

Проблемні статті

УДК 612.017.2:575.113

В.П.Пішак, Р.Є.Булик

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ ЦИРКАДІАННИХ РИТМІВ ЗА ФІЗІОЛОГІЧНИХ УМОВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ТА ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Кафедра медичної біології, генетики та гістології
(зав. – чл.-кор. АПН України, проф. В.П.Пішак)

Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці

Резюме. В огляді представлені сучасні дані щодо молекулярно-генетичних маркерів циркадіанних ритмів. Охарактеризовано роль мелатоніну в організмі та його участь у синхронізації циркадіанних ритмів. Розглянуто мелатонінові рецептори та генний контроль ефектів гормону. Наведено результати власних досліджень стану

гена ранньої функціональної активності *c-fos* у нейронах провідного пейсмекера циркадіанних ритмів ссавців – супрахізматичних ядер гіпоталамуса.

Ключові слова: мелатонін, циркадіанні ритми, молекулярно-генетичні маркери, *c-fos*.

Вступ. Зміна циклів денної і нічної фотоперіодичності або тривалість світлового дня, – найбільш важливі регулятори періодичної програми фізіологічних функцій організму, складовою яких виступають біологічні ритми. Життєдіяльність організму можна уявити як чітко скоординовану систему біологічних ритмів, починаючи від субклітинного і до організменного рівнів. Здатність організму до перебудови біоритмів згідно з екзогенними і ендогенними стимулами характеризує стабільність людського організму і здоров'я людини. Власні біоритми організму не мають чіткої відповідності тривалості доби на Землі, а відхиляються у бік збільшення або зменшення такої тривалості, і тому вони отримали назву циркадіанних, або навколдобових ритмів (ЦР).

Роль мелатоніну в організмі. Синхронізація циркадіанних ритмів

Відкриття мелатоніну – одне з вагомих досягнень ХХ століття, удостоєне Нобелівської премії. Мелатонін (МТ) є основним гормоном шишкоподібної залози, який постачає інформацію від основного генератора циркадіанних ритмів, розміщеного в супрахізматичних ядрах (СХЯ) гіпоталамуса. Крім шишкоподібної залози і переднього гіпоталамуса, в яких найвищий рівень МТ, далі розташовуються проміжний мозок, гіпокамп, смугасте тіло і нова кора. МТ синхронізує добові біоритми, бере участь у нейроендокринній регуляції репродуктивної системи, гальмує деякі функції гіпофіза. Йому властивий антистресовий захист. Він виступає як перехоплювач гідроксильного радикала, синглетного кисню, NO.

МТ бере участь у гормональному забезпеченні добової та сезонної періодизації поведінкової активності. Йому властива медіаторна функція (вплив на проникність постсинаптичних мембран, синаптичного апарату, участь у проведенні нервових імпульсів). Доведена анальгезуюча дія високих доз МТ, його здатність потенціювати ефекти снодійних та наркотичних препаратів, та, врешті, і

сам володіє снодійним ефектом, завдяки синхронізації хронологічної та фізіологічної фаз доби. Йому властива чітка антигонадотропна дія: гальмує виділення лютеотропного гормону. Залежно від стану імунокомпетентних органів стимулює імунну відповідь як В-, так і Т-систем. МТ причетний до регуляції секреції пролактину і гормону росту.

Антикортикотропна дія МТ узгоджується з добовою періодичністю функції кори надниркових залоз.

Інгібування МТ тиреоїдної паренхіми відбувається на всіх етапах її функціональної активності. Крім того, МТ пригнічує стимулювальний ефект тиреотропного гормону щодо секреторних процесів у щитоподібній залозі.

Ритм МТ у новонароджених стабілізується між 9-м та 12-м тижнями після народження. У недоношених дітей його становлення затримується на 2-3 тижні. Прогресуюче зниження синтезу МТ у дитячому віці полегшує дозрівання аритму. Становлення менструального циклу зумовлено циркадіанними коливаннями синтезу МТ. Він відіграє суттєву роль у регуляції сперматогенезу і фолікулогенезу [35]. МТ властиві унікальні адаптивні ефекти: контролює артеріальний тиск, число серцевих скорочень, агрегацію тромбоцитів, фібриноліз, коронарний кровообіг, має кардіопротективні властивості.

Участь епіфізарного МТ у формуванні ЦР підтверджується тим, що при видаленні шишкоподібної залози зникають ЦР основних фізіологічних функцій організму [7]. Зокрема зменшуються амплітуди, зміщаються акрофази, відбувається інверсія ритмів, неузгодженість ритмів різних функцій нирок.

Таким чином, ефекти МТ виявляються як на системному, так і тканинному, клітинному і субклітинному рівнях.

Рецептори мелатоніну

МТ опосередковує свої ефекти як при впливі на власні рецептори, визначені на клітинних мем-

бранах практично всіх органів і тканин людського організму, так і самостійно, у зв'язку з високою проникністю через клітинні мембрани. Більше того, встановлено родину ядерних рецепторів до МТ [15]. Ядерний рецептор ROR, що належить до сімейства орфанових нуклеарних ретиноїдних рецепторів RZR/ROR, виявлений у трьох органах ссавців, що визначають добові ритми організму: у СХЯ, сітківці ока й шишкоподібній залозі. ROR клонований із РНК мозку щурів [38]. Вказаний рецептор виявляється в структурах ЦНС, які здебільшого належать до сенсорних ділянок. Ген ROR локалізований у хромосомі 9 людини в ділянці, ідентичній хромосомі 4 миші [22].

Сімейство ретиноїдних Z-рецепторів (RZR) або ретиноїдних орфанових рецепторів (ROR) містить продукти трьох генів: α -ROR, β -ROR, γ -ROR. Експресія рецепторів цього сімейства значно варіює в різних тканинах [33]. Експресія β -ROR найбільш обмежена: сенсорна ділянка нервової тканини, нейроендокринна тканина, лімбічна система, за винятком локомоторної. γ -ROR чітко виражена в кістковій мускулатурі, печінці, нирках й адипоцитах. Варіант β -ROR – γ -ROR-t специфічний для тимуса. Найбільшою мірою виявлена експресія α -ROR у таламусі, нюхових цибулинах, мозочку, адипозній тканині, печінці, шкірі, яечках, хрящовій тканині. Ґрунтовно вивчена й описана участь ROR/RZR у регуляції імунних процесів, диференціюванні центральної нервової системи й, можливо, у модуляції метаболізму ліпідів [24].

Всі нейрональні мембранні рецептори МТ зчеплені з G-білками, які володіють здатністю гальмувати активність аденілатциклази, тобто вони є G_i -білками. Крім того, встановлено, що мембранні рецептори МТ при їх зв'язуванні з МТ гальмують утворення цГМФ, діацилгліцеролу та метаболітів арахідонової кислоти, вхід іонів кальцію всередину клітини [6]. Можливий також неопосередкований мембранними рецепторами вплив МТ на пригнічення синтезу цГМФ: при цьому МТ всередині клітини зв'язується з кальмодуліном та блокує утворення NO (II) [39]. Таким чином, МТ зменшує рівень більшості внутрішньоклітинних месенджерів.

У людини відомо два підтипи мелатонінових рецепторів – M-1A і M-1B. Як й інші представники сімейства родопсину, мелатонінові рецептори складаються із семи трансмембранних α -спіралей, трьох внутрішньоклітинних і трьох позаклітинних гідрофільних петель та внутрішньо- і позаклітинного кінцевих доменів. Методами моделювання за гомологією (як шаблонний білок обраний родопсин КРС) побудована модель мелатонінових рецепторів M-1B-підтипу та уточнена модель рецепторів M-1A-підтипу. На основі цих моделей запропоновані механізми взаємодії мелатоніноподібних лігандів із сайтами зв'язування рецепторів M-1A- і M-1B-підтипів і вивчене амінокислотне оточення МТ у сайтах зв'язування. З використанням побудованих моделей проведений молекулярний докінг відомих агоніс-

тів, що різняться за структурою, і запропоновані їх модифікації, які сприяють збільшенню афінності лігандів. Автори відмітили критерії структурного розходження мелатонінових рецепторів першого і другого підтипів [5]. У людини M-1A рецептори виявлені в гіпоталамусі, нирках, кишечнику, M-1B рецептори – у сітківці ока та різних відділах головного мозку. Характерно, що регуляторні впливи МТ на ЦР опосередковуються через M-1A рецептори.

Мембранні рецептори МТ у структурах головного мозку розподіляються залежно від видової і філогенетичної ознак [34]. Однак практично у всіх ссавців ці рецептори виявляються в головних структурах хроніперіодичної системи – у СХЯ і туберальній частині гіпофіза. Встановлено міжлінійні розходження в щільності рецепторів МТ у СХЯ, добовій зміні рухової активності, екскреції із сечею 6-COM, концентрації МТ у сечі й шишкоподібній залозі трьох інбредних ліній щурів. Щільність рецепторів МТ у СХЯ і його нічний синтез у щурів BH і LEV виявилися вірогідно вищими, ніж у щурів ACI. У тварин ACI відзначено унімодальний характер і високу добову рухову активність, тоді як у щурів BH і LEV така активність знижена і носить мультимодальний характер. Добова екскреція 6-COM із сечею у всіх трьох ліній щурів унімодальна, що вказує на лінійні розходження щурів у відповідальних за рухову активність шляхах вивільнення МТ із СХЯ.

МТ серед інших ендогенних антиоксидантів має найбільш сильний ефект. Причому ці властивості не опосередковуються через мелатонінові рецептори. Його дія виявляється в будь-яких клітинах людського організму, навіть якщо вони позбавлені таких рецепторів [29]. На відміну від багатьох антиоксидантів вплив МТ виявляється у всіх структурах клітини, навіть в ядрі.

МТ контролює як ендогенний, так і екзогенний ритм циркадіанної активності антиокиснювальних ферментів та ритмічні зміни окиснювального пошкодження білка і молекул ліпідів. Циркадіанному ритму МТ підпорядкований ритм дії як пероксидази, так і редуктази глутаніону.

Розглядаючи ефекти МТ на молекулярному рівні вкажемо, що він здатний зменшувати кількість ушкоджень ДНК [32].

У лімфоцитах, які зазнали генотоксичного впливу карбамазепіну, МТ зменшує частоту індукованих хромосомних аберацій і обмінів сестринських хроматид, нормалізує мітотичний і проліферативний індекси [26].

У мозку щурів високий рівень мембранних рецепторів МТ виявлений, крім СХЯ, також у задньому полі (*area postrema*) і спінальному тракті трійчастого нерва. Більш низький рівень мелатонінових рецепторів локалізований в ядрах гіпоталамуса – медіальної, преоптичної і передньої ділянок, а також вентромедіальних, аркуатних і латеральних сосочкових ядрах; ядрах бічного нюхового тракту; ядрах таламуса – паравентрикулярному, передньовентральному й інтермедіо-

дорсальному; габенулярному комплексі – медіальній частині латеральних габенулярних ядер; септальному комплексі – ядрах, що направляють проекції на гіпоталамус (септогіпоталамічних ядрах) і ядрі ложа медулярної смужки; мигдалеподібному комплексі – базолатеральному і медіальному ядрах [18]; а також у гіпокампальній формації [4]. Крім нейрональних ділянок, рецептори містяться в туберальній і передній частках гіпофіза, а також у стінках передніх і задньої мозкових артерій [31].

Через рецептори головного мозку МТ здатний обмежувати порушення, зумовлені іммобілізаційним стресом, пряма впливає на ендокринні центри гіпоталамуса та нейроендокринні стресорганізуючі структури головного мозку [16].

Ефекти МТ реалізуються через специфічні механізми регуляції тривалості клітинного циклу. Вважають, що основу такої дії складає підвищена експресія білків p53 та p21^{WAF1}. Зокрема гальмування p21^{WAF1} циклінзалежних кіназ 2 і 4 спричиняє блокування переходу з G₁- в S-фазу клітинного циклу. Крім того, МТ здатний взаємодіяти з промоторною ділянкою гена цикліну D1 та пригнічувати його експресію. В експериментах *in vivo* з'ясовано [17], що МТ інактивує естрогенстимульовану експресію цикліну D1. Промотор гена цикліну D1 містить не класичний естрогензалежний елемент, а має естрогенчутливу ділянку, в якій розташований цАМФ-чутливий елемент. МТ блокує естрогенчутливу ділянку щодо дії естрогену опосередкованого через цАМФ-чутливий елемент.

Таким чином, індуковане МТ блокування клітинного циклу є регулятором зміни балансу активаторів (циклін D) та інгібіторів (p21) цикліназних кіназ фази G₁ клітинного циклу. Звідси стає зрозумілою хроноперіодичність клітинного циклу, що доведено багатьма дослідниками.

Останнім часом з'ясовано, що модуляція МТ клітинного циклу зумовлена його впливом на активність теломерази, ферменту, який відповідає за елонгацію теломерів хромосом, що і забезпечує стабільність структури хромосом. Така регуляція МТ теломеразної активності відбувається шляхом впливу на ядерні та мембранні рецептори МТ. Так, агоністи як ядерних, так і мембранних рецепторів не змінюють рівня мРНК TR субодиниці теломерази, тоді як величина експресії мРНК каталітичної субодиниці TERT ферменту зменшується за умов дії агоніста ядерних рецепторів CGP 52608 і підвищується під впливом агоніста мембранних рецепторів MS20098 [37]. Крім того, МТ підвищує експресію інтегрину Я₁-рецепторного білка, який регулює взаємодію між клітинами та позаклітинним матриксом.

Генний контроль ефектів мелатоніну

Циркадіанна ритмічність забезпечується генетично [25]. Завдяки ліпофільності, МТ проникає у клітину, зокрема в ядро, і реалізує свої ефекти на рівні геному [37].

Перші повідомлення щодо генетичної природи ЦР належать R. Конопка, S. Benser (1971). У

Drosophila melanogaster виявлено три різних мутації ділянки X-хромосоми, які спричиняли відхилення активності комах від 24-годинного ритму. Цей ген отримав назву *Period* або *Per*, він переважно активний у зорових клітинах і за його участі синтезується білок PER. Пізніше відкривають другий ген, що забезпечує ритмічну організацію, це – *Tim*. Обидва гени, і *Per* і *Tim* працюють одночасно. На початку 90-х років ХХ ст. у мишей ідентифіковано ген внутрішнього біологічного годинника – ген *Clock*. Упродовж 90-х років з'являються повідомлення про цілу низку генів, які контролюють добову активність клітин – *Bmal*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2* та ін. Всі вони осцилюють у добовому ритмі, задіяні в молекулярному циклі і забезпечують добову активність.

Молекулярний часовий механізм у супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса складається з взаємодіючих позитивного і негативного зворотних зв'язків регулюючих петель декількох (щонайменше їх дев'ять) основних циркадіанних «часових» генів (*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1/Mop3*, *Tim* та ін.) (рис. 1) [20, 21, 23, 27, 36]. Показано, що світло безпосередньо впливає на експресію деяких «часових» генів, які забезпечують ЦР. Ці гени регулюють функції клітин, що контролюють експресію генів ключового клітинного циклу поділу і генів апоптозу. Мутації в деяких ключових генах драматично віддзеркалюються на багатьох функціях організму і призводять до розвитку різних патологічних процесів і скороченню тривалості життя [1] (табл. 1).

Взаємодія МТ з так званими «часовими» генами (*Per*, *Clock*, *Bmal*, *Cry* та ін.) визначає фотоперіодичний контроль циркадіанних і сезонних змін фізіологічних функцій організму [40].

Прогрес у розвитку методів молекулярної біології, зокрема метод мікрочипів ДНК, сприяв розумінню механізму дії МТ. В одному з перших досліджень вивчені впливи МТ на експресію генів у пігментному епітелії сітківки і ретинальних нейронах. Установлено, що в нейронах сітківки МТ стимулює експресію шести і пригнічує експресію восьми генів з 8000 вивчених, тоді як у пігментному епітелії 15 генів стимулювалися, а 2 – гальмувалися [19].

У роботі Анисимова С.В. и соавт. (2002) досліджувався вплив МТ на експресію понад 15000 генів у серці мишей СВА [3]. Аналіз дозволив ідентифікувати 212 транскриптів (<1,4 % від усіх досліджених клонів) з істотно зміненою експресією клонів. Серед них експресія 146 генів стимулювалася, а 66 генів пригнічувалася більше, ніж у 2 рази. Серед цих генів насамперед такі, що контролюють клітинний цикл, адгезію і транспорт. Ці дані відповідають відомостям про вплив МТ на клітинну проліферацію, апоптоз і адгезію [28]. Потрібно зауважити, що МТ істотно впливає на експресію генів, які належать до онкогенезу (e.g. *Mybl1*, *Rasa 1*, *Mllt3* and *Enigma homolog 2*) і обміну кальцію (*Kcnn4* and *Dcamk11*).

Виявлено істотний вплив МТ на експресію деяких мітохондріальних генів, зокрема, стиму-

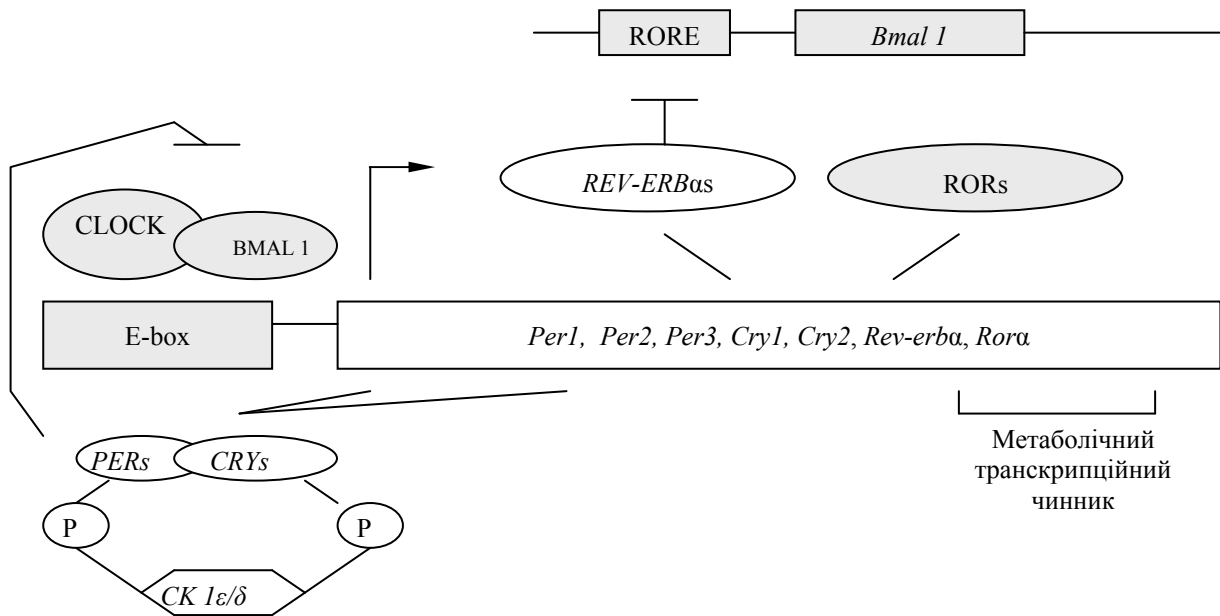


Рис. 1. Механізм внутрішнього молекулярного годинника клітини (В.Н.Анисимов, 2008)

Таблиця 1

Гени циркадіанних ритмів (часові гени) ссавців (В.Н.Анисимов, 2008)

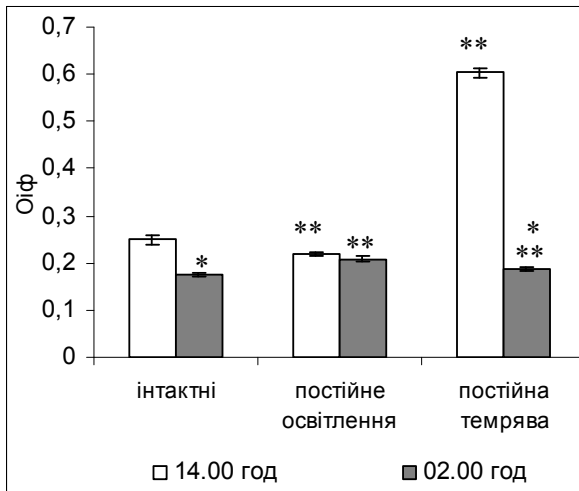
Ген	Властивості	Автори
<i>Period1 (Per1)</i> <i>Period2 (Per2)</i> <i>Period3 (Per3)</i>	Мутації порушують ритми у гризунів і людини. Фізично асоційовані з CRY і білками PER. Позитивний регулятор <i>Bmal1</i>	Tei et al., 1997; Takumi et al., 1998
<i>Cryptochrome 1 (Cry 1)</i> <i>Cryptochrome 2 (Cry 2)</i>	Мутації порушують ритми у гризунів. Фізично асоційований і стабілізує PER. Негативний регулятор транскрипції <i>Per</i>	Thresher et al., 1998; Van der Horst et al., 1999
<i>Circadian locomotor output cycles kaput (Clock)</i>	Мутації порушують ритми у гризунів. Фізично асоційований з BMAL1. Зв'язується з E-боксами і промотує транскрипцію <i>Per</i> і <i>Cry</i>	Vilaterna et al., 1994; King et al., 1997
<i>Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator [ARNT]-like protein 1 (Bmal1/Mop3)</i>	Мутації порушують ритми у гризунів. Експресується ритмічно. Фізично асоційований з CLOCK. Зв'язується з E-боксами і промотує транскрипцію <i>Per</i> і <i>Cry</i>	Gekakis et al., 1998
<i>Casein kinase 1 ε (CK 1ε)</i>	Мутації порушують ритми у гризунів. У хом'ячків порушується мутацією <i>tau</i> . Протеїнкіназа. Фізично асоційований і фосфорилує PER. Порушує стабільність PER і локалізацію в ядрі	Ralph, Menaker 1998; Toh et al., 2001
<i>Dec1 (Stral3/Sharp2/ BHLHB2);</i> <i>Dec2 (Sharp1/BHLHB3)</i>	Основний чинник транскрипції спіраль – петля – спіраль, пригнічує Clock. Bmal1-індукований промотор трансактивації <i>Per1</i> миші шляхом прямої білок-білок взаємодії з Bmal1 чи/та завершення для <i>E-box</i> елементів	Honma et al., 2002
<i>Timeless (mTim)</i>	Виключення <i>dTim</i> порушує ритм нейрональної активності СХЯ і порушує рівень кіркових часових елементів. Зв'язаний з PER в осциляції клітин СХЯ	Barnes et al., 2003

лювання генів, що кодують 16S рибосомальну РНК (*mt-Rnr2*), субодиниці I і III цитохром С оксидази (*mt-c1*, *mt-c3*), NADH-дегідрогенази 1 (*mt-Nd1*), а активність субодиниці 6 АТФ-синтази, навпаки, інгібував.

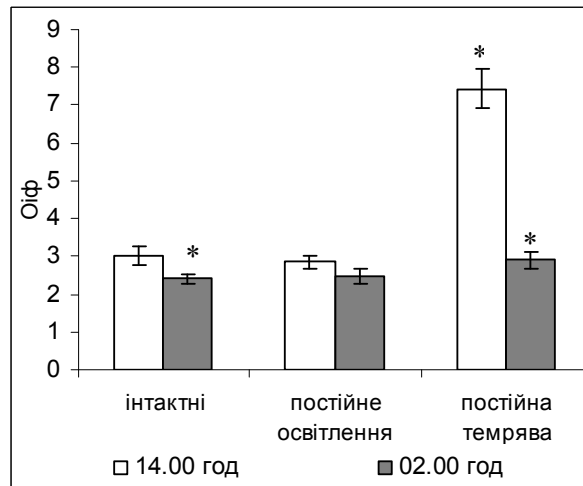
При вивченні ефекту МТ у мозку мишей виявлено, що його уведення модифікує експресію лише 38 з майже 17000 генів, що вивчені (<0,3 %) [2]. Серед них стимулювалася активність п'яти

генів і пригнічувалася 33 генів. Виявлений тільки один ген, на який МТ діяв як у серці, так і в мозку – це ген NADH дегідрогенази 4 (*mt-Nd4*), що кодується мітохондріальним геномом.

Порівняльний аналіз дії МТ на генну експресію в серці і мозку миші відповідає спостереженням про тканинно-специфічний характер біологічних ефектів МТ і свідчить про важливу роль мітохондріальних генів у дії МТ на тканини-мішені.



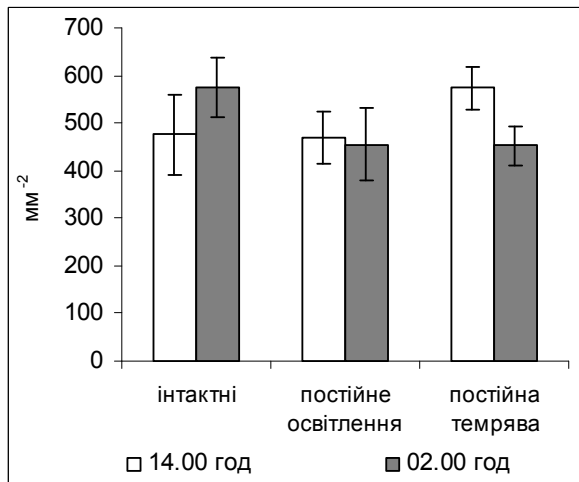
А



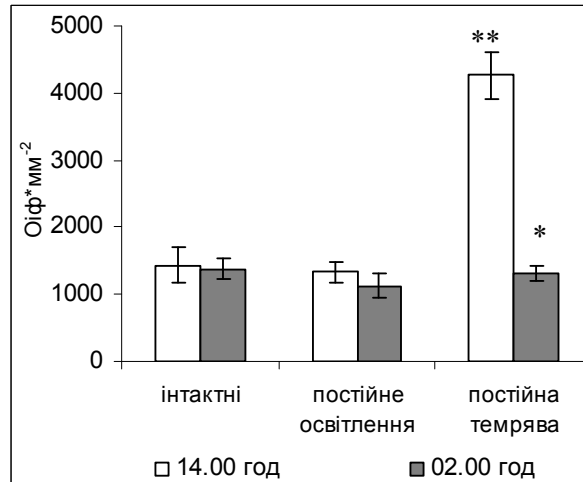
Б

Рис. 2. Середні значення індексу концентрації (А) та індексу вмісту (Б) білка c-Fos у ядрах нейронів супрахізматичного ядра тварин різних експериментальних груп у різні періоди доби

Примітка. * – вірогідність різниці щодо попереднього часового інтервалу; ** – вірогідність різниці щодо відповідної групи інтактних тварин



А



Б

Рис. 3. Середні значення щільності локалізації c-Fos-імунопозитивних нейронів супрахізматичного ядра (А) та індексу щільності білка c-Fos у межах зрізів тканини цього ядра (Б)

Примітка. * – вірогідність різниці щодо попереднього часового інтервалу; ** – вірогідність різниці щодо відповідної групи інтактних тварин

Вплив змін фотоперіоду на стан гена ранньої функціональної активності c-fos у нейронах СХЯ гіпоталамуса щурів

На основі імунофлуоресцентних досліджень нами встановлено, що експресія продукту активності гена „надранньої відповіді” c-fos – білка c-Fos – у нейронах СХЯ щурів, утримуваних в умовах нормальної фотоперіодики (12 год світла / 12 год темряви), зазнає досить чітких циркадіанних коливань. Наші виміри показали, що вночі індекс концентрації цього протеїну в ядрах вказаних нейронів майже на третину менший, ніж відповідне значення даного параметра вдень (рис. 2, А), а різниця між середніми нічним і денним значеннями індексу вмісту c-Fos становила близько 25 % (рис. 2, Б).

В умовах світлового стресу (друга група) циркадіанна ритміка активності гена c-fos істотно порушується. Індекс концентрації білка c-Fos в ядрах нейронів СХЯ вдень ставав дещо меншим, а вночі більшим, ніж відповідні значення за нормальних умов освітлення, і цей індекс у межах доби практично не змінювався (рис. 2, А). Майже не зазнавав циркадіанних коливань і індекс вмісту c-Fos (рис. 2, Б). Можна також відмітити деяку, хоч і слабку, тенденцію до загального зниження інтенсивності експресії даного протеїну в умовах постійного освітлення. Про це свідчить значення згаданого вище індексу, усереднене для групи щурів, що перебували в гіперлімінізованих умовах у цілому (без урахування періоду

добі), котре є меншим на 12,4 % відповідної величини в нормі (рис. 3, А).

Такі відмінності помітно нівелювалися в разі розрахунку індексу інтегральної щільності імунопозитивного продукту в площині зрізів тканини СХЯ (рис. 3, Б), але в цілому згадані циркадіанні варіації експресії *c-Fos* в умовах норми є цілком очевидними.

Проте найбільш істотних модифікацій зазнає продукція білка «надранньої відповіді» *c-Fos* в умовах світлової депривації. Якщо в нічний період показники, котрі характеризують зазначений процес, у даній групі відрізнялися від контролю в цілому помірно, то вдень індекси концентрації та вмісту *c-Fos* в ядрах нейронів СХЯ перевищували відповідні значення в інтактній групі майже у 2,5 раза (рис. 2). Зрозуміло, що це призводило до відповідного триразового підвищення середньої щільності імунопозитивного продукту в зрізах СХЯ порівняно з нормою (рис. 3, Б). Усереднене (для всієї доби) значення індексу щільності *c-Fos* у зрізах СХЯ в групі тварин, що зазнали світлової депривації, практично вдвічі більше, ніж у тварин, утримуваних за нормальних умов змін світла і темряви.

Найважливішим чинником, котрий визначає спостережувані зрушення інтенсивності експресії гена *c-fos* у нейронах СХЯ в умовах нормальної та експериментально зміненої фотоперіодики, логічно було б вважати рівень МТ – гормону епіфіза, що є основним гуморальним медіатором організації циркадіанних ритмів [8-14]. У разі нормально-го чергування періодів освітлення та темряви кон-

центрація та вміст *c-Fos* відчутно підвищуються вдень, коли рівень МТ у крові є мінімальним [6]. Тому можна припустити, що посилення секреції МТ та збільшення його рівня запобігають підвищенню експресії гена *c-fos* та посиленню синтезу відповідного протеїну *c-Fos*. Проте в умовах експериментальної гіпофункції епіфіза мозку (утримання тварин при постійному освітленні, світловий стрес) очікуваний на основі таких міркувань ефект – помітне зростання концентрації та кількості імунопозитивного продукту в нейронах СХЯ – не спостерігається (табл. 2). Основним феноменом у таких умовах є порушення (нівелювання) добової ритміки цих показників.

Індукція ж епіфізарної гіперфункції в разі світлової депривації призводить до значного (майже у 2,5 раза) зростання концентрації та вмісту *c-Fos* удень – у період, коли в нормі рівень МТ у крові є мінімальним [30]. У згаданих умовах утримання тварин у постійній темряві (котре, як і постійне освітлення, також є стресогенним чинником) рівень цього гормону вдень має бути значно більшим, ніж відповідне значення в умовах нормальної фотоперіодики. Не виключено, що саме різке розходження між наявним і «очікуваним» (нормальним) рівнями МТ у тварин, що перебували в постійній темряві, удень і є однією з істотних причин потужного посилення експресії гена *c-fos* у даний період доби. Отже, рівень МТ є важливим чинником, котрий впливає на інтенсивність експресії *c-fos*, але ці величини

Таблиця 2
Характеристика *cFos* -імунопозитивних нейронів у супрахіазматичному ядрі гіпоталамуса у щурів за зміни фотоперіоду ($\bar{x} \pm S_x$)

Серії експериментальних тварин	Площа матеріалу, імунореактивного до <i>c-Fos</i> , мкм ²	Індекс концентрації білка <i>c-Fos</i> у нейроні, O_{IF}	Індекс вмісту білка <i>c-Fos</i> у нейроні, O_{IF}	Щільність <i>c-Fos</i> -імунопозитивних нейронів (мм ⁻²)	Індекс сумарного вмісту білка <i>c-Fos</i> у структурі, $O_{IF}/\text{мм}^{-2}$
Інтактні, 14.00 год	11,91±0,688	0,250±0,0095	3,02±0,231	476±84	1438±253
Інтактні, 02.00 год	13,30±0,612 p=0,162	0,174±0,0026 p<0,001	2,40±0,124 p=0,040	574±62 p=0,370	1376±148 p=0,837
Постійне освітлення, 14.00 год	13,10±0,760 p=0,273	0,218±0,0032 p=0,010	2,85±0,167 p=0,564	470±54 p=0,953	1339±154 p=0,745
Постійне освітлення, 02.00 год	11,35±0,738 p=0,069 p ₁ =0,130	0,207±0,0057 p<0,001 p ₁ =0,123	2,47±0,207 p=0,778 p ₁ =0,184	455±76 p=0,253 p ₁ =0,875	1125±188 p=0,319 p ₁ =0,399
Постійна темрява, 14.00 год	12,50±0,817 p=0,593	0,603±0,0109 p<0,001	7,44±0,512 p<0,001	573±46 p=0,335	4264±342 p<0,001
Постійна темрява, 02.00 год	14,56±0,921 p=0,281 p ₁ =0,125	0,186±0,0026 p=0,009 p ₁ <0,001	2,90±0,222 p=0,078 p ₁ <0,001	453±41 p=0,135 p ₁ =0,080	1315±119 p=0,755 p ₁ <0,001

Примітка. p – вірогідні зміни щодо параметрів тварин, які перебували в умовах стандартного фотоперіоду того ж часового інтервалу; p₁ – щодо параметрів тварин попереднього часового інтервалу в межах серії

не пов'язані простою залежністю. Взаємовідносини згаданих показників, очевидно, є досить складними, і механізми таких взаємовідносин потребують подальших досліджень.

Література

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: В 2 т. – 2-е изд. перераб. и доп. / Анисимов В.Н. – СПб.: Наука, 2008. – Т. 1. – 418 с.
2. Анисимов С.В. Влияние мелатонина и тетрапептида на экспрессию генов в головном мозге мышей / С.В.Анисимов, В.Х.Хавинсон, В.Н.Анисимов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2004. – Т. 138. – С. 570-576.
3. Анисимов С.В. Изучение влияния мелатонина на экспрессию генов в сердце мышей с помощью микрочиповой технологии / С.В.Анисимов, К.Р.Богицер, В.Н.Анисимов // Доклад РАН. – 2002. – № 383. – С. 276-281.
4. Арушанян Э.Б. Место гиппокампа в биоритмологической организации поведения / Э.Б.Арушанян, Э.В.Бейер // Успехи физиол. наук. – 2001. – Т. 32, № 1. – С. 79-95.
5. Изучение механизма связывания лигандов мелатониновых рецепторов человека методом молекулярного моделирования / А.Э.Воронков, А.И.Иванов, И.И.Баскин [и др.] // Докл. РАН. – 2005. – Т. 403, № 3. – С. 409-413.
6. Мещишен І.Ф. Мелатонін: обмін та механізм дії / І.Ф.Мещишен, В.П.Пішак, І.І.Заморський // Бук. мед. вісник. – 2001. – Т. 5, № 2. – С. 3-15.
7. Пішак В.П. Функциональные связи эпифиза и почек у позвоночных: автореф. дис. на соискание уч. степени докт. мед. наук: спец. 14.00.17 / В.П.Пішак. – К., 1985. – 33 с.
8. Пішак В. П. Добові зміни щільності мелатонінових рецепторів 1а у нейронах супрахізматичних ядер гіпоталамуса за умов різної функціональної активності шишкоподібної залози / В.П.Пішак, Р.С.Булик // Фізіол. ж. – 2008. – Т. 54, № 4. – С. 11-15.
9. Пішак В.П. Залежність морфофункціонального стану супрахізматичних ядер гіпоталамуса щурів від тривалості освітлення / В.П.Пішак, Р.С.Булик // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. – 2008. – Т. 4, № 1. – С. 44-47.
10. Пішак В.П. Механізми участі шишкоподібної залози в забезпеченні циркадіанної ритмічності фізіологічних функцій / В.П.Пішак, Р.С.Булик // Бук. мед. вісник. – 2006. – Т. 10, № 4. – С. 5-8.
11. Пішак В. П. Стан гена ранньої функціональної активності c-fos у нейронах супрахізматичних ядер гіпоталамуса щурів в умовах модифікацій фотоперіоду / В.П.Пішак, Р.С.Булик, Д.А.Василенко // Нейрофізіологія. – 2008. – Т. 40, № 2. – С. 112-119.
12. Пішак В.П. Центральні механізми циркадіанних ритмів ссавців / В.П.Пішак, Р.С.Булик. – Чернівці: Медуніверситет, 2009. – 320 с.
13. Пішак В.П. Шишкоподібне тіло: місце і роль у хроноритмічній організації фізіологічних функцій / В.П.Пішак // Бук. мед. вісник. – 2002. – Т. 6, № 3-4. – С. 4-6.
14. Пішак В.П. Шишкоподібне тіло і біохімічні основи адаптації / Пішак В.П. – Чернівці : Медакадемія, 2003. – 152 с.
15. Смирнов А.Н. Ядерные рецепторы мелатонина / А.Н.Смирнов // Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 1. – С. 28-36.
16. Ткачук С.С. Нейроендокринні та біохімічні механізми порушень стрес-лімітуючої та стрес-реалізуючої системи мозку у щурів з синдромом пренатального стресу: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. мед. наук: спец. 14.03.04 – патологічна фізіологія / Ткачук С.С.: Ін-т фізіології НАН України ім. О.О.Богомольця. – Київ, 2000. – 41 с.
17. Antiproliferative activity of melatonin by transcriptional inhibition of cyclin D1 expression: a molecular basis for melatonin-induced oncostatic effects / G.Cini, B.Neri, A.Pacini [et al.] // J. Pineal Res. – 2005. – Vol. 39, № 1. – P. 1-9.
18. Badoer E. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus that project to the rostral ventrolateral medulla are activated haemorrhage / E.Badoer, J.Merolli // Brain Res. – 1998. – Vol. 791, № 1-2. – P. 317-320.
19. Cellular senescence impairs circadian expression of clock genes in vitro and in vivo / T.Kunieda, T.Minamino, T.Katsuno [et al.] // Circ. Res. – 2006. – Vol. 98. – P. 532-539.
20. Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation / B.H.Miller, E.L.Mc Dearmon, S.Panda [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104. – P. 3342-3347.
21. Circadian clocks: Neural and peripheral pacemakers that impact upon the cell division cycle / [A.K.References and further reading may be available for this article. To view references and further reading you must purchase this article.Reddy, G.K.Y.Wong, J.O'Neill et al.] // Mutat. Res. – 2005. – Vol. 574. – P. 76-91.
22. Coexpression of MT1 and RORalpha1 melatonin receptors in the Syrian hamster Harderian gland / C.Toms-Zapico, B. Antonio, B. Caballero [et al.] // J. Pineal Res. – 2005. – Vol. 39, № 1. – P. 21-26.
23. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock / R.V.Kondratov, A.A.Kondratova, V.Y.Gorbacheva [et al.] // Genes Dev. – Vol. 20. – P. 1868-1873.
24. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance / C.Ekmekcioglu // Biomed. Pharmacother. – 2006. – Vol. 60, № 3. – P. 97-108.
25. Functional central rhythmicity and light entrainment but not liver and muscle rhythmicity are Clock independent / D.J.Kennaway, J.A.Owens, A.Voultios [et al.] // Am. J. Physiol. – 2006. – Vol. 291, № 4. – P. 1172-1180.
26. In vivo and in vitro evaluation of the mutagenic potential of carbamazepine: does melatonin have anti-mutagenic activity? / W.M.Awara, M.El-Gohary, S.H.El-Nabi [et al.] // Toxicology. – 1998. – Vol. 125, № 1. – P. 45-52.

27. Korf H.W. The circadian system and melatonin: lessons from rats and mice / H.W.Korf, C.von Gall, J.Stehle // *Chronobiol. Int.* – 2003. – Vol. 20. – P. 697-710.
28. Lack of a time-dependent effect of melatonin on radiation-induced apoptosis in cultured rat lymphocytes / E.Yurtcu, Y.Guney, M.A.Ergun [et al.] // *Cell Biol. International.* – 2007. – Vol. 31, № 10. – P. 1144-1149.
29. Melatonin and mitochondrial function / J.Leon, D.Acuca-Castroviejo, R.M. Sainz [et al.] // *Life Sci.* – 2004. – Vol. 75, № 7. – P. 765-790.
30. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen / V.N.Anisimov, P.I.G.opovich, M.A.Zabzhinski [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1757. – P. 573-589.
31. Melatonin, melatonin receptors and melanophores: A moving story / D.Sugden, K.Davidson, K.Hough [et al.] // *Pigm. Cell Res.* – 2004. – Vol. 17, № 5. – P. 454-460.
32. Mohanan P.V. Preventive effect of melatonin against brain mitochondria DNA damage, lipid peroxidation and seizures induced by kainic acid / P.V.Mohanan, H.A.Yamamoto // *Toxicol. Lett.* – 2002. – Vol. 120. – P. 99-105.
33. mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells / D.Pozo, S.Garcna-Maurico, J.Guerrero [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2004. – Vol. 37, № 1. – P. 48-54.
34. MT₂ melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery / M.I.Masana, S.Doolen, C.Ersahin [et al.] // *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* – 2002. – Vol. 302, № 3. – P. 1295-1302.
35. Partonen T. Shote note: Melatonin-dependent intertillity / T.Partonen // *Med. Hypotheses.* – 1999. – Vol. 52, № 3. – P. 269-270.
36. Reppert S.M. Coordination of circadian timing in mammals / S.M.Reppert, D.R.Weaver // *Nature.* – 2002. – Vol. 418. – P. 935-941.
37. RNA expression of human telomerase subunits TR and TERT is differentially affected by melatonin receptor agonists in the MCF-7 tumor cell line / M.M.Leon-Blanco, J.M.Guerrero, R.J.Reiter [et al.] // *Cancer Lett.* – 2004. – Vol. 216, № 1. – P. 73-80.
38. Short-term constant light potentiation of large-magnitude circadian phase shifts induced by 8-OH-DPAT: effects on serotonin receptors and gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus / M.Duncan, K.Franklin, V.Davis [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 22, № 9. – P. 2306-2314.
39. Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT₁ and hMT₂ melatonin receptors / M.J.Gerdin, M.I.Masana, D.Ren [et al.] // *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* – 2003. – Vol. 304, № 3. – P. 931-939.
40. Wiechmann A.F. Regulation of gene expression by melatonin: a microarray survey of the rat retina / A.F.Wiechmann // *J. Pineal Res.* – 2002. – Vol. 33. – P. 178-185.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЦИРКАДИАНЫХ РИТМОВ
В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ
(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)**

В.П.Пишак, Р.Е.Булык

Резюме. В обзоре представлены современные данные о молекулярно-генетических маркерах циркадианных ритмов. Охарактеризована роль мелатонина в организме и его участие в синхронизации циркадианных ритмов. Рассмотрены мелатониновые рецепторы и генный контроль эффектов гормона. Приведены результаты собственных исследований состояния гена ранней функциональной активности *c-fos* в нейронах ведущего пейсмекера циркадианных ритмов млекопитающих – супрахиазматических ядер гипоталамуса.

Ключевые слова: мелатонин, циркадианные ритмы, молекулярно-генетические маркеры, *c-fos*.

**MOLECULAR-GENETIC MARKERS OF CIRCADIAN RHYTHMS UNDER
PHYSIOLOGICAL CONDITIONS
(A BIBLIOGRAPHICAL REVIEW AND THE AUTHOR'S OWN INVESTIGATIONS)**

V.P.Pishak, R.Ye.Bulyk

Abstract. The review presents modern data concerning molecular-genetic markers of circadian rhythms. The role of melatonin in the organism and its participation in the synchronization of circadian rhythms has been characterized, melatonin receptors and genetic control of the effects of the hormone have been considered. The results of the authors' own studies of the state of the gene of an early functional activity – *c-fos* in the neurons of the mammalian leading pacemaker of circadian rhythms – the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus.

Key words: melatonin, circadian rhythms, molecular-genetic markers, *c-fos*.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. І.І.Заморський

Buk. Med. Herald. – 2010. – Vol. 14, № 2 (54). – P. 12-19

Надійшла до редакції 22.02.2010 року