

УДК 612.826.4:612.017.2

Р. Є. Булик

Буковинський державний медичний
університет, м. ЧернівціВПЛИВ СВІТЛОВОЇ ДЕПРИВАЦІЇ НА СТАН
ГЕНА *c-FOS* У СУБ'ЯДРАХ
ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОГО ЯДРА
ГІПОТАЛАМУСА

Ключові слова: ген *c-fos*, імуноспецифічний білок *c-Fos*, паравентрикулярне ядро гіпоталамуса, світлова депривація.

Резюме. З'ясовано вплив світлової депривації на стан гену ранньої функціональної активності *c-fos* у суб'ядрах паравентрикулярного ядра (ПВЯ) гіпоталамуса щурів у різні проміжки доби. Експресія продукту цього гену – білка *c-Fos* – у тварин, котрі утримувалися в нормальних умовах чергування освітлення та темряви, демонструвала досить чіткий циркадіанний характер. Водночас, утримування тварин за умов світлової депривації призводить до вираженого десинхронізу.

Вступ

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

При вивченні 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]. Одним з основних пептидів, що проявляє ефект у регуляції секреції АКТГ, є кортикотропін-релізінг фактор (КРФ). КРФ-імунореактивна мітка виявлена, здебільшого, в медіальному дрібноклітинному суб'ядрі паравентрикулярних ядер (мдПВЯ) гіпоталамуса. Викликає зацікавленість з'ясування впливу світлової депривації на стан вказаного суб'ядра ПВЯ гіпоталамуса. При цьому важливо вивчити зміни морфо-функціональної активності і рівень експресії гену надранньої відповіді *c-fos* у структурі, а також проаналізувати можливості підвищення адаптації нейросекреторних клітин до зміни світлового режиму.

Серед широкого комплексу параметрів середовища фотоперіодизм є найнадійнішим і найстабільнішим синхронізувальним чинником для гоміотермних тварин, включаючи людину [2, 8]. Порушення світлового режиму (тривале освітлення, постійна темрява) викликає в ПВЯ негайні зміни експресії гену *c-fos* [6, 7]. Посилення його експресії інтенсифікує синтез відповідного імуноспецифічного білка *c-Fos* [5]. Згаданий пептид бере участь у механізмах синхронізації даної ак-

тивності зовнішніми циклічними впливами, зокрема циркадіанними, пов'язаними з чергуванням світла й темряви [1, 4].

Водночас відомості щодо впливу світлової депривації (постійної темряви) на діяльність вказаних субпопуляцій нейронів ПВЯ гіпоталамуса, залучених у формування механізмів циркадіанних ритмів, залишаються відносно обмеженими.

Мета дослідження

З'ясувати активність гену „надранньої відповіді” *c-fos* у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах ПВЯ гіпоталамуса за умов світлової депривації.

Матеріал і методи

Експерименти проведені на 32 статевозрілих самцях нелінійних 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 дві групи, кожна з яких, у свою чергу, складалася з двох підгруп (по вісім 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). Тварини другої групи знаходилися протягом того ж самого періоду в умовах постійної темряви (світлова депривація, DD, індукція епіфізарної гіперфункції).

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, внутрішньоочередово). 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 с-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 тричі по 10 хв відмивали у фосфатному буфері (0.1 М, рН 7.2).

Як первинні антитіла застосовували кролячі антитіла (імуноглобулін – IGG) до с-Fos (“Sigma-Aldrich”, США). Як вторинні антитіла застосовували козячий гаммаглобулін, котрий є антитілом щодо глобулінів кроля, кон’югований із флуоресцеїнізоціанатом (FITC; “Sigma-Aldrich”, США).

Ідентифікацію с-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. Аналіз зображення проводився в автоматичному режимі за допомогою пакета прикладних програм VIDAS-2.5 (“Kontron Elektronik”, Німеччина). Вимірювали площу таких ділянок та повну площу перерізу ядер нейронів СХЯ, котрі вміщували імунопозитивний матеріал (S_1 та S_x відповідно, мкм²). З урахуванням інтенсивності флуоресценції в імунопозитивних ділянках та інтенсивності флуоресценції фону (D_1 та D_0) обчислювали показники, які характеризують концентрацію с-Fos та вміст цього протеїну в ядрах імунопозитивних клітин, – $K_1 = |\lg(D_1/D_0)|$ та $C_1 = K_1 \times S_1$ (умовні одиниці – у. о.) відповідно. Оскільки дані показники є відносними, а не абсолютними величинами, далі ми іменуватимемо їх індексами концентрації та вмісту с-Fos в імунопозитивних клітинах.

Топографічну приналежність імунопозитивних нейронів до окремих структур гіпоталамуса картували згідно із стереотаксичним атласом мозку щура.

Отримані експериментальні дані обробляли з використанням пакета прикладних і статистич-

них програм VIDAS-2.5 (“Kontron Elektronik”, Німеччина) і EXCEL-2003 (“Microsoft Corp.”, США). Для вибірок усіх показників розраховували значення середньоарифметичного, середньоквадратичного відхилення та похибки середньої. Вибірки імунопозитивних клітин СХЯ, у котрих вимірювали S_1 та S_x та розраховували значення K_1 та C_1 у різних групах експериментальних тварин, склалися зі 120–153 одиниць.

Окрім того, ми розраховували щільність локалізації с-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 мм² площі зрізу. Вірогідність відмінностей значень у дослідних і контрольних групах тварин визначали за критерієм Стьюдента (t). Вірогідними вважали значення, для яких $P < 0.05$.

Обговорення результатів дослідження

За стандартного режиму освітлення у медіальних дрібноклітинних суб’ядрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса (мдПВЯ) інтенсивність флуоресценції матеріалу, імунореактивного до с-Fos, вдень менша, ніж уночі. Зокрема, о 14.00 год вона дорівнювала $26,46 \pm 1,506$ мкм², а о 02.00 год – $27,67 \pm 1,420$ мкм². Утримування тварин за світлової депривації спонукало до зміщення інтенсивності флуоресценції досліджуваного матеріалу з нічних на денні години (табл.). Як і в інтактних тварин, міжгрупової різниці у щурів, які знаходилися в умовах гіперфункції шишкоподібної залози нами не зареєстровано.

Моделювання підвищеної функціональної активності шишко-по-дібної залози віддзеркалилося і на концентрації білка с-Fos у суб’ядрах мдПВЯ. Привертало увагу зростання індексу концентрації білка с-Fos вдень у зрізах щурів, які перебували в умовах гіперфункції пінеальної залози. У цій підгрупі індекс склав $0,545 \pm 0,0128 O_{\text{ф}}$, вірогідно перевищуючи на 47,3 % такий в інтактній підгрупі (табл.). Протилежні дані отримано нами вночі: індекс вірогідно знижувався на 60,9 % відносно підгрупи, зразки в якій відбирали о 14.00 год та на 10,5 % щодо щурів, яких утримували за фізіологічних умов (табл.).

Отримані зміни визначали і коливання індексу вмісту білка с-Fos у суб’ядрах мдПВЯ гіпоталамуса. В інтактних тварин цей індекс уночі вірогідно менший (на 28,9 %), ніж удень (див. табл.).

Оскільки нами встановлено різке зростання концентрації білка с-Fos у суб’ядрах мдПВЯ вдень у щурів з епіфізарною гіперфункцією, то

Таблиця

Характеристика cFos-імунопозитивних нейронів у медіальному дрібноклітинному суб'яздрі паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів за світлової депривації ($\bar{x} \pm S_x$)

Серії експериментальних тварин	Площа матеріалу, імунореактивного до c-Fos, мкм ²	Концентрація білка c-Fos у нейроні, O _{1ф}	Уміст білка c-Fos у нейроні, O _{1ф}	Щільність c-Fos- імунопозитивних нейронів (мм ²)	Сумарний уміст білка c-Fos у структурі, O _{1ф} / мм ²
Інтактні, 14.00 год	26,46 ± 1,50	0,370 ± 0,006	9,63 ± 0,533	227 ± 15	2185 ± 144
Інтактні, 02.00 год	27,67 ± 1,42 p ₁ =0,572	0,238 ± 0,003 p ₁ <0,001	6,84 ± 0,402 p ₁ =0,002	236 ± 14 p ₁ =0,670	1614 ± 95 p ₁ =0,008
Світлова депривація, 14.00 год	30,38 ± 1,69 p=0,114	0,545 ± 0,013 p<0,001	17,57 ± 1,239 p<0,001	263 ± 19 p=0,168	4620 ± 334 p<0,001
Світлова депривація, 02.00 год	27,82 ± 0,81 p=0,929 p ₁ <0,203	0,213 ± 0,002 p<0,001 p ₁ <0,001	6,19 ± 0,215 p=0,184 p ₁ <0,001	277 ± 12 p=0,050 p ₁ =0,547	1716 ± 74 p=0,417 p ₁ <0,001

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

закономірним було виявлення високих значень індексу сумарного вмісту вказаного білка – 17,57±1,239 O_{1ф}. При нічному спостереженні в особин цієї серії індекс вірогідно знижувався, суттєво не відрізняючись від такого в інтактних тварин в аналогічний добовий проміжок (табл.).

При характеристиці інтегральної щільності матеріалу, імунореактивного до c-Fos, отримано наступні дані. Як в інтактних щурів, так і у тварин з епіфізарною гіперфункцією більші показники щільності розташування c-Fos-позитивних нейронів у суб'яздрах мдПВЯ реєстрували в нічний проміжок дослідження. Слід відмітити відсутність міжгрупової різниці в 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 всіх серіях експерименту о 02.00 год вірогідно нижчі, ніж о 14.00 год, а саме в інтактних тварин – на 26,3 %, в умовах постійної темряви на 62,8 % відповідно (табл.).

Висновок

У медіальних дрібноклітинних суб'яздрах паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів динаміка експресії продукту активності гена „надранньої відповіді” c-fos – білка c-Fos – має чітку циркадіанну ритмічність. Визначальними чинни-

ками, 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 за фізіологічної та гіперфункції епіфіза мозку о 02.00 год вірогідно нижчі, ніж о 14.00 год, а саме: в інтактних тварин – на 26,3 %, в умовах постійної темряви на 62,8 % відповідно.

Перспективи подальших досліджень

У подальшому планується провести ультрамікроскопічні, морфометричні та імуногістохімічні дослідження суб'яздер ПВЯ гіпоталамуса за різної тривалості циклу світло-темрява з метою глибшого розуміння місця їх ролі в механізмах циркадіанних ритмів головного мозку щурів.

Література. 1. Анисимов В.Н. Мелатонин: перспективи применения для профилактики рака и преждевременного старения / В. Н. Анисимов // Вестник восстановительной медицины. – 2007. – №1 (19). – С.4-7. 2. Бондаренко Л.А. Влияние постоянного освещения на суточный ритм мелатонина и структуру пинеальной железы у кроликов / Л.А. Бондаренко, Г.И. Губина-Вакулик, Н. Н. Сотник // Пробл. эндокринной патологии. – 2005. – №4. – С.38-45. 3. Гениатулина М. С. Ультраструктура субпопуляций нейронов паравентрикулярных ядер гипоталамуса при стрессе и стресс-лимитирующем действии импульсного электрического тока / М. С. Гениатулина, Ю. Н. Королев // Морфология. – 1996. – Т. 110, № 4. – С. 37–41. 4. Заморский И. И. Функциональная организация фотопериодической системы головного мозга / И. И. Заморский, В. П. Пишак // Успехи физиол. наук. – 2003. – Т.34, №4. – С.37-53. 5. Коррекция иммунно-эндокринных нарушений при экспериментальном сахарном диабете введением гипоталамических нейропептидов / Ю. М. Ко-лес-ник, А. В. Абрамов, В. А. Жулинский [и др.] // Клін. та експерим. патол. – 2006. – Т. 3, № 2. – С. 120–123. 6. Arendt J. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects / J. Arendt // J. Biol. Rhythms. – 2005. – Vol.20. – P.291-303. 7. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance / С. Ekmekcioglu //

Biomed. Pharmacother. – 2006. – Vol.60, N3. – P.97-108.
8.Schwartz W.J. Circadian rhythms: a tale of two nuclei / W.J. Schwartz // Curr. Biol. – 2009. – Vol. 19, N.11. – P.460–462.

**ВЛИЯНИЕ СВЕТОВОЙ ДЕПРИВАЦИИ НА
СОСТОЯНИЕ ГЕНА *c-FOS* В СУБЪЯДРАХ
ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОГО ЯДРА
ГИПОТАЛАМУСА**

Р. Е. Булик

Резюме. Исследовано влияние световой депривации на состояние гена ранней функциональной активности *c-fos* в субъядрах паравентрикулярного ядра (ПВЯ) гипоталамуса крыс в различные промежутки суток. Экспрессия продукта этого гена – белка *c-Fos* – у животных, которых содержали в нормальных условиях чередования освещения и темноты, демонстрировала довольно четкий циркадианный характер. В то же время, изменение длительности цикла свет-темнота приводит к выраженному десинхронизму.

Ключевые слова: ген *c-fos*, иммуноспецифический белок *c-Fos*, паравентрикулярное ядро гипоталамуса, световая депривация.

**INFLUENCE OF LIGHT DEPRIVATION ON THE
STATE OF *c-FOS* GENE IN THE SUBNUCLEI OF
THE HYPOTHALAMIC PARAVENTRICULAR
NUCLEI**

R. Ye. Bulyk

Abstract. The influence of light deprivation on the state of *c-fos* (gene of immediate functional response) in neurons of the subnuclei of paraventricular nuclei (PVNs) of the rat hypothalamus was examined; samples were taken during the subjective day and night. In animals kept under normal conditions of alternation of light and darkness, expression of the product of this gene and marker of its activation (*c-Fos* protein) demonstrated a rather clear circadian pattern. Simultaneously, a change of the light-darkness cycle results in marked desynchronization.

Key words: *c-fos* gene, immunospecific *c-Fos* protein, hypothalamic paraventricular nuclei, light deprivation.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2012.- Vol.11, №3(41).-P.15-18.

Надійшла до редакції 25.08.2012

Рецензент – проф. Г.І.Ходоровський

© Р. Є. Булик, 2012