан вказаних субядер 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 екзогенного мелатоніну.

Найнадійнішим і найстабільнішим синхронізувальним чинником для гоміотермних тварин, включаючи людину, є фотоперіод [2, 8]. Порушення світлового режиму (тривале освітлення) пригнічує синтез ендogenous 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 вказаних субпопуляцій нейронів ПВЯ гіпоталамуса, залучених у формування механізмів циркадіанних ритмів, за модифікації фотоперіоду у доступній

літературі відсутні.

**Метою роботи** було з'ясування впливу мелатоніну на активність гена „надранньої відповіді” *c-fos* у субядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса за тривалого освітлення.

**Матеріал і методи дослідження**

Експерименти проведені на 36 статевозрілих самцях безпродних білих щурів масою 150–180 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію при сталих 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, ім 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).

Після закінчення семиденного періоду наступного дня о 14.00 і 02.00 тварин виводили з експерименту, здійснюючи одноментну декапітацію під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Мозок тварин негайно вилучали і вміщували в 10 % розчин формаліну на фосфатному буфері (0.1 M, pH 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 (“Konttron 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 опроміювання. 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 ( $S_1$  та  $S_2$  відповідно,  $\text{мкм}^2$ ). З урахуванням інтенсивності флуоресценції в імунопозитивних ділянках та інтенсивності флуоресценції фону ( $D_1$  та  $D_0$ ) обчислювали показники, які характеризують концентрацію c-Fos та вміст цього протеїну в ядрах імунопозитивних клітин,  $-K_i = |\lg(D_1/D_0)|$  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. Вибірки імунопозитивних клітин СХЯ, у котрих вимірювали  $S_1$  та  $S_2$  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  $1 \text{ мм}^2$  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 дослідження та їх обговорення

При стандартному режимі освітлення у медіальних дрібноклітинних субядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса (мдПВЯ) інтенсивність флуоресценції матеріалу, імунореактивного до c-Fos, вдень менша, ніж вночі. Зокрема, о 14.00 год вона дорівнювала  $26,46 \pm 1,506 \text{ мкм}^2$ , а о 02.00 год –  $27,67 \pm 1,420 \text{ мкм}^2$ . Утримання тварин при зміненому фотоперіоді спонукало до зміщення інтенсивності флуоресценції досліджуваного матеріалу з нічних на денні години (табл. 1). Моделювання дослідним особинам епіфізарної гіпофункції спричинило о 14.00 год вірогідне зростання (на 17,0 %) пло-

щі 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. 1).

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 субядрах 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. 1).

Отримані зміни визначали і коливання індексу вмісту білка c-Fos у субядрах 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. 1).

Характеризуючи інтегральну щільність матеріалу, імунореактивного до c-Fos, ми отримали наступні дані. Якщо в контрольних шурів більші показники щільності розташування c-Fos-позитивних нейронів у субядрах мдПВЯ реєстрували в нічний проміжок дослідження, то при світловому стресі, навпаки, – щільність вдень вірогідно зростає відносно такої в шурів, які знаходилися в фізіологічних умовах. Слід відзначити відсутність міжгрупової різниці у досліджуваних серіях, що, ймовірно, зумовлено значною похибкою цього параметра у випадково відібраних зонах зрізів досліджуваних субядер (табл. 1).

З метою корекції змін, викликаних перебуванням шурів за умов постійного освітлення, нами застосований екзогенний мелатонін (0,5 мг/кг, Sigma, США). Ін'єкції мелатоніну на фоні постійного освітлення нормалізували добовий ритм показника досліджуваної площі, а саме, більшу площу імунофлуоресценції, як і в інтактних тварин, реєстрували вночі, коли вона сягала  $26,78 \pm 1,690 \text{ мкм}^2$ . О 14.00 год показник нижчий від такого в контролі ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). На фоні постійного освітлення мелатонін сприяв наближенню до норми концентрації білка c-Fos у субядрах мдПВЯ гіпоталамуса в нічний проміжок. Удень спостерігали підйом показника до  $0,519 \pm 0,0089 O_{\text{ф}}$  (табл. 1).

Отримані результати дозволяють припустити, що 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 в субядрах нейронів. Показники індексу сумарного вмісту білка c-Fos у структурах у всіх трьох 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 %, в умовах уведення мелатоніну на фоні постійного освітлення на 45,0 % відповідно (табл. 1).

### Висновки

1. У медіальних дрібноклітинних субядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса шурів динаміка експресії продукту активності гена „надранньої відповіді” c-fos – білка c-Fos – має чітку циркадіанну ритмічність. Визначальними чинниками, які вплинули

**Таблиця 1. Характеристика cFos-імунопозитивних нейронів в медіальному дрібноклітинному субядрі паравентрикулярного ядра гіпоталамуса шурів за уведення мелатоніну на фоні світлового стресу ( $\bar{x} \pm S_x$ )**

Серії експериментальних тварин	Площа матеріалу, імунореактивного до c-Fos, $\text{мкм}^2$	Концентрація білка c-Fos в нейроні, $O_{\text{ф}}$	Вміст білка c-Fos у нейроні, $O_{\text{ф}}$	Щільність c-Fos-імунопозитивних нейронів ( $\text{мм}^2$ )	Сумарний вміст білка c-Fos у структурі, $O_{\text{ф}}/\text{мм}^2$
Інтактні, 14.00 год	$26,46 \pm 1,506$	$0,370 \pm 0,0064$	$9,63 \pm 0,533$	$227 \pm 15$	$2185 \pm 144$
Інтактні, 02.00 год	$27,67 \pm 1,420$ $p_1 = 0,572$	$0,238 \pm 0,0035$ $p_1 < 0,001$	$6,84 \pm 0,402$ $p_1 = 0,002$	$236 \pm 14$ $p_1 = 0,670$	$1614 \pm 95$ $p_1 = 0,008$
Постійне освітлення, 14.00 год	$30,96 \pm 1,372$ $p = 0,052$	$0,269 \pm 0,0085$ $p < 0,001$	$8,43 \pm 0,537$ $p = 0,144$	$283 \pm 20$ $p = 0,049$	$2385 \pm 169$ $p = 0,389$
Постійне освітлення, 02.00 год	$25,22 \pm 1,413$ $p = 0,249$ $p_1 = 0,015$	$0,188 \pm 0,0025$ $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	$4,86 \pm 0,308$ $p = 0,003$ $p_1 < 0,001$	$260 \pm 13$ $p = 0,238$ $p_1 = 0,358$	$1263 \pm 63$ $p = 0,012$ $p_1 < 0,001$
Постійне освітлення + мелатонін, 14.00 год	$22,43 \pm 0,971$ $p_2 < 0,001$	$0,519 \pm 0,0089$ $p_2 < 0,001$	$11,67 \pm 0,556$ $p_2 = 0,002$	$256 \pm 22$ $p_2 = 0,385$	$2988 \pm 257$ $p_2 = 0,078$
Постійне освітлення + мелатонін, 02.00 год	$26,78 \pm 1,773$ $p_2 = 0,495$ $p_1 = 0,050$	$0,235 \pm 0,0030$ $p_2 < 0,001$ $p_1 < 0,001$	$6,40 \pm 0,450$ $p_2 = 0,018$ $p_1 < 0,001$	$257 \pm 21$ $p_2 = 0,906$ $p_1 = 0,974$	$1644 \pm 134$ $p_2 = 0,028$ $p_1 < 0,001$

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

на індекс інтегральної щільності c-Fos у тканині мдПВЯ гіпоталамуса щурів, були зміни концентрації даного білка та індексу вмісту c-Fos в суб'єдрах нейронів.

2. Ін'єкції мелатоніну на фоні постійного освітлення нормалізували добовий ритм показника досліджуваної площі, а саме, більшу площу імунофлуоресценції, як і в інтактних тварин, реєстрували вночі, коли вона сягала  $26,78 \pm 1,690$  мкм<sup>2</sup>.

### Перспективи подальших досліджень

У подальшому планується провести ультрамікроскопічні, морфометричні та імуногістохімічні дослідження суб'єдр ПВЯ гіпоталамуса при зміненому фотоперіоді з метою глибшого розуміння місця їх ролі у механізмах циркадіанних ритмів головного мозку щурів.

### Література

1. Анисимов В.Н. Мелатонин: перспективы 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 иммунно-эндокринных нарушений при экспериментальном сахарном диабете введением гипоталамических нейропептидов / Ю. М. Колесник, А. В. Абрамов, В. А. Жулинский [и др.] // Клин. 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, N3. – 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. – N.1. – P.122.
9. Golombek D.A. Neurochemistry of mammalian entrainment: Signal transduction pathways in the suprachiasmatic nuclei /

D.A.Golombek, G.A.Ferreya, M.E Katz // Biol. Rhythm Res. – 2000. – Vol.31, N1. – 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. N3. – P.269–274.

11. Schwartz W.J. Circadian rhythms: a tale of two nuclei / W.J. Schwartz // Curr. Biol. – 2009. – Vol. 19, N.11. – P.460–462.

*Булык Р. Е.*

**Влияние мелатонина на активность гена «Сверхраннего ответа» c-fos в суб'єдрах паравентрикулярного ядра гипоталамуса в условиях стресса**

**Резюме.** Исследовано влияние мелатонина на состояние гена ранней функциональной активности c-fos в медиальных мелкоклеточных суб'єдрах паравентрикулярного ядра (мдПВЯ) 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. Ин'єкции мелатонина на фоне постоянного освещения нормализовали суточный ритм показателя площади материала, иммунореактивного к c-Fos в мдПВЯ гипоталамуса крыс.

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

*Bulyk R. Ye.*

**The Influence of Melatonin on the Activity of the C-Fos Gene of “Early Response” in the Subnuclei of the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus Under the Conditions of Stress**

**Summary.** The influence of melatonin on the state of the gene of an early functional activity-c-fos in the subnuclei of the paraventricular nucleus (PVN) of the rat hypothalamus at different intervals of the circadian period (in the day-time and night) was studied. The expression of the product of this gene – the c-Fos protein – in animals kept under normal conditions of alternating lighting and darkness demonstrated a rather legible circadian pattern. A light stress results in marked desynchronization. Melatonin injections normalized the diurnal rhythm of the index of the area of the material against a background of permanent lighting, immunoreactive to c-Fos in PVN subnuclei of the rat hypothalamus.

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

Надійшла 27.08.2012 року.

УДК: 616.31+616.314-77+615.454.1

*Вербовська Р.І., Рожко М.М., Дівнич Т.Я.*

### Вплив адгезивних засобів на тканини ротової порожнини в пацієнтів з повними знімними пластинковими протезами

Кафедра стоматології факультету післядипломної освіти (зав. каф. – проф. М.М.Рожко)  
ДВНЗ „Івано-Франківський національний медичний університет”

**Резюме.** Обстежено 120 пацієнтів з повними знімними пластинковими протезами, яких було поділено на групи: які користувались і не користувались адгезивними засобами. Повна відсутність зубів призводить до виникнення ускладнень місцевого і загального характеру. Доцільним є вивчення впливу кремів для фіксації протезів на слизову оболонку ротової порожнини, залежно від терміну користування. Дискомфорт в ротовій порожнині (сухість, стягнутість) турбує частіше пацієнтів з повними знімними пластинковими протезами, які для покращення фіксації використовують крем. Запальні ураження при обстеженні слизової оболонки ротової порожнини виявляли у більшого відсотка пацієнтів, які застосовували фіксаційні креми.

Використання кремів до 0,5 року сприяє покращенню адаптації пацієнтів до повних знімних пластинкових протезів. У пацієнтів,

які користувались кремами до 3-х років і більше, при обстеженні спостерігали запальні ураження слизової оболонки ротової порожнини.

**Ключові слова:** повні знімні пластинкові протези, слизова оболонка ротової порожнини, адгезивні креми.

### Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.

Потреба дорослого населення України у повному знімному протезуванні становить 57,5 осіб на 1000 обстежених [1].

Ортопедичне лікування хворих при повній втраті зубів повинне попереджувати та віддаляти наслідки втрати зубів – атрофію щелепно-лицевого скелету та м'язів і направлене на загальне оздоровлення людини та продовження активного