

**Conflict of interest / Конфлікт інтересів:**

The authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Corresponding author / Адреса для кореспонденції**

Strakhovetskyi Vitalii Serhiiiovych / Страховецький Віталій Сергійович  
V. N. Karazin Kharkiv National University / Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна  
Ukraine, 61022, Kharkiv, 4 Svobody Square / Україна, 61022, м. Харків, майдан Свободи 4  
Tel.: +380976579769 / Тел.: +380976579769  
E-mail: [strahvit77@gmail.com](mailto:strahvit77@gmail.com)

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

This article is distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution (CC-BY) License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited © All authors, 2026 / Ця стаття розповсюджується на умовах ліцензії **Creative Commons Attribution (CC-BY)**, яка дозволяє необмежене використання, поширення та відтворення в будь-якому форматі за умови належного цитування оригінальної роботи © Всі автори, 2026

Received 01.11.2025 / Стаття надійшла 01.11.2025 року  
Accepted 27.02.2026 / Стаття прийнята до друку 27.02.2026 року  
Published 27.03.2026 / Опубліковано 27.03.2026 року

DOI 10.29254/2077-4214-2026-1-180-372-380

UDC 611.814.148.018:612.014.44:599.323.452

Fedorjak I. V., Bulyk R. Ye., Smetaniuk O. V., Agranov O. S.

## **EFFECT OF LIGHT DEPRIVATION ON c-fos GENE EXPRESSION IN THE PARAVENTRICULAR NUCLEI OF THE HYPOTHALAMUS IN RATS** Buchovinian State Medical University (Chernivtsi, Ukraine)

[bulyk@bdsmu.edu.ua](mailto:bulyk@bdsmu.edu.ua)

*Changes in photoperiod duration, which serves as the primary synchronizer of biological rhythms, represent a stress factor capable of disrupting the rhythmicity of somatic and visceral functions and disorganizing the mechanisms of the organism's adaptation to the effects of various factors. In this regard, studying the expression level of the immediate-early response gene c-fos in neuronal subpopulations of the paraventricular nucleus of the hypothalamus is relevant for investigating stress responses. The experiment was conducted on male white rats, which were divided into two groups (each containing two subgroups). For 14 days, the animals were maintained under different lighting conditions: group 1 (LD) under a standard photoperiod of 12.00L:12.00D, and group 2 (DD) under conditions of constant darkness 00.00L:24.00D (light deprivation). The study was performed at 14:00 and 02:00. Identification of c-Fos in histological sections of the anterior hypothalamus was carried out using the method of indirect immunofluorescence. Under standard lighting conditions (12.00L:12.00D), an increase in the fluorescence intensity of material immunoreactive to c-Fos was detected in the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats at 02:00 compared with 14:00. During the daytime, this parameter was  $26.34 \pm 1.510 \mu\text{m}^2$ , whereas it increased during the nighttime. Light deprivation caused a shift of the fluorescence intensity peak in the indicated subnuclei from the nighttime to the daytime period. The highest density of c-Fos-positive neurons in the studied hypothalamic subnuclei was recorded at 02:00 in animals maintained both under the 12.00L:12.00D regime and under 00.00L:24.00D conditions. Thus, the expression of the product of the immediate-early response gene c-fos, the c-Fos protein, in the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus exhibits a pronounced rhythmic pattern. Under conditions of light deprivation, significant changes in its production were observed. In particular, the concentration index of this protein during the daytime period of the experiment was  $0.543 \pm 0.0128 \text{ a.u.}$ , which significantly exceeded the control values.*

**Key words:** paraventricular nucleus, hypothalamus, c-fos gene, c-Fos protein, light deprivation.

### **Connection of the publication with planned research work.**

The research was conducted as part of the approved research topic of the Department of Medical Biology and Genetics at Buchovinian State Medical University: "Morphofunctional reorganization of the structures of nervous and endocrine systems at different stages of postnatal ontogenesis, and biochemical mechanisms of metabolism of signal molecules, the condition of oxidant and antioxidant systems in experimental pathology

and under the influence of glutathione and melatonin (experimental research)" (state registration number 0124U002513).

### **Introduction.**

Among the current issues in modern chronophysiology is the clarification of the involvement of neuroendocrine structures in the mechanisms of daily (circadian) rhythms in mammals [1-4]. The paraventricular nuclei of the hypothalamus play the role of the autonomic center coordinating physiological functions. They consist of

several neuronal populations – subnuclei – which differ in their structural and functional characteristics as well as in the nature of neural connections with various components of both the nervous and neuroendocrine systems [5, 6].

Changes in photoperiod duration, as the main time-setting factor, represent a stressor that desynchronizes the rhythmicity of somatic and visceral functions and disrupts the coordination and modulation of mechanisms involved in the organism's adaptation to the influence of various factors [7-9]. In order to study stress reactions and the effects of stress-limiting factors (in particular, the hormone melatonin), the investigation of neuronal subpopulations of the paraventricular nucleus of the hypothalamus is of considerable interest [10]. A major factor exerting a significant effect on the regulation of adrenocorticotrophic hormone (corticotropin) secretion is corticotropin-releasing factor. Immunoreactive labeling for corticotropin-releasing factor has been detected predominantly in the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the hypothalamus [11]. Therefore, the study of the influence of constant darkness (light deprivation) on the state of these hypothalamic subnuclei is of particular interest [12-15]. In particular, it is important to investigate the expression level of the immediate-early response gene *c-fos* in these hypothalamic structures. It should be noted that a potent (although not the only) inhibitor of *c-fos* gene transcription is the product of its expression – the c-Fos protein [16]. Investigation of c-Fos protein expression is widely used to identify the functional activity of neurons as components of specific conduction pathways within the nervous system. Disturbances in the lighting regime (constant darkness) cause immediate changes in the level of *c-fos* gene expression in the paraventricular nuclei. Intensification of the expression of this gene stimulates the synthesis of the corresponding immunospecific c-Fos protein [17]. The latter, in turn, participates in the mechanisms of synchronization of activity by exogenous cyclic influences (including circadian rhythms associated with the alternation of light and darkness). Information concerning the influence of photoperiod modifications on the activity of the above-mentioned neuronal subpopulations of the paraventricular nucleus of the hypothalamus involved in circadian rhythm mechanisms remains insufficiently described and requires further detailed investigation.

#### **The aim of the study.**

To determine the dynamics of *c-fos* gene expression in the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats under conditions of light deprivation.

#### **Object and research methods.**

Experimental studies involved 28 male outbred white rats aged 24-27 months. The animals were kept under standard vivarium conditions with constant air temperature and humidity and had free access to food and drinking water. The experimental animals were divided into two groups, each of which was further subdivided into two subgroups (seven animals in each).

Animals of the first group (intact) were maintained for 14 days under a standard lighting regime of 12.00L:12.00D (LD; illumination provided by fluorescent lamps from 08:00 to 20:00, with the illumination level at the cage level reaching 500 lx). Rats of the second group

were kept for 14 days under conditions of constant darkness (light deprivation – DD, modeling hyperfunction of the pineal gland in relation to melatonin synthesis).

After completion of the 14-day period, on the following day at 14:00 and 02:00, the animals were removed from the experiment by decapitation under etaminal anesthesia (40.0 mg/kg, intraperitoneally). The brains were immediately removed and placed in 10% formalin solution in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) for 20 hours at room temperature. After a standard dehydration procedure and infiltration with chloroform and paraffin, the samples were embedded in paraffin.

The scientific study was conducted in accordance with the main provisions of the Law of Ukraine No. 3447-IV "On the Protection of Animals from Cruel Treatment," the Council of Europe Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (March 18, 1986), Directive 2010/63/EU of the European Union, and the orders of the Ministry of Health of Ukraine No. 690 (September 23, 2009) and No. 944 (December 14, 2009), as well as Order of the Ministry of Education and Science No. 249 (March 1, 2012). The research protocol was approved by the Biomedical Ethics Commission of BSMU on February 15, 2024.

To identify c-Fos in histological sections of the anterior hypothalamus, the indirect immunofluorescence method was used. First, histological sections with a thickness of 14  $\mu\text{m}$  were deparaffinized in xylene, followed by rehydration in ethanol solutions of six descending concentrations (100-40%) and washing three times for 10 minutes in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2).

Rabbit antibodies (immunoglobulin IgG) against c-Fos ("Sigma-Aldrich", USA) were used as primary antibodies. Initially, the sections were incubated for 45 minutes at 37°C in 0.3% Triton X-100 solution ("Sigma-Aldrich", USA) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) with the addition of 1.0% goat serum. Subsequently, primary antibodies to c-Fos (1:1000) were applied to serial sections and incubated for 24 hours in a humid chamber at 4°C. After washing off excess primary antibodies in 0.1 M phosphate buffer, the histological sections were incubated for 60 minutes at 37°C with secondary antibodies diluted 1:200. Goat gamma-globulin, an antibody against rabbit globulins conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC; "Sigma-Aldrich", USA), was used as the secondary antibody. After incubation, the sections were washed with phosphate buffer (0.1 M) and placed in a mixture of glycerol and phosphate buffer (ratio 9:1) for subsequent examination using fluorescence microscopy.

The specificity of antibody binding was controlled using the same procedure but without the incubation step with primary antibodies to c-Fos.

Identification of c-Fos protein in the studied neurons of the anterior hypothalamus and determination of its content were performed using a VIDAS-386 computerized digital image analysis system ("Kontron Elektronik", Germany) in the ultraviolet spectrum. To obtain fluorescence images, a high-emission filter with excitation and emission ranges of 370-390 nm and 420-450 nm, respectively, was used, along with a specialized objective with a wide aperture. The images were introduced into the VIDAS-386 image analysis system

using an 8-bit CCD camera COHU-4922 ("COHU Inc.", USA). At the same time, the photobleaching effect associated with gradual destruction of FITC molecules under prolonged ultraviolet irradiation was prevented. After introducing the immunofluorescent image, digitization was performed using a densitometric scale with 256 grayscale gradations. Image analysis was carried out in an automatic mode using the VIDAS-2.5 software package ("Kontron Elektronik", Germany). Identification of areas of the preparations in which fluorescence intensity significantly exceeded background values (characteristic of nonspecific fluorescence) was performed using the corresponding program. The area of these regions and the total cross-sectional area of neuronal nuclei of the rat paraventricular nucleus containing immunopositive material ( $S_i$  and  $S_n$ , respectively,  $\mu\text{m}^2$ ) were measured. Indicators characterizing the concentration of c-Fos protein and its content in the nuclei of immunopositive cells were calculated as  $\text{Con}_i = |\lg(D_i/D_0)|$  and  $C_i = \text{Con}_i \times S_i$  (arbitrary units), taking into account fluorescence intensity in immunopositive regions and background fluorescence intensity ( $D_i$  and  $D_0$ , respectively). Since these parameters are relative rather than absolute values, they were subsequently referred to as indices of concentration and content of c-Fos protein in immunopositive hypothalamic neurons.

Mapping of the topographic localization of immunopositive neurons to specific structures of the anterior hypothalamus was performed using a stereotaxic atlas of the rat brain.

Processing of the obtained experimental data was performed using the VIDAS-2.5 software package ("Kontron Elektronik", Germany) and EXCEL ("Microsoft Corp.", USA). For all indicators, the mean value, standard deviation, and standard error of the mean were calculated. In different groups of experimental animals, samples of immunopositive neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in which  $S_i$  and  $S_n$  were measured and  $\text{Con}_i$  and  $C_i$  values were calculated consisted of 120-153 units.

In addition, the density of localization of c-Fos-immunopositive cells within the studied sections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus was calculated. For this purpose, the number of such neurons was first determined in several randomly selected fields of view (4-7 for each rat), and the average number of such cells per  $1 \text{ mm}^2$  of the section area was calculated. To determine the statistical significance of differences between control and experimental groups of animals, Student's t-test ( $t$ ) was used. Values with  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

#### Research results and their discussion.

Under the 12.00L:12.00D lighting regime, an increase in the fluorescence intensity of material immunoreactive to c-Fos in the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats was recorded at 02:00 compared with 14:00. During the daytime observation period, the fluorescence intensity of material immunoreactive to c-Fos was  $26.34 \pm 1.510 \mu\text{m}^2$ , whereas at 02:00 it reached  $27.50 \pm 1.422 \mu\text{m}^2$ . Changes in the duration of the light regime caused a shift in fluorescence intensity in the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the hypothalamus from the nighttime to the daytime period.

When calculating the cross-sectional area index of the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus, it was found that in the control group of animals during the daytime its value was  $34.54 \pm 0.564 \mu\text{m}^2$ , whereas at 02:00 it significantly decreased to  $32.12 \pm 0.412 \mu\text{m}^2$ . Under conditions of light deprivation, a significant decrease in this parameter during the daytime observation period by 25.45% was observed, while at 02:00 this parameter did not undergo substantial changes compared with the control values. At the same time, a shift in the larger subnuclear area index from 14:00 to 02:00 was noted.

Under lighting regimes of 12.00L:12.00D and 24.00L:00.00D, intergroup differences were observed when analyzing the obtained parameters both during the day and at night. The indices of normalized areas of the studied hypothalamic subnuclei in rats of the intact group at 14:00 were 77.4%, and at night 86.8% relative to the value of the total cross-sectional area of the hypothalamic structures, and the detected changes were statistically significant. The mean value of this parameter at 14:00 was within 90.2%, whereas at 02:00 it was 74.9% of the relative total area. Light deprivation resulted in a shift of the maximal values of the normalized area. During the studied time intervals, the parameters did not show statistically significant differences between each other; however, they were higher compared with the values in rats of the intact group during the corresponding periods of the day.

Modification of the photoperiod was also reflected in the concentration index of the c-Fos protein in the studied hypothalamic subnuclei of rats. An increase in this index was detected during the daytime period of the experiment in hypothalamic sections of rats maintained under light deprivation. In this subgroup, the index was  $0.543 \pm 0.0128 \text{ a.u.}$ , which was 47.5% higher than that observed in the subgroup of intact rats. During the nighttime observation stage, the opposite pattern was observed: the index was 61.0% lower compared with the subgroup of animals whose samples were collected at 14:00, and 10.4% lower compared with animals maintained under the 12.00L:12.00D lighting regime (fig. 1).

An increase was also observed in the index of the total content of c-Fos protein, which reached  $17.82 \pm 1.256$

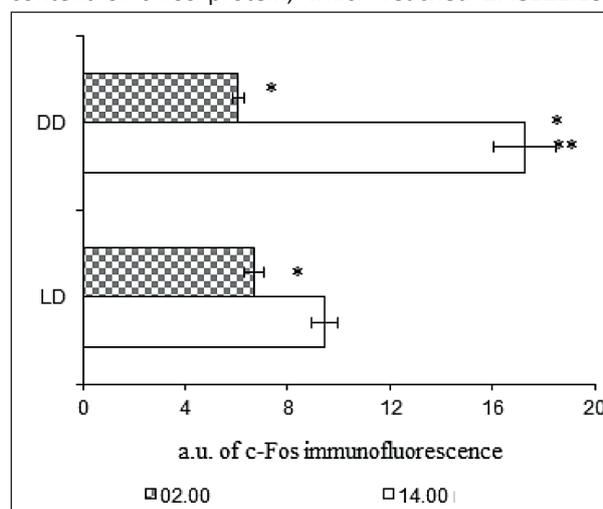


Figure 1 – Fluctuations in the content index of c-Fos protein in the studied hypothalamic structures of the rat under conditions of light deprivation.

a.u., as a significant rise in the concentration of c-Fos protein in the studied hypothalamic subnuclei of rats was recorded at 14:00 in animals maintained under conditions of constant darkness. During the nighttime stage of the experiment in rats of this series, the index significantly decreased; however, no significant differences were found compared with the corresponding observation period in the group of intact animals.

Considering the values of the integral density of material immunoreactive to c-Fos, the highest density of localization of c-Fos-positive neurons in the studied hypothalamic subnuclei of rats maintained under lighting regimes of 12.00L:12.00D and 00.00L:24.00D was recorded at 02:00. It should be noted that no statistically significant differences between the groups were observed in all formed observation series. This may be explained by the considerable variability of the indicator in the areas of hypothalamic subnuclear sections randomly selected for analysis.

The demonstrated changes suggest that an important factor influencing the integral density index of c-Fos in the tissue of the studied hypothalamic subnuclei of the animals was the alteration in the concentration index of c-Fos protein, as well as the density index of c-Fos protein content in the hypothalamic subnuclei of rats. The integral density index of c-Fos in each of the two studied series at 02:00 was significantly lower than at 14:00 (fig. 2).

Thus, under the standard lighting regime (12.00L:12.00D) the index decreased by 26.3%, whereas under conditions of light deprivation (00.00L:24.00D) it decreased by 62.9%, respectively.

**Conclusions.**

1. The expression of the product of the activity of the immediate-early response *c-fos* gene – the c-Fos protein – in the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus is characterized by circadian rhythmicity.

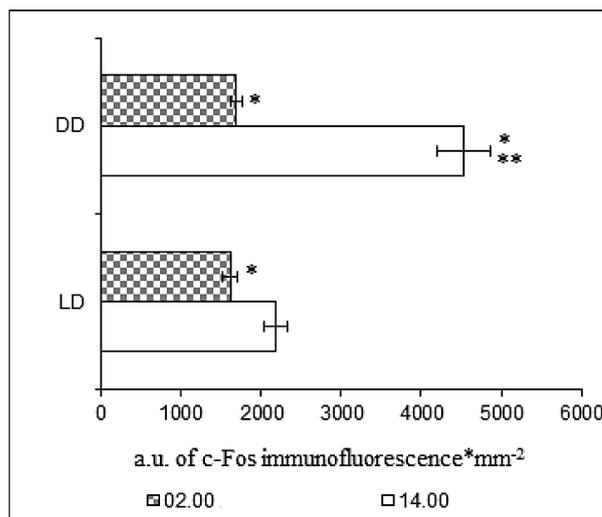


Figure 2 – Daily variations in the index of the total content of c-Fos protein in the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus under conditions of light deprivation.

2. Under conditions of light deprivation, the production of c-Fos protein undergoes significant changes. In particular, the concentration index of this protein during the daytime period of the experiment was  $0.543 \pm 0.0128$  a.u., which was significantly higher than the control values.

**Prospects for further research.**

Further studies are planned to determine the dynamics of *c-fos* gene expression in the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus under conditions of prolonged illumination (light stress) in order to gain a deeper understanding of the mechanisms by which brain structures are involved in the regulation of neuroendocrine processes.

DOI 10.29254/2077-4214-2026-1-180-372-380

УДК 611.814.148.018:612.014.44:599.323.452

Федоряк І. В., Булик Р. Є., Сметанюк О. В., Агранов О. С.

**ВПЛИВ СВІТЛОВОЇ ДЕПРИВАЦІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНА *c-fos* У ПРИШЛУНОЧКОВИХ ЯДРАХ ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ**

Буковинський державний медичний університет (м. Чернівці, Україна)

bulyk@bdsmu.edu.ua

*Зміни тривалості фотоперіоду, що виступає основним синхронізатором біологічних ритмів, є стресовим чинником, здатним порушувати ритмічність соматичних і вісцеральних функцій та дезорганізувати механізми адаптації організму до дії різних чинників. У зв'язку з цим актуальним є дослідження рівня експресії гена «надранньої» відповіді *c-fos* у субпопуляціях нейронів пришлуночкового ядра гіпоталамуса з метою вивчення стресових реакцій. Експеримент виконано на самцях білих щурів, яких розподілили на дві групи (кожна містила по дві підгрупи). Протягом 14 діб тварин утримували за різних світлових режимів: 1-шу групу (LD) – при стандартному фотоперіоді 12.00С:12.00Т, 2-гу групу (DD) – в умовах постійної темряви 00С:24.00Т (світлова депривація). Дослідження проводили о 14.00 та 02.00 год. Ідентифікацію *c-Fos* у гістологічних зрізах переднього гіпоталамуса здійснювали методом непрямої імунофлуоресценції. За умов стандартного освітлення 12.00С:12.00Т у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах пришлуночкового ядра гіпоталамуса щурів виявлено підвищення інтенсивності флуоресценції матеріалу, імунореактивного до *c-Fos*, о 02.00 год порівняно з 14.00 год. У денний період цей показник становив  $26,34 \pm 1,510$  мкм², тоді як у нічний час він зростав. Світлова депривація призводила до зміщення піку інтенсивності флуоресценції в зазначених суб'ядрах із нічного на денний проміжок. Найвищу щільність розташування *c-Fos*-позитивних нейронів у досліджуваних суб'ядрах гіпоталамуса зафіксовано о 02.00 год у тварин, які перебували як у режимі 12.00С:12.00Т, так і в умовах 00С:24.00Т. Отже, експресія продукту гена*

«надранньої відповіді» *c-fos* – білка *c-Fos* – у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах приشلучкового ядра гіпоталамуса щурів має виражений ритмічний характер. За умов світлової депривації спостерігаються суттєві зміни його продукції: зокрема, індекс концентрації цього протеїну в денний період експерименту становив  $0,543 \pm 0,0128$  Оіф і достовірно перевищував контрольні значення.

**Ключові слова:** приشلучкове ядро, гіпоталамус, ген *c-fos*, білок *c-Fos*, світлова депривація.

### **Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.**

Дослідження виконані в рамках затвердженої теми науково-дослідної роботи кафедри медичної біології та генетики Буковинського державного медичного університету «Морфофункціональні перебудови структур нервової та ендокринної систем у різні періоди постнатального онтогенезу та біохімічні механізми метаболізму сигнальних молекул, стан оксидантної та антиоксидантної систем за умов експериментальних патологій і впливу глутатіону та мелатоніну (експериментальне дослідження)» (державний реєстраційний номер 0124U002513).

### **Вступ.**

Поміж актуальних питань сучасної хронофізіології є з'ясування участі нейроендокринних структур у механізмах добових (циркадних) ритмів ссавців [1-4]. Роль вегетативного центру координації функцій належить приشلучковим ядрам гіпоталамуса. До їх складу входить низка нейронних популяцій – суб'ядер, що, у свою чергу, відрізняються за структурно-функціональними особливостями, а також характером нервових зв'язків з різними відділами як нервової, так і нейроендокринної систем [5, 6].

Зміни тривалості фотоперіоду, як основного часозадавача, є стресовим чинником, що десинхронізує ритмічність соматичних і вісцеральних функцій та порушує координацію і модуляцію механізмів пристосування організму до дії різноманітних чинників [7-9]. З метою вивчення стресових реакцій та ефектів стрес-лімітуючих чинників (зокрема, гормону мелатоніну) актуальним є вивчення субпопуляцій нейронів приشلучкового ядра гіпоталамуса [10]. Провідним чинником, що має вагомий ефект у регуляції секреції адренкортикотропного гормону (кортикотропіну), є кортикотропін-рилізінг фактор. Імунореактивна мітка до кортикотропін-рилізінг фактора виявлена, переважно, в медіальних дрібноклітинних суб'ядрах приشلучкового ядра гіпоталамуса [11]. Тому цікавим постає дослідження впливу постійної темряви (світлової депривація) на стан цих суб'ядер гіпоталамуса [12-15]. Зокрема, важливим є вивчення рівня експресії гена «надранньої» відповіді *c-fos* у вказаних гіпоталамічних структурах. Слід зазначити, що потужним (хоча і не єдиним) інгібітором транскрипції гена *c-fos* служить продукт його експресії – білок *c-Fos* [16]. Вивчення експресії білка *c-fos* активно використовується для ідентифікації функціональності нейронів – ланки специфічних провідних шляхів у нервовій системі. Порушення режиму освітлення (постійна темрява) спричиняє в приشلучкових ядрах негайні зміни рівня експресії гена *c-fos*. Інтенсифікація експресії вказаного гена стимулює синтез відповідного імуноспецифічного білка *c-Fos* [17]. Останній, у свою чергу, залучений у механізми синхронізації активності екзогенними циклічними впливами (у т.ч. циркадними, що пов'язані з чергуванням світла й темряви). Відомості, що торкаються з'ясуван-

ня впливів модифікацій фотоперіоду на діяльність вищенаведених субпопуляцій нейронів приشلучкового ядра гіпоталамуса, задіяних у механізми циркадних ритмів, висвітлені недостатньо і потребують детального вивчення.

### **Мета дослідження.**

З'ясувати динаміку експресії гена *c-fos* у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах приشلучкового ядра гіпоталамуса щурів за світлової депривації.

### **Об'єкт і методи дослідження.**

В експериментальні дослідження залучено 28 самців безпорідних білих щурів віком 24-27 міс. Тварини перебували за стандартних умов віварію при сталій температурі повітря та вологості приміщення і мали вільний доступ до питної та їжі. Експериментальні тварини поділено на дві групи, у кожній з яких було ще по дві підгрупи (по сім тварин).

Тварин першої групи (інтактних) утримували 14 діб за умов звичайного режиму освітлення 12.00С:12.00Т (LD, освітлення за допомогою люмінесцентних ламп з 08.00 год до 20.00 год, показник освітленості на рівні кліток із тваринами становив 500 лк). Щури з другої групи знаходилися впродовж 14 діб за умов постійної темряви (світлова депривація – DD, моделювання гіперфункції шишкоподібної залози щодо синтезу мелатоніну).

Після завершення 14-денного періоду наступного дня о 14.00 і 02.00 тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг, в/очеревинно). Негайно вилучали мозок тварин і поміщали в 10 % розчин формаліну на фосфатному буфері (0.1 М, рН 7.2) на 20 год при кімнатній температурі. Провівши стандартну процедуру зневоднення та просочення хлороформом і парафіном зразки здійснювали заливку в парафін.

Наукові дослідження виконані з дотриманням основних положень Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях (від 18.03.1986 р.), Директиви Європейського Союзу 2010/63/EU та наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р. і наказу МОН № 249 від 01.03.2012 р. Протокол наукового дослідження затверджений Комісією з питань біомедичної етики БДМУ від 15.02.2024 р.

З метою ідентифікації *c-Fos* у гістологічних зрізах переднього гіпоталамуса тварин використовували метод непрямої імуофлуоресценції. Насамперед депарафінували в ксилолі гістологічні зрізи завтовшки 14 мкм, а згодом здійснювали процес регідrataції в розчинах етанолу 6 низхідних концентрацій (100-40%) та тричі тривалістю 10 хв відмивали в фосфатному буфері (0,1 М, рН 7,2).

В якості первинних антитіл використовували кролячі антитіла (імуноглобулін – IGG) до *c-Fos* ("Sigma-Aldrich", США). Спочатку впродовж 45 хв здійснювали інкубацію зрізів при 37°C у 0,3% розчині Triton X-100

("Sigma-Aldrich", США) на 0.1 М фосфатному буфері (рН 7.2) з додаванням 1,0% розчину козячої сироватки. Згодом на послідовні серійні зрізи проводили нанесення первинних антитіл до с-Fos (1:1000) та впродовж 24 год здійснювали інкубацію у вологій камері за умов температури 4°C. Після відмивання надлишку первинних антитіл у 0.1 М фосфатному буфері проводили інкубацію гістологічних зрізів впродовж 60 хв при 37°C з вторинними антитілами при розведенні у співвідношенні 1:200. В якості вторинних антитіл використовували козячий гаммаглобулін, який є антитілом відносно глобулінів кролика, кон'югований з флуоресцеїнізоціанатом (FITC; "Sigma-Aldrich", США). Після здійснення інкубації гістологічні зрізи проводили промивання фосфатним буфером (0.1 М) і поміщали в суміш гліцерину й фосфатного буфера (співвідношення 9:1) для подальшого дослідження за допомогою люмінесцентної мікроскопії.

Контроль специфічності зв'язування антитіл здійснювали аналогічним шляхом, не проводячи етап інкубації з первинними антитілами до с-Fos.

Ідентифікацію білка с-Fos у досліджуваних нейронах переднього гіпоталамуса і дослідження вмісту цього протеїну проводили із використанням комп'ютерної системи цифрового аналізу зображення VIDAS-386 ("Kontron Elektronik", Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі. З метою одержання флуоресцентного зображення застосовували високоемісійний фільтр із діапазонами збудження та емісії 370-390 нм і 420-450 нм відповідно, а також спеціалізований об'єктив з широкою апертурою. Зображення вводили в комп'ютерну систему аналізу зображень VIDAS-386, використовуючи 8-бітову CCD-камеру COHU-4922 ("COHU Inc.", США). Водночас унеможлилювали прояв ефекту "вигорання" препарату, що пов'язаний із поступовим руйнуванням молекул FITC під дією впливу тривалого ультрафіолетового випромінювання. Після уведення імунофлуоресцентного зображення проводили оцифрування з використанням денситометричної шкали з 256 градаціями сірого кольору. Проведення аналізу зображення відбувалося в автоматичному режимі з використанням пакета прикладних програм VIDAS-2.5 ("Kontron Elektronik", Німеччина). Ідентифікацію ділянок препаратів, в яких інтенсивність флуоресценції була вірогідно вищою щодо фонових значень (характерні т.з. неспецифічній флуоресценції) проведено з використанням відповідної програми. Здійснювали вимірювання площі вказаних ділянок та повної площі перерізу ядер нейронів приشلучкового ядра гіпоталамуса щура, які містили імунопозитивний матеріал ( $S_i$  та  $S_n$  відповідно,  $\text{мкм}^2$ ). Проводили обчислення показників, що характеризують концентрацію білка с-Fos та його вміст в ядрах імунопозитивних клітин,  $K_i = |\lg(D_i/D_0)|$  та  $C_i = K_i \cdot S_i$  (умовні одиниці – у.о.) відповідно, враховуючи інтенсивність флуоресценції в імунопозитивних ділянках та інтенсивність флуоресценції фону ( $D_i$  та  $D_0$ ). Так, як дані показники є відносними величинами, а не абсолютними, у подальшому ми називатимемо їх як індекси концентрації та вмісту білка с-Fos в імунопозитивних нейронах гіпоталамуса.

Проведення картування топографічної приналежності імунопозитивних нейронів до окремих структур переднього гіпоталамуса здійснювали із використанням стереотаксичного атласу мозку щура.

Опрацювання отриманих нами даних експериментальних досліджень здійснювали з використанням пакета прикладних і статистичних програм VIDAS-2.5 ("Kontron Elektronik", Німеччина) і EXCEL ("Microsoft Corp.", США). Для отримання вибірок всіх показників нами розраховані значення таких показників як середньоарифметичне, середньоквадратичне відхилення та похибки середнього. У різних групах експериментальних тварин вибірки імунопозитивних нейронів приشلучкового ядра гіпоталамуса, в яких нами виміряно  $S_i$  та  $S_n$  і розраховано значення  $K_i$  та  $C_i$ , склалися із 120-153 одиниць.

Крім вищенаведеного, ми також розраховували щільність локалізації с-Fos-імунопозитивних клітин у межах досліджуваних зрізів приشلучкового ядра гіпоталамуса. З цією метою нами попередньо визначено кількість вказаних нейронів у кількох (4-7 для кожного щура) випадково відібраних полях зору і розраховано значення середньої кількості подібних клітин на 1  $\text{мм}^2$  площі перерізу. Для встановлення вірогідності відмінностей значень між контрольними і дослідними групами тварин використовували критерій Стюдента ( $t$ ). Значення, для яких  $p < 0,05$  вважали статистично вірогідними.

#### Результати дослідження та їх обговорення.

В умовах режиму освітлення 12.00С:12.00Т у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах приشلучкового ядра гіпоталамуса щурів ми реєстрували зростання показника інтенсивності флуоресценції матеріалу, що є імунореактивним до с-Fos о 02.00 год, порівняно з 14.00 год. Так, у денний період спостереження інтенсивність флуоресценції матеріалу, імунореактивного до с-Fos перебувала на рівні  $26,34 \pm 1,510 \text{ мкм}^2$ , а при дослідженні о 02.00 год становила –  $27,50 \pm 1,422 \text{ мкм}^2$ . Зміни тривалості світлового режиму спричинили зміщення інтенсивності флуоресценції у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах приشلучкового ядра гіпоталамуса з нічного на денний проміжок.

При обчисленні індексу площі перерізу медіальних дрібноклітинних суб'ядер приشلучкового ядра гіпоталамуса щурів виявлено, що в контрольній групі тварин у денний період її значення становило  $34,54 \pm 0,564 \text{ мкм}^2$ , а о 02.00 год вірогідно знижувався до  $32,12 \pm 0,412 \text{ мкм}^2$ . В умовах світлової депривації нами відмічено вірогідне зниження площі у денний період спостереження на 25,45%, а о 02.00 год цей показник не зазнавав істотних змін порівняно з такою в контролі. У той же час, слід відмітити зміщення показника більшої площі суб'ядер з 14.00 на 02.00 год спостереження.

В умовах режиму освітлення 12.00С:12.00Т та 24.00С:00Т нами відмічено міжгрупові відмінності при аналізі отриманих показників як вдень, так і вночі. Показники нормованих площ досліджуваних суб'ядер гіпоталамуса щурів інтактної групи о 14.00 год становили 77,4%, а вночі – 86,8% щодо показника повної площі перерізу гіпоталамічних структур, а виявлені зміни – вірогідні. Середнє значення показника о 14.00 год перебувало у межах 90,2%, а о 02.00 год – 74,9% відносної повної площі. Світлова депривація призводила до зміщення максимальних значень нормованої площі. У досліджувані проміжки показники між собою не мали вірогідних відмінностей, однак були більшими щодо показників щурів інтактної групи в аналогічні періоди доби.

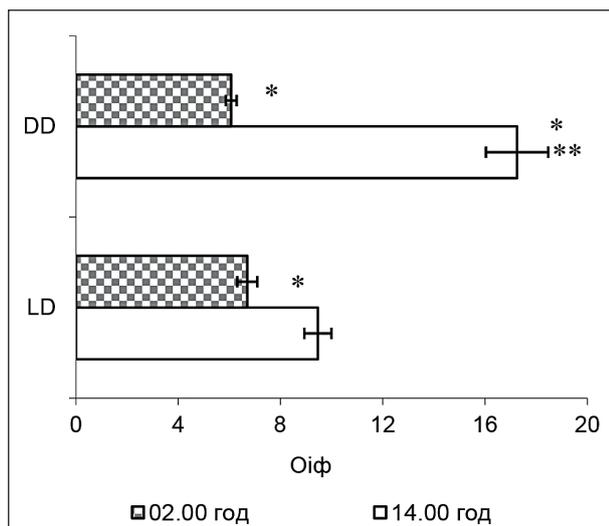


Рисунок 1 – Коливання індексу вмісту білка c-Fos у досліджуваних гіпоталамічних структурах щура при світловій депривації.

Модифікація фотоперіоду віддзеркалилися і на показнику концентрації білка c-Fos у досліджуваних суб'ядрах гіпоталамуса щурів. Зростання індексу виявляли у денний проміжок експерименту в зрізах гіпоталамуса щурів, які перебували в умовах світлової депривації. У цій підгрупі індекс становив  $0,543 \pm 0,0128 O_{if}$ , при цьому був вірогідно вищим на 47,5% щодо такого у підгрупі інтактних щурів. Під час нічного етапу спостереження нами встановлено протилежну картину, а саме індекс був вірогідно нижчим на 61,0% відносно такого у підгрупі тварин, забір зразків в якій здійснювали о 14.00 год та на 10,4% щодо тварин, які перебували в умовах світлового режиму 12.00С:12.00Т (рис. 1).

Нами встановлено і збільшення такого показника, як індекс сумарного вмісту білка c-Fos, що становив  $17,82 \pm 1,256 O_{if}$ , так, як констатовано істотне зростання концентрації білка c-Fos у досліджуваних суб'ядрах гіпоталамуса щурів о 14.00 год у тварин, що перебували в умовах постійної темряви. При нічному етапі експерименту у щурів даної серії індекс був вірогідно знижувався, однак істотних відмінностей щодо такого в аналогічний проміжок спостереження в групі інтактних тварин не виявлено.

Беручи до уваги значення інтегральної щільності матеріалу, імунореактивного до c-Fos, констатовано найбільші показники щільності розташування c-Fos-позитивних нейронів у досліджуваних суб'ядрах гіпоталамуса щурів, яких утримували за режимів освітлення – 12.00С:12.00Т та 00С:24.00Т о 02.00 год спостереження. Слід звернути увагу на відсутність вірогідної відмінності між групами у всіх сформованих серіях спостереження. Це, ймовірно, зумовлено значною похибкою показника у ділянках

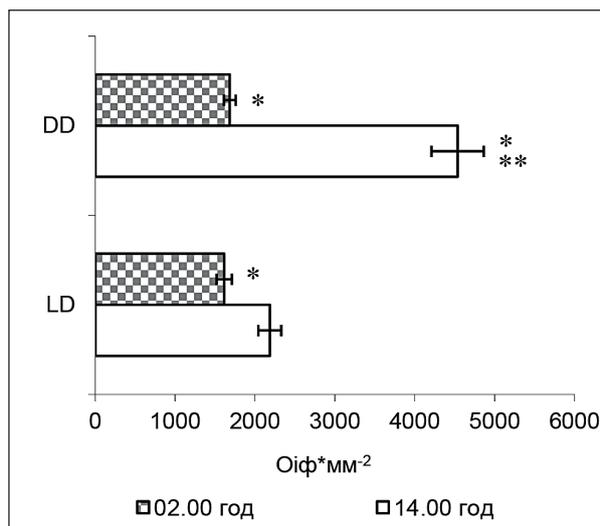


Рисунок 2 – Добові варіації індексу сумарного вмісту білка c-Fos у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах пришлуночкового ядра гіпоталамуса щурів за умов світлової депривації.

зрізів гіпоталамічних суб'ядер, що були випадково відібраних для дослідження.

Продемонстровані зміни створюють підстави зробити припущення, що вагомим чинником, який здійснив суттєвий вплив на показник індексу інтегральної щільності c-Fos у тканині досліджуваних суб'ядер гіпоталамуса тварин слугували зміни показника концентрації білка c-Fos, а також щільності індексу вмісту білка c-Fos у гіпоталамічних суб'ядрах щурів. Такий показник, як індекс інтегральної щільності c-Fos у кожній з двох досліджуваних серій о 02.00 год був вірогідно меншим, ніж о 14.00 год (рис. 2).

Так, в умовах стандартного світлового режиму (12.00С:12.00Т) – на 26,3%, а в умовах світлової депривації (00С:24.00Т) – на 62,9% відповідно.

#### Висновки.

1. Експресія продукту активності гена „надранньої відповіді” c-fos – білка c-Fos у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах пришлуночкового ядра гіпоталамуса щурів характеризується циркадною ритмічністю.

2. В умовах світлової деривації продукція білка c-Fos зазнає істотних змін. Зокрема, індекс концентрації вказаного протеїну у денний проміжок експерименту становив  $0,543 \pm 0,0128 O_{if}$  і був вірогідно вищим від контрольних показників.

#### Перспективи подальших досліджень.

У подальшому планується з'ясувати динаміку експресії гена c-fos у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах пришлуночкового ядра гіпоталамуса щурів за тривалого освітлення (світлового стресу) для глибшого пізнання механізмів залучення мозкових структур у регуляцію нейроендокринних процесів.

### References / Література

1. Drogozov S M, Derymedvid' L V, Seredyns'ka N M, Luk'yanchuk V D, Shtroblyna M V, Panfilova A L, et al. Circadian Rhythms: Physiological and Pathophysiological Aspects. 2024;54:175-81. Neurophysiology. DOI: 10.1007/s11062-024-09949-3.
2. Beauchamp M T, Lundgren J D. A systematic review of bright light therapy for eating disorders. The Primary Care Companion for CNS Disorders. 2016;18:26718. DOI: 10.4088/PCC.16r02008.
3. Tähkämö L, Partonen T, Pesonen AK. Systematic review of light exposure impact on human circadian rhythm. Chronobiol Int. 2019;36(2):151-70. DOI: 10.1080/07420528.2018.1527773.
4. Ota S M, Kong X, Hut R, Suchecki D, Meerlo P. The impact of stress and stress hormones on endogenous clocks and circadian rhythms. Front Neuroendocrinol. 2021;63:100931. DOI: 10.1016/j.yfme.2021.100931.
5. Begemann K, Neumann A M, Oster H. Regulation and function of extra-SCN circadian oscillators in the brain. Acta Physiol (Oxf). 2020;229:e13446. DOI: 10.1111/apha.13446.

6. Grzęda E, Ziarniak K, Sliwowska JH. The paraventricular nucleus of the hypothalamus – the concertmaster of autonomic control. Focus on blood pressure regulation. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2023;83(1):34-44. DOI: DOI: [10.55782/ane-2023-004](https://doi.org/10.55782/ane-2023-004).
7. Chen D, Zhang T, Lee TH. Cellular Mechanisms of Melatonin: Insight from Neurodegenerative Diseases. *Biomolecules*. 2020;10(8):1158. DOI: [10.3390/biom10081158](https://doi.org/10.3390/biom10081158).
8. Cai ZJ. Hypothalamic aging and hormones. *Vitam Horm*. 2021;115:15-37. DOI: [10.1016/bs.vh.2020.12.002](https://doi.org/10.1016/bs.vh.2020.12.002).
9. Asefy Z, Khusro A, Mammadova S, Hoseinnejhad S, Eftekhari A, Alghamdi S, et al. Melatonin hormone as a therapeutic weapon against neurodegenerative diseases. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2021;67(3):99-106. DOI: [10.14715/cmb/2021.67.3.13](https://doi.org/10.14715/cmb/2021.67.3.13).
10. Wu H, Dunnett S, Ho YS, Chang RC. The role of sleep deprivation and circadian rhythm disruption as risk factors of Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol*. 2019;54:100764. DOI: DOI: [10.1016/j.yfrne.2019.100764](https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100764).
11. Kalsbeek A, Buijs RM. Organization of the neuroendocrine and autonomic hypothalamic paraventricular nucleus. *Handb Clin Neurol*. 2021;180:45-63. DOI: [10.1016/B978-0-12-820107-7.00004-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820107-7.00004-5).
12. Yan M, Lv X, Zhang S, Song Z, Hu B, Qing X, et al. Alleviation of inflammation in paraventricular nucleus and sympathetic outflow by melatonin efficiently repairs endplate porosities and attenuates spinal hyperalgesia. *Int Immunopharmacol*. 2025;149:114213. DOI: [10.1016/j.intimp.2025.114213](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2025.114213).
13. Qin C, Li J, Tang K. The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases. *Endocrinology*. 2018;159(9):3458-3472. DOI: [10.1210/en.2018-00453](https://doi.org/10.1210/en.2018-00453).
14. Sasaki R, Asami T, Takaishi M, Nakamura R, Roppongi T, Yoshimi A, et al. Smaller hypothalamic subregion with paraventricular nucleus in patients with panic disorder. *Brain Imaging Behav*. 2024;18(4):701-9. DOI: [10.1007/s11682-023-00834-x](https://doi.org/10.1007/s11682-023-00834-x).
15. Stanford SC. Recent developments in research of melatonin and its potential therapeutic applications. *Br J Pharmacol*. 2018;175(16):3187-9. DOI: [10.1111/bph.14371](https://doi.org/10.1111/bph.14371).
16. Luyck K, Scheyltjens I, Nuttin B, Arckens L, Luyten L. c-Fos expression following context conditioning and deep brain stimulation in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. *Sci Rep*. 2020;10(1):20529. DOI: [10.1038/s41598-020-77603-z](https://doi.org/10.1038/s41598-020-77603-z).
17. Li Y, Du S, Sun J, Guo X, Zhang Q, Fan P, et al. C-Fos protein expression in the mouse brain: effects of nicotine aerosol. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2025;505:117588. DOI: [10.1016/j.taap.2025.117588](https://doi.org/10.1016/j.taap.2025.117588).

### ВПЛИВ СВІТЛОВОЇ ДЕПРИВАЦІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНА *c-fos* У ПРИШЛУНОЧКОВИХ ЯДРАХ ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ

Федоряк І. В., Булик Р. Є., Сметанюк О. В., Агранов О. С.

**Резюме.** Зміни тривалості фотоперіоду, як основного часозадавача, є стресовим чинником, що десинхронізує ритмічність соматичних і вісцеральних функцій та порушує координацію і модуляцію механізмів пристосування організму до дії різноманітних чинників. З метою вивчення стресових реакцій актуальним є вивчення рівня експресії гена «надранньої» відповіді *c-fos* у субпопуляціях нейронів пришлуночкового ядра гіпоталамуса. Експериментальні дослідження проведено на самцях білих щурів, яких поділено на три групи (у кожній по дві підгрупи). Тварин утримували 14 діб: 1-ї групи (LD) – за умов стандартного режиму освітлення 12.00С:12.00Т; 2-ї групи (DD) за умов постійної темряви 00С:24.00Т (світлова депривація). Дослідження проводили о 14.00 та 02.00 год. З метою ідентифікації *c-Fos* у гістологічних зрізах переднього гіпоталамуса тварин використовували метод непрямой імунофлуоресценції. В умовах режиму освітлення 12.00С:12.00Т у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах пришлуночкового ядра гіпоталамуса щурів зареєстровано зростання показника інтенсивності флуоресценції матеріалу, імунореактивного до *c-Fos* о 02.00 год, порівняно з 14.00 год. У денний період спостереження інтенсивність флуоресценції матеріалу, імунореактивного до *c-Fos* перебувала на рівні  $26,34 \pm 1,510 \mu\text{m}^2$ , а вночі зростала. Зміна тривалості світлового режиму (світлова депривація) спричинила зміщення інтенсивності флуоресценції у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах пришлуночкового ядра гіпоталамуса з нічного на денний проміжок. Встановлено найбільші показники щільності розташування *c-Fos*-позитивних нейронів у досліджуваних суб'ядрах гіпоталамуса щурів, яких утримували за режимів освітлення – 12.00С:12.00Т та 00С:24.00Т о 02.00 год спостереження. Таким чином, експресія продукту активності гена «надранньої відповіді» *c-fos* – білка *c-Fos* – характеризується ритмічністю у медіальних дрібноклітинних суб'ядрах пришлуночкового ядра гіпоталамуса щурів. Продукція білка *c-Fos* зазнає істотних змін за умов світлової депривації. Зокрема, індекс концентрації вказаного протеїна у денний проміжок експерименту становив  $0,543 \pm 0,01280_{\mu\text{m}^2}$  і був вірогідно вищим від контрольних показників.

**Ключові слова:** пришлуночково ядро, гіпоталамус, ген *c-fos*, білок *c-Fos*, світлова депривація.

### EFFECT OF LIGHT DEPRIVATION ON *c-fos* GENE EXPRESSION IN THE PARAVENTRICULAR NUCLEI OF THE HYPOTHALAMUS IN RATS

Fedorciak I. V., Bulyk R. Ye., Smetaniuk O. V., Agronov O. S.

**Abstract.** Changes in photoperiod duration, as the main time-setting factor, represent a stressor that desynchronizes the rhythmicity of somatic and visceral functions and disrupts the coordination and modulation of mechanisms of the organism's adaptation to the action of various factors. In order to study stress reactions, the investigation of the expression level of the immediate-early response gene *c-fos* in neuronal subpopulations of the paraventricular nucleus of the hypothalamus is of current relevance.

Experimental studies were performed on male albino rats, which were divided into three groups (each consisting of two subgroups). The animals were maintained for 14 days: group 1 (LD) under conditions of a standard lighting regime 12.00L:12.00D; group 2 (DD) under conditions of constant darkness 00L:24.00D (light deprivation). The studies were carried out at 14:00 and 02:00.

To identify *c-Fos* in histological sections of the anterior hypothalamus of the animals, the method of indirect immunofluorescence was used. Under the lighting regime 12.00L:12.00D, an increase in the fluorescence intensity of material immunoreactive to *c-Fos* was recorded in the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats at 02:00 compared with 14:00.

During the daytime observation period, the fluorescence intensity of the material immunoreactive to *c-Fos* was  $26.34 \pm 1.510 \mu\text{m}^2$ , whereas at night it increased. A change in the duration of the lighting regime (light deprivation)

caused a shift in fluorescence intensity in the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the hypothalamus from the nighttime to the daytime period.

The highest values of the density of c-Fos-positive neurons in the studied hypothalamic subnuclei were observed in rats maintained under lighting regimes 12.00L:12.00D and 00L:24.00D at 02:00 of observation.

Thus, the expression of the product of the activity of the immediate-early response gene c-fos – the c-Fos protein – is characterized by rhythmicity in the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. The production of the c-Fos protein undergoes significant changes under conditions of light deprivation. In particular, the concentration index of this protein during the daytime period of the experiment was  $0.543 \pm 0.0128$  a.u. and was significantly higher than the control values.

**Key words:** paraventricular nucleus, hypothalamus, c-fos gene, c-Fos protein, light deprivation.

**ORCID and contributionship / ORCID автора та його внесок до статті:**

Fedoriak I. V.: <https://orcid.org/0009-0007-2462-8264><sup>BD</sup>

Bulyk R. Ye.: <https://orcid.org/0000-0003-0651-534X><sup>EF</sup>

Smetaniuk O. V.: <https://orcid.org/0000-0002-8985-2650><sup>A</sup>

Agranov O. S.: <https://orcid.org/0009-0008-7627-2359><sup>C</sup>

**Conflict of interest / Конфлікт інтересів:**

The authors declare no conflict of interest / Автори декларують відсутність конфлікту інтересів

**Corresponding author / Адреса для кореспонденції**

Bulyk Roman Yevgenovych / Булик Роман Євгенович

Bukovinian State Medical University / Буковинський державний медичний університет

Ukraine, 58002, Chernivtsi, 2 Teatralna Square / Україна, 58002, м. Чернівці, пл. Театральна 2

Tel.: +380950410043 / Тел.: +380950410043

E-mail: [bulyk@bsmu.edu.ua](mailto:bulyk@bsmu.edu.ua)

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

This article is distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution (CC-BY) License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited © All authors, 2026 / Ця стаття розповсюджується на умовах ліцензії **Creative Commons Attribution (CC-BY)**, яка дозволяє необмежене використання, поширення та відтворення в будь-якому форматі за умови належного цитування оригінальної роботи © Всі автори, 2026

Received 18.10.2025 / Стаття надійшла 18.10.2025 року  
Accepted 03.03.2026 / Стаття прийнята до друку 03.03.2026 року  
Published 27.03.2026 / Опубліковано 27.03.2026 року

DOI 10.29254/2077-4214-2026-1-180-380-388

UDC 573.6:577.21-076

Feskov O. M., Zhylkova Ye. S., Chumakova N. O., Feskova A. O., Yehunkova O. V.

**REACTIVE OXYGEN SPECIES IN EJACULATE AFFECT EMBRYO DEVELOPMENT *IN VITRO* WHEN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES ARE USED**

Centre of Human Reproduction “Clinic of Professor Feskov O.” (Kharkiv, Ukraine)

[zhilkova@feskov.ua](mailto:zhilkova@feskov.ua)

*Reactive oxygen species are a necessary condition for the maturation, existence and ability of spermatozoa to fertilize the oocyte. The excess of reactive oxygen species in semen can initiate pathological changes in sperm, causing oxidative damage to cell membranes, proteins and DNA. Currently, several scientific studies indicate that high levels of reactive oxygen species in the ejaculate are one of the causes of low male reproductive function. On the other hand, the measurement of reactive oxygen species is hampered by the lack of standardization, including the choice of controls and sample selection. The published data about the effects of oxidative stress on standard fertility sperm parameters (sperm motility, concentration and morphology) and on the integrity of sperm DNA in the ejaculate are controversial.*

*The aim of the present work was to investigate the effect of reactive oxygen species in ejaculate on standard microscopic sperm parameters and on the early embryo development in vitro in couples with male factor of infertility.*

*The development of the embryos from 26 married couples with combined factors of infertility was analyzed. Microscopic analysis of ejaculate was performed according to WHO recommendations from 2021. The level of reactive oxygen species (ROS) in ejaculate was analyzed using Oxisperm kits (Halotech DNA, Spain). Donor oocytes were fertilized by the method of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Embryos that reached the blastocyst stage were evaluated by morphological characteristics according to the criteria of D. Gardner. Preimplantation genetic testing*