

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА ТА БІОЛОГІЯ

УДК 577.112:616.831.4:[616.831-008.64:546.21]-092.9

**Абрамов А.В., Шаменко В.А., Колесник Ю.М.**

### ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА C-FOS В ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС ПРИ МНОГОДНЕВНОМ ДЕЙСТВИИ ПРЕРЫВИСТОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Запорожский государственный медицинский университет

*В работе исследованы особенности экспрессии белка c-Fos – маркера активации гена раннего ответа c-fos в нейросекреторных ядрах гипоталамуса в условиях адаптации организма к гипоксической гипоксии. Установлено, что 15-дневный цикл адаптации к прерывистой гипоксии (6000м) приводит к разнонаправленным изменениям в крупноклеточных нейронах паравентрикулярного (злкПВЯ) и супраоптического (СОЯ) ядер. В ПВЯ увеличивается экспрессия белка c-Fos на 80% и площадь иммунореактивности к белку на 42%. А в СОЯ эти показатели снижаются на 56% и 25%, соответственно. В мелкоклеточных нейронах ПВЯ (ммПВЯ) также увеличивается экспрессия белка c-Fos на 37%. Через 10 дней после окончания гипоксических тренировок показатели экспрессии белка c-Fos практически не изменяются в злкПВЯ, восстанавливаются до исходных показателей в ммПВЯ и частично в СОЯ. Полученные результаты свидетельствуют об устойчивом включении генов раннего ответа c-fos в нейроэндокринный ответ ПВЯ в механизмы адаптации к гипоксической гипоксии и торможении функциональной активности нейросекреторных нейронов СОЯ.*

Ключевые слова: прерывистая гипоксия, гипоталамус, белок c-Fos

Работа выполнена в соответствии с тематикой научно-исследовательских работ №0116U005352 и №0117U002579.

Несмотря на то, что нервная система млекопитающих представлена высокоспециализированными клетками, её реакция на стрессовые и повреждающие факторы характеризуется высокой нейрональной пластичностью, как в эмбриогенезе, так и на протяжении всей жизни. Проявлением пластичности нервной ткани является способность нейронов как к кратковременной, так и к долговременной фенотипической трансформации под влиянием разнообразных стимулов. В основе нейрональной пластичности лежит механизм управляемой регуляции активности генов, среди которых выделяют гены немедленного ответа (immediate-early genes, IEGs), такие как *c-fos* и *c-jun*, так и транскрипционные факторы долговременной нейрональной пластичности, такие как CREB (cAMP responsive element binding protein) и CREM (cAMP-responsive element modulator) [1,2]. Еще в начале 90-х годов 20-го века было доказано, что белок c-Fos является маркером функциональной активности нейронов [3], а уровень его экспрессии в нейросекреторных нейронах сопряжен с повышением секреции вазопрессина, окситоцина, кортикотропин-рилизинг гормона, дофамина и ряда других нейропептидов [4], определяющих эффективность нейроэндокринного ответа на действие факторов окружающей среды. При этом белок c-Fos включает каскад активации внутриклеточных и внеклеточных молекулярных мессенджеров, обеспечивающих нейрональную

пластичность, необходимую для обучения, формирования памяти и когнитивных функций [1,5].

#### Цель исследования

Установить особенности экспрессии белка c-Fos в нейросекреторных ядрах гипоталамуса в условиях адаптации организма к прерывистому действию гипоксической гипоксии.

#### Материал и методы исследований

Исследование проведено на 48 половозрелых самцах крыс линии Вистар массой 220-250г, которые были разделены на 3 группы по 16 животных в каждой: контрольная, с 15-дневными гипоксическими тренировками, с ГТ и 10-дневным постгипоксическим периодом. Прерывистую гипоксию моделировали ежедневным 6-часовым пребыванием крыс в вентилируемой барокамере (объем 1,0м<sup>3</sup>) с постепенным повышением высоты с 1000м до 6000м с 1-го по 6-й дни эксперимента (по 1000м в день), и последующим пребыванием на высоте 6000м (pO<sub>2</sub>=9,8%) до 15-го дня исследований.

Мозг экспериментальных животных быстро извлекали после одномоментной декапитации под тиопенталовым наркозом (50 мг/кг) через 24 часа после окончания эксперимента. Для определения белка c-Fos мозг фиксировали в жидкости Буэна (20 часов) и после стандартной гистологической обработки мозг заливали в пара-

пласт (McCormick, США). Объектом изучения были медиальное мелкоклеточное (ммПВЯ) и заднелатеральное крупноклеточное (злкПВЯ) субъядра паравентрикулярного ядра гипоталамуса, а также супраоптическое ядро гипоталамуса (СОЯ) [6,7].

Для иммунофлюоресцентного выявления белка c-Fos серийные фронтальные срезы гипоталамуса толщиной 14 мкм депарафинировали и демаскировали в цитратном РТ-буфере (pH=6,0) в РТ-модуле (Thermo Scientific, США), инкубировали (24 часа, T=+4°C) с мышиными моноклональными антителами (IgG) к c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, США) (разведение 1:100), затем с козьими антителами к IgG мыши, коъюгированными с FITC (Santa Cruz Biotechnology, США) (разведение 1:64, 45 мин., T=+36°C), и заключали в смесь глицерин/фосфатный буфер (9:1). Изучение иммунофлюоресцентной реакции проводили на микроскопе Axiolmager-M2 (Carl Zeiss, Германия), оснащённом камерой AxioCam-HRm (Carl Zeiss, Германия), с применением высокоэмиссионного светофильтра 38HE (λ<sub>ex</sub>=470/40 нм, λ<sub>em</sub>=525/50 нм) (Carl Zeiss, Германия). Количественный анализ иммунофлюоресцентной реакции проводили с помощью системы цифрового анализа изображения AxioVision-4.8.2 (Carl Zeiss, Германия): определяли относительную площадь материала, иммунореактивного к c-Fos, по отношению к площади структуры гипоталамуса (%), концентрацию белка c-Fos в нейронах (усл. ед. иммунофлюоресценции - Еиф) и его содержание в области субъядер ПВЯ и СОЯ (мЕиф/мм<sup>2</sup>).

Статистический анализ экспериментальных данных проводили пакетом программ для статистического анализа EXCEL 2003 (Microsoft Corp.) с интегрированной программной надстройкой AtteStat [8]. Для оценки достоверности различий в группах применяли t-критерий Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Гипоксические тренировки (ГТ) приводили повышению площади иммунореактивности в заднелатеральном крупноклеточном субъядре паравентрикулярного ядра гипоталамуса (злкПВЯ) на 41,4 % (p<0,01), концентрации белка c-Fos в нейронах на 31,4 % (p<0,01) и содержания c-Fos в злкПВЯ на 79,6 % (p<0,005) (табл. 1). Через 10 дней после окончания ГТ показатели иммунореактивности к белку c-Fos оставались на высоком уровне и статистически не отличались от тех величин, которые определялись на момент окончания ГТ. Известно, что злкПВЯ составляют крупноклеточные нейроны, синтезирующие вазопрессин, а основные пути аксонального транспорта этого нейропептида направлены не только в нейрогипофиз, но и в аденогипофиз [6]. Это позволяет нейронам злкПВЯ участвовать в формировании нейроэндокринного ответа на гипоксический стресс [9]. Сохранение высоких показателей иммунореактивности к белку c-Fos в области злкПВЯ, равно как и повышенный уровень синтеза белков семейства HIF [10] к моменту окончания ГТ и в постгипоксический период подтверждает участие вазопрессинергических механизмов в формировании адаптации к гипоксии.

Табл. 1.  
Показатели экспрессии белка c-Fos в заднелатеральном крупноклеточном субъядре паравентрикулярного ядра гипоталамуса (M±m)

Параметры	Контроль	Гипоксические тренировки	Постгипоксический период, 10 дней
Относительная площадь материала, иммунореактивного к c-Fos, %	3,36±0,34	4,75±0,34 *	4,63±0,47 *
Концентрация c-Fos в нейронах, Еиф	0,359±0,025	0,471±0,025 *	0,420±0,022 *
Относительное содержание c-Fos в структуре, мЕиф/мм <sup>2</sup>	12,71±2,01	22,83±2,74 *	19,97±2,08 *

Примечание: во всех таблицах указана достоверность отличий p<0,05 по сравнению с контролем (\*) и периодом гипоксических тренировок (#).

Другим, не менее важным источником синтеза вазопрессина в гипоталамусе, являются крупноклеточные нейроны супраоптического ядра гипоталамуса (СОЯ), нейрональные проекции которого направляются исключительно в нейрогипофиз [7]. Воздействие ГТ на нейроны СОЯ, в отличие от злкПВЯ, приводило к депрессии синтеза белка c-Fos (табл. 2), что проявлялось сокращением площади иммунореактивности к c-Fos на 35,3 % (p<0,02), уменьшением концентрации белка c-Fos в нейронах на 31,5 % (p<0,001) и его содержания в структуре на 56,0 % (p<0,001). Подобная депрессия показателей синтеза белка c-Fos как маркера активации генов раннего ответа свидетельствует о том, что вазопрессинергические механизмы СОЯ, веро-

ятно, не участвуют в механизмах нейроэндокринной адаптации организма к гипоксии. Ранее было показано, что используемый режим ГТ приводит к умеренным дистрофическим изменениям в нейронах СОЯ [11], что полностью согласуется с выявленной в настоящем исследовании депрессией синтеза белка c-Fos. Характерно, что в постгипоксический период наблюдается частичное восстановление функциональной активности нейронов СОЯ и за счет нарастания площади иммунореактивности к c-Fos в нейронах содержание белка в структуре достоверно увеличивается (на 33,4 %, p<0,002), хотя и остается на 41,1 % ниже (p<0,005), чем у контрольных животных.

Табл. 2.  
Показатели экспрессии белка c-Fos в супраоптическом ядре гипоталамуса (M±m)

Параметры	Контроль	Гипоксические тренировки	Постгипоксический период, 10 дней
Относительная площадь материала, иммунореактивного к c-Fos, %	4,67±0,55	3,02±0,28 *	3,91±0,41
Концентрация c-Fos в нейронах, Еиф	0,562±0,044	0,380±0,016 *	0,387±0,019 *
Относительное содержание c-Fos в структуре, мЕиф/мм <sup>2</sup>	27,93±3,17	12,31±1,21 *	16,43±1,20 *#

Табл. 3.  
Показатели экспрессии белка c-Fos в медиальном мелкоклеточном субъядре паравентрикулярного ядра гипоталамуса (M±m)

Параметры	Контроль	Гипоксические тренировки	Постгипоксический период, 10 дней
Относительная площадь материала, иммунореактивного к c-Fos, %	4,14±0,32	4,63±0,24	3,92±0,26
Концентрация c-Fos в нейронах, Еиф	0,421±0,038	0,533±0,027 *	0,449±0,022 #
Относительное содержание c-Fos в структуре, мЕиф/мм <sup>2</sup>	18,33±1,87	25,13±1,09 *	18,85±2,05 #

Важной структурой гипоталамуса, участвующей в формировании нейроэндокринного ответа на стресс любого генеза, является медиальное мелкоклеточное субъядро паравентрикулярного ядра гипоталамуса (ммПВЯ), нейроны которого синтезируют кортикотропин-рилизинг гормон и вазопрессин [6,12]. ГТ приводили к повышению концентрации белка c-Fos в ммПВЯ на 26,5 % ( $p<0,02$ ) и увеличению его содержания в структуре на 37,1 % ( $p<0,001$ ) без изменения площади иммунореактивности (табл. 3). В постгипоксический период показатели экспрессии белка c-Fos в ммПВЯ снижались и восстанавливались до уровня контрольных животных.

Полученные данные свидетельствуют о различной степени вовлечения нейросекреторных образований гипоталамуса в процесс нейроэндокринного обеспечения адаптации организма к гипоксической гипоксии. Очевидно, что важное значение в данном процессе имеют нейроны паравентрикулярного ядра гипоталамуса. При этом реакция крупноклеточных нейронов злПВЯ характеризуется более интенсивной экспрессией белка c-Fos, а данный эффект сохраняется продолжительное время и в постгипоксический период, в отличие от мелкоклеточных нейронов ммПВЯ. Следует полагать, что подобное различие обусловлено тем, что нейроны злПВЯ синтезируют вазопрессин, а нейроны ммПВЯ – главным образом кортикотропин-рилизинг гормон [6,12]. При этом последний является более специфичным активатором гипоталамико-адренкортикальной системы, а вазопрессин выступает в роли ко-активатора и оказывает перmissive эффект. В то же время, для вазопрессина характерны более разнообразные нейроэндокринные эффекты, что, возможно, и лежит в основе сохранения высокой нейросекреторной активности крупноклеточных нейронов ПВЯ в постгипоксический период. В противоположность этому, крупноклеточные вазопрессинергические нейроны супраоптического ядра в ответ на действие гипоксической гипоксии отвечают глубокой депрессией синтеза белка c-Fos в сочетании с признаками умеренной

морфофункциональной дегенерации [11]. Хорошо изучена роль супраоптического ядра в регуляции водно-осмотического баланса в организме. Однако характер нейроэндокринного ответа данной структуры гипоталамуса свидетельствует о том, что в механизмах реализации нейроэндокринной адаптации к гипоксической гипоксии роль вазопрессина как антидиуретического гормона не является приоритетной.

### Выводы

1. Прерывистая гипоксия вызывает повышение иммунореактивности в крупноклеточных нейронах паравентрикулярного ядра гипоталамуса с увеличением экспрессии белка c-Fos, высокие значения которого сохраняются в 10-дневный постгипоксический период.
2. Мелкоклеточные нейроны паравентрикулярного ядра гипоталамуса отвечают повышением экспрессии белка c-Fos только в период гипоксических воздействий.
3. Гипоксическая гипоксия приводит к депрессии синтеза c-Fos в крупноклеточных нейронах супраоптического ядра гипоталамуса, уровень которого полностью не восстанавливается в 10-дневный постгипоксический период.

### Литература

1. Loebrich S. The function of activity-regulated genes in the nervous system / S. Loebrich, E. Nedivi // *Physiol. Rev.* - 2009. - V. 89, № 4. - P. 1079–1103.
2. Perez-Cadahia B. Activation and function of immediate-early genes in the nervous system / B. Perez-Cadahia, B. Drobnic, J.R. Davie // *Biochem. Cell Biol.* - 2011. - V. 89. - P. 61–73.
3. Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat / E. Bullitt // *J. Comp. Neurology.* - 1990. - V. 296. - P. 517–530.
4. Hoffman G.E. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems / G.E. Hoffman, M.S. Smith, J.G. Verbalis // *Front. Neuroendocrinology.* - 1993. - V. 14, No3. - P.173–213.
5. Healy S. Immediate early response genes and cell transformation / S. Healy, P. Khan, J.R. Davie // *Pharmacology Therapeutics.* - 2013. - V. 137. - P. 64–77.
6. Swanson L.W. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei / L.W. Swanson, P.E. Sawchenko // *Ann. Rev. Neurosci.* - 1983. - V. 6. - P. 269–324.
7. Silverman A.J. Magnocellular neurosecretory system / A.J. Silverman, E.A. Zimmerman // *Ann. Rev. Neurosci.* - 1983. - V. 6. - P. 357–380.
8. Гайдышев И.П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++. / И.П. Гайдышев - СПб: БХВ-Петербург, 2004. - 504 с.

9. Абрамов А.В. Влияние интервальных гипоксических тренировок на функциональное состояние пептидергических нейронов паравентрикулярного ядра гипоталамуса и нейронов ствола мозга крыс / А.В. Абрамов // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. - 1998. - Т.84, №3. - С.173-181.
10. Абрамов А.В. Особенности экспрессии HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  в гипоталамусе у крыс линии Вистар под влиянием прерывистой гипобарической гипоксии / А.В. Абрамов, В.А. Шаменко // Поло-голія. - 2017. - №2 (40). - С.156-162.
11. Шаменко В.А. Морфогистохимическая характеристика нейронов супраоптического ядра гипоталамуса крыс при действии прерывистой гипоксии / В.А. Шаменко // Ежемес. науч. ж. научн. Фонда «Биолог». - 2014. - № 4. - С. 29-32.
12. Kolesnik Yu.M. Effect of intermittent hypoxia trainings on the functional state of corticotropin releasing hormone- and  $\beta$ -endorphin-synthesizing neurons of the rat paraventricular nucleus of hypothalamus / Yu.M. Kolesnik, E.V. Kadzharyan, A.V. Abramov // International J. Physiology and Pathophysiology. - 2014. - V.5, №3. - P. 1-7.

### Реферат

ЕКСПРЕСІЯ БІЛКА C-FOS В ГІПОТАЛАМУСІ ЩУРІВ ПРИ БАГАТОДЕННІЙ ДІЇ ПЕРЕРИВЧАСТОЇ ГІПОКСИЧНОЇ ГІПОКСІЇ

Абрамов А.В., Шаменко В.О., Колесник Ю.М.

Ключові слова: переривчаста гіпоксія, гіпоталамус, білок c-Fos

В роботі досліджені особливості експресії білка c-Fos - маркера активації гена ранньої відповіді c-fos в нейросекреторних ядрах гіпоталамуса в умовах адаптації організму до гіпоксичної гіпоксії. Встановлено, що 15-денний цикл адаптації до переривчастої гіпоксії (6000м) призводить до різноспрямованих змін в крупноклітинних нейронах паравентрикулярного (злПВЯ) і супраоптичних (СОЯ) ядер. У ПВЯ збільшується експресія білка c-Fos на 80 % і площа імунореактивності до білка на 42 %. А в СОЯ ці показники знижуються на 56 % і 25 %, відповідно. У дрібноклітинних нейронах ПВЯ (ммПВЯ) також збільшується експресія білка c-Fos на 37 %. Через 10 днів після закінчення гіпоксичних тренувань показники експресії білка c-Fos практично не змінюються в злПВЯ, відновлюються до вихідних показників в ммПВЯ і частково в СОЯ. Отримані результати свідчать про стійке включення генів ранньої відповіді c-fos в нейроендокринну відповідь ПВЯ в механізми адаптації до гіпоксичної гіпоксії і гальмуванні функціональної активності нейросекреторних нейронів СОЯ.

### Summary

C-FOS PROTEIN EXPRESSION IN HYPOTHALAMUS OF RATS DURING LONG-TERM INTERMITTENT HYPOXIC HYPOXIA

Abramov A.V., Shamenko V.A., Kolesnik Yu.M.

Key words: intermittent hypoxia, hypothalamus, c-Fos protein

The features of expression of c-Fos protein known as a marker of immediate-early response gene c-fos activation in neurosecretory nuclei of the hypothalamus in conditions of organism adaptation to hypoxic hypoxia were studied in the work. It has been revealed that a 15-day cycle of intermittent hypoxia adaptation (6000 m) leads to multidirectional changes in large-cell neurons of paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei. c-Fos protein expression is increased by 80% and the area of immunoreactivity to the protein by 42% in PVN, whereas these indicators are reduced by 56% and 25%, respectively, in SON. c-Fos protein expression is also increased by 37% in small-cell neurons of PVN. In 10 days after the end of the hypoxic exposure, c-Fos protein expression indices are not almost changed in large-cell neurons of PVN and restore to the initial values in small-cell neurons of PVN and partially in SON. The findings demonstrate the sustainable immediate-early response gene c-fos initiation in the neuroendocrine response of PVN to the mechanisms of hypoxic hypoxia adaptation and SON neurosecretory neurons functional activity inhibition.