

Л.М. Калинська,  
Н.І. Левчук,  
О.І. Ковзун

# Рівень експресії чинника транскрипції c-fos у надниркових залозах щурів за умов гальмування активності ангіотензинперетворюючого ферменту в структурах гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної системи

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

**Резюме. Мета роботи** — дослідити вплив інгібітору ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ) периндоприлу на експресію чинника транскрипції c-fos у надниркових залозах щурів. **Методи.** Визначення рівня експресії ядерного чинника транскрипції c-fos у тканині надниркових залоз щурів проводили за допомогою вестерн-блотинг аналізу. Активність АПФ у гіпоталамусі, гіпофізі та надниркових залозах щурів визначали за допомогою флуориметричного методу. **Результати.** Одноразове введення інгібітору АПФ периндоприлу інтактним щурам призводило до зниження активності АПФ у центрах регуляції гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної системи (ГГАС) — гіпоталамусі, аденогіпофізі та надниркових залозах, а також у плазмі крові тварин. У надниркових залозах щурів за умов введення периндоприлу виявлено підвищення рівня транскрипційного чинника c-fos. Обговорюється можлива участь транскрипційного чинника c-fos у стероїдогенних ефектах ангіотензину II та АПФ. **Висновок.** Одноразове введення інтактним щурам інгібітору АПФ периндо-

\* Адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна. E-mail: vsloga@mail.ru

прилу в дозі 5 мг/кг, яке супроводжується зниженням активності АПФ у центрах регуляції ГАС (гіпоталамусі, аденогіпофізі та надниркових залозах тварин) і циркулюючого в крові ферменту, призводить до підвищення рівня транскрипційного чинника *c-fos* у надниркових залозах тварин.

**Ключові слова:** чинник транскрипції *c-fos*, ангіотензинперетворюючий фермент (АПФ), інгібітори АПФ, структури гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної системи.

Дослідження одного з основних регуляторів функції надниркових залоз ангіотензину II свідчать про суттєве розширення поглядів на функціонування ренін-ангіотензинової системи (РАС), наявність і значущість локальних систем та альтернативної РАС [1, 2]. Відомо, що патофізіологічна роль гіперактивності РАС не обмежується її гіпертензивною дією та включає проліферативний, протромбогенний, атерогенний і прооксидативний ефекти. У проблемі фармакологічної корекції станів, пов'язаних із гіперактивністю РАС, значна увага як у теоретичному, так і в практичному аспектах приділяється ефективності одного з основних класів препаратів — інгібіторів ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ) [3]. Участь ангіотензину II в регуляції функцій надниркових залоз визначається його локалізацією (в кірковій речовині надниркових залоз, ядрах гіпоталамуса, структурах гіпофіза, ендотелії судин) і забезпечується різними сигнальними каскадами, що взаємодіють між собою [4]. Наразі продовжуються дослідження участі різних месенджерних систем (протеїнкінази С, MAP-кіназного каскаду, транскрипційних чинників *c-fos*, *c-jun* тощо) в стероїдогенних і мітогенних ефектах ангіотензину II й АПФ.

**Мета роботи** — дослідити вплив інгібітору АПФ периндоприлу на рівень експресії чинника транскрипції *c-fos* у надниркових залозах щурів.

## Матеріали та методи

Досліди проводили на щурах-самцях лінії Вістар із масою тіла 230-270 г. В експериментах використовували периндоприл — інгібітор АПФ третьої генерації, який найширше застосовується в клінічній практиці. Периндоприл відрізняється високою ліпофільністю, що за-

безпечує можливість проникнення інгібітору в тканини та дії на тканинні РАС [3].

Периндоприл вводили *per os* інтактним щурам одноразово в дозі 5 мг/кг. Тварин декапітували під етаміналовим наркозом (4 мг/100 г) через 4 години після введення периндоприлу. Перед початком досліджень було отримано дозвіл від комісії Інституту з питань біоетики. Дослідження проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей.

Після декапітації щурів шматочки тканини певної ваги надниркових залоз гомогенізували у 3 об'ємах лізис-буферу (Sigma, США). Гомогенати центрифугували за 24100 g 10 хв; надосадові фракції зберігали до використання за температури  $-60^{\circ}\text{C}$ . Визначення рівня експресії ядерного чинника транскрипції *c-fos* у тканині надниркових залоз проводили за допомогою методу вестерн-блотингу з використанням моноклональних антитіл [5]. Кількість білка в лізатах визначали за методом Bradford [6]. Однакову кількість лізату наносили на нітроцелюлозну мембрану, яку блокували буфером, що містив 20 мМ трис-НСl, 137 мМ натрію хлориду, 0,1% Твін-20 (рН 7,6) і 5% знежиреного сухого молока для неспецифічного зв'язування білків. Після цього нітроцелюлозну мембрану тричі промивали по 5 хв буфером PBS-T та інкубували з первинними антитілами до *c-fos* (Santa Cruz Biotechnology, США) впродовж ночі за температури  $4^{\circ}\text{C}$ .

Після триразового відмивання нітроцелюлозної мембрани PBS-T буфером від залишків первинних антитіл проводили інкубацію з вторинними антитілами (анти-кролячі IgG, кон'юговані з пероксидазою, Sigma, США) протягом 1 години за кімнатної температури та знову тричі промивали блокуючим буфером. Комплекси білків з антитілами візуалізували

## Оригінальні дослідження

за допомогою реагенту ECL (Amersham Life Science, Велика Британія). Після денситометричного визначення інтенсивності засвічення плівки Huperfilm ECL результати обробляли за допомогою програми GelPro Analyzer v.4.0.

Активність АПФ у мембранній фракції гіпоталамуса та в гомогенатах аденогіпофіза й надниркових залоз визначали за допомогою флуориметричного методу [7], використовуючи як субстрат Benzoyl-Gly-His-Leu (Sigma, США). Активність ферменту виражали в нмоль His-Leu, який відщепився за 1 хв інкубації? в розрахунку на 1 мг білка. Активність АПФ у плазмі крові визначали за методом [8]. Вміст білка визначали за Лоурі [9]. Результати досліджень опрацьовували статистично, використовуючи t-критерій Стьюдента та U-критерій Вілкоксона – Манна – Уїтні. Вірогідними вважали результати за  $p \leq 0,05$ .

## Результати та їх обговорення

Отримані результати продемонстрували, що введення периндоприлу інтактним щурам у дозі 5 мг/кг призводить до вірогідного зниження активності АПФ в аденогіпофізі та надниркових залозах через 4 години після одноразової ін'єкції препарату. Активність ферменту в гіпоталамусі щурів після одноразового введення інгібітору АПФ мала тенденцію до зниження (табл.).

У плазмі крові щурів активність АПФ також знижувалася з  $7,38 \pm 0,84$  нмоль гіс-лей / (хв · мг білка) в контролі до  $4,90 \pm 0,36$  нмоль гіс-лей / (хв · мг білка) після введення периндоприлу ( $p < 0,05$ ). Отже, зниження активності АПФ у структурах ГГАС інтегрально посилюється зниженням активності циркулюючого плазматичного АПФ, оскільки відома здатність

**Таблиця.** Активність АПФ у структурах ГГАС після одноразового введення периндоприлу (нмоль гіс-лей / (хв · мг білка),  $M \pm m$ ,  $n=4$ )

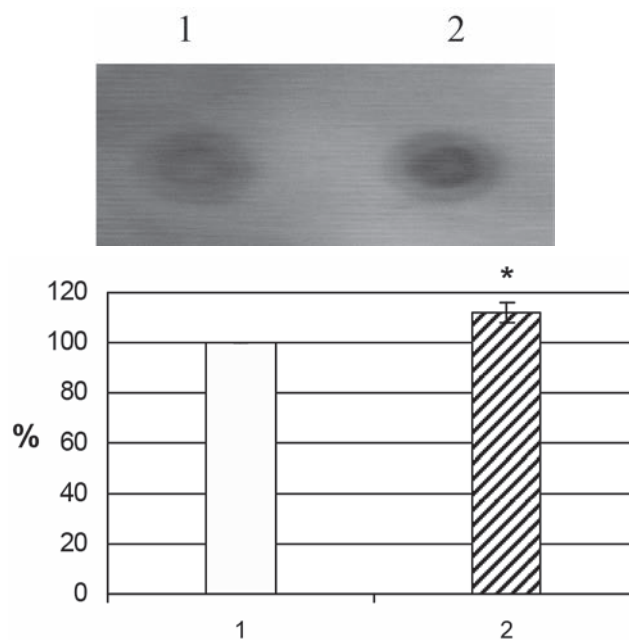
Об'єкт дослідження	Контроль	Периндоприл
Гіпоталамус	$0,277 \pm 0,009$	$0,250 \pm 0,009$ $0,1 > p < 0,05$
Аденогіпофіз	$0,790 \pm 0,006$	$0,567 \pm 0,057$ $p < 0,01$
Надниркові залози	$0,257 \pm 0,010$	$0,226 \pm 0,004$ $p < 0,05$

Примітка:  $p$  — вірогідність різниці з показником контрольних тварин за t-критерієм Стьюдента.

циркулюючого ангіотензину II діяти на  $AT_1$ -рецептори, локалізовані в надниркових залозах і структурах головного мозку, зокрема гіпоталамусі, гіпофізі та стовбурі мозку.

Результати досліджень рівня експресії ядерних транскрипційних чинників показали, що зниження активності АПФ у центрах регуляції ГГАС (гіпоталамусі, аденогіпофізі та надниркових залозах) у циркулюючого в крові ферменту після введення інгібітору АПФ периндоприлу супроводжується підвищенням рівня експресії транскрипційного чинника c-fos у надниркових залозах щурів (рис.). Це свідчить на користь участі ядерного транскрипційного чинника c-fos в опосередкуванні ефектів АПФ та ангіотензину II в адренкортикальній тканині.

Останніми роками в літературі тривають дискусії відносно того, чи пов'язано антигіпертензивний і кардіотропний ефекти інгібіторів АПФ із пригніченням інших механізмів дії ангіотензину II й АПФ — проліферативною, проапоптичною, протромбогенною та прооксидантною активністю. Важливо, що ренін-ангіотензинову систему, локалізовану в центрах регуляції ГГАС — структурах гіпоталамуса та аденогіпофіза, відносять до нейро-



**Рис.** Вплив одноразового введення інгібітору АПФ периндоприлу на рівень експресії чинника транскрипції c-fos у надниркових залозах щурів ( $M \pm m$ ;  $n=3$ ): А — сканограма результатів вестерн-блотинг аналізу (один типовий дослід із трьох), Б — усереднені результати дослідження; 1 — контроль, 2 — периндоприл; \* — вірогідна різниця з контролем за критерієм Вілкоксона – Манна – Уїтні ( $p < 0,05$ ).

гуморальних систем, яким притаманна кортикотропін-релізінг активність, а основною функцією РАС надниркових залоз є регуляція біосинтезу альдостерону [10]. Причому активність центрів регуляції ГГАС – гіпоталамуса та аденогіпофіза – інтегрально визначається сукупністю сигналів: внутрішніх – дією інтрацеребральної РАС і зовнішніх – дією циркулюючого ангіотензину II на  $AT_1$ -рецептори, локалізовані в певних зонах мозку [11].

Регуляцію ангіотензином II активності MAP-кіназ, експресії транскрипційних чинників *c-fos* і *c-jun* пов'язують головним чином із проліферативними процесами. Окрім цього, висловлюється думка про участь кіназ цього каскаду в регуляції біосинтезу глюко- та мінералокортикоїдів [10, 12, 13]. З огляду на це можна припустити, що транскрипційний чинник *c-fos* залучається до реалізації ефектів АПФ та ангіотензину II у центрах регуляції ГГАС і регуляцію стероїдогенезу після введення інгібіторів АПФ. Гальмування активності гіпофізарно-адrenокортикальної системи – зниженням рівня АКТГ і 11-ОКС у крові інтактних та адреналектомованих щурів на тлі зниження активності ангіотензинової системи (активності АПФ, рівня та рецепції ангіотензину II) у гіпоталамусі, аденогіпофізі, надниркових залозах і плазмі крові після введення інгібіторів АПФ – каптоприлу та еналаприлу встановлено нами раніше [14-17].

Отже, одним із важливих механізмів зниження стероїдогенного ефекту ангіотензину II за умов введення інгібіторів АПФ може бути регуляція транскрипційного чинника *c-fos* у надниркових залозах. У цілому вплив ангіотензину II на сигнальні шляхи, що залучають MAP-кіназу, експресію *c-fos* і *c-jun*, вимагають подальших досліджень, зокрема з моделюванням патології ГГАС.

## Висновок

Одноразове введення інтактним щурам інгібітору АПФ периндоприлу в дозі 5 мг/кг, яке супроводжується зниженням активності АПФ у центрах регуляції ГГАС (гіпоталамусі, аденогіпофізі та надниркових залозах тварин) і циркулюючого в крові ферменту, призводить до підвищення рівня транскрипційного чинника *c-fos* у надниркових залозах тварин.

## Список використаної літератури

1. Baron-Menguy C, Toutain B, Cousin M, Dumont O, Guihot A, Vessieres E, et al. Involvement of angiotensin II in the remodeling induced by a chronic decrease in blood flow in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertens Res.* 2010;33:857-66.
2. Wang Y, Tikellis C, Thomas MC, Golledge J. Angiotensin converting enzyme 2 and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2013;226:3-8.
3. Ceconi C, Fox KM, Remme WJ, Simoons ML, Bertrand M, Parrinello G, et al. ACE inhibition with perindopril and endothelial dysfunction. Results of a substudy of the EUROPA study: PERTINENT. *Cardiovasc Res.* 2007;73:237-46.
4. Тронько МД, Микоша ОС, Ковзун ОІ, Пушкар'єв ВМ. Регулятори функції кори надниркових залоз. Київ: ТОВ «Доктор – Медіа», 2009:244 с. (Tron'ko MD, Mykoshka OS, Kovzun OI, Pushkar'ev VM. Function regulators of the cortex of the adrenal glands. Kyiv: TOV «Doctor – Media», 2009: 244 p.)
5. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods.* – 2006;38:283-93.
6. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
7. Yang H, Neff N. Distribution and properties of angiotensin converting enzyme of rat brain. *J Neurochem.* 1972;19:2443-50.
8. Павлихніна ЛВ, Елисеєва ЮВ, Позднєєв ВФ, Орехович ВН. Определение активности карбоксикапепсина в сыворотке крови человека. *Вопр мед химии.* 1975;21(1):54-9. (Pavlikhina LV, Yeliseeva YuV, Pozdneev VF, Oryekhovich VN. Determination of the activity of carboxycathepsin in human blood serum. *Medical chemistry questions.* 1975;21(1):54-9).
9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis A, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
10. Otis M, Gallo-Payet N. Role of MAPKs in angiotensin II-induced steroidogenesis in rat glomerulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;265-266:126-130.
11. Kang YM, Ma Y, Zheng JP, Elks C, Sriramula S, Yang ZM, et al. Brain nuclear factor-kappa B activation contributes to neurohumoral excitation in angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc Res.* 2009;82:503-12.
12. Balla T, Varnai P, Tian Y, Smith RD. Signaling events activated by angiotensin II receptors: What goes before and after the calcium signals. *Endocrinol Res.* 1998; 24(3-4):335-44.
13. Vargas VE, Kaushal KM, Monau TR, Myers DA, Ducsay CA. Extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) signaling pathway plays a role in cortisol secretion in the long-term hypoxic ovine fetal adrenal near term. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013; 304:636-43.
14. Калинська ЛМ, Тронько МД, Кононенко ВЯ, Затовська ТВ. Зміни активності ренін-ангіотензинової системи мозку та функціонального стану гіпофізарно-надниркової системи щурів під впливом каптоприлу. *Фізіол. журнал.* 1992;38(1):3-8. (Kalyn's'ka LM, Tronko MD, Kononenko VYa., Zotov's'ka TV. Changes in brain renin-angiotensin system activity and functional status of pituitary-adrenal axis in rats under captopril influence. *Physiol Journal.* 1992;38(1):3-8).
15. Калинська ЛМ. Нейроендокринні функції енкефалінової, калікреїн-кінінової і ангіотензинової систем в умовах гіпер- та гіпокортицизму: автореф. дис. док. біол. наук. – Київ, 1997: 49 с. (Kalynska LM. Neuroendocrine functions of enkephalin, kallikrein-kinin and angiotensin systems in hyper- and hypocorticism: avtoref. dys. ... doct. biology sciences. Kyiv, 1997:49 p.)
16. Калинська ЛМ. Залучення ангіотензинперетворюючого ферменту у взаємодію регуляторів і модуляторів функції гіпоталамо-гіпофізарно-адrenокортикальної системи – ангіотензину II, іонів літію та N-ацетиланоламіну. *Клінічна та експериментальна патологія.* 2012;11(3). Ч. 1: 210. (Kalynska LM. Involvement of angiotensin-converting enzyme in the interaction of regulators and modulators of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system-angiotensin II, the lithium ions and acesitlanolamine. *Clin end experim pathologia.* 2012;11(3).Part 1:210).
17. Калинська ЛМ. Ангіотензинперетворюючий фермент, його роль у міжгормональних взаємодіях. *Ендокринологія.* 2014;19(4):299-300. (Kalyn's'ka L. Angiotensin-converting enzyme, its role in interhormonal interference. *Endokrynolohiya.* 2014;19(4):299-300).

(Надійшла до редакції 24.07.2017 р.)

## Оригінальні дослідження

## Уровень экспрессии фактора транскрипции c-fos в надпочечных железах крыс в условиях торможения активности ангиотензин-превращающего фермента в структурах гипоталамо-гипофизарно-аденокортикальной системы

Л.Н. Калинская, Н.И. Левчук, Е.И. Ковзун

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

**Резюме. Цель работы** — исследовать влияние ингибитора ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) периндоприла на экспрессию фактора транскрипции c-fos в надпочечных железах крыс.

**Методы.** Определение уровня экспрессии ядерного фактора транскрипции c-fos в ткани надпочечников проводили с помощью вестерн-блоттинг анализа. Активность АПФ в гипоталамусе, гипофизе и надпочечниках крыс определяли с помощью флюориметрического метода. **Результаты.** Однократное введение ингибитора АПФ периндоприла intactным крысам приводит к снижению активности АПФ в центрах регуляции гипоталамо-гипофизарно-аденокортикальной системы (ГГАС) — гипоталамусе, аденогипофизе и надпочечниках, а также в плазме крови животных. В надпочечниках крыс после введения периндоприла выявлено повышение уровня транскрипционного фактора c-fos. Обсуждается возможное участие транскрипционного фактора c-fos в стероидогенных эффектах ангиотензина II и АПФ. **Вывод.** Однократное введение intactным крысам ингибитора АПФ периндоприла в дозе 5 мг/кг, которое сопровождается снижением активности АПФ в центрах регуляции ГГАС (гипоталамусе, аденогипофизе и надпочечниках животных) и циркулирующего в крови фермента, приводит к повышению уровня транскрипционного фактора c-fos в надпочечниках крыс.

**Ключевые слова:** фактор транскрипции c-fos, ангиотензин-превращающий фермент (АПФ), ингибиторы АПФ, структуры гипоталамо-гипофизарно-аденокортикальной системы.

## Expression level of transcription factor c-fos in rat adrenal glands under inhibition of angiotensin-converting enzyme activity in the structures of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system

L.M. Kalynska, N.I. Levchuk, O.I. Kovzun

SI «V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of Natl. Acad. Med. Sci. of Ukraine»

**Abstract. Aim** is to study the effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor perindopril on the expression of the transcription factor c-fos in rat adrenal glands. **Methods.** The expression level of nuclear transcription factor c-fos in rat adrenal tissue was determined by Western blot analysis. ACE activity in the hypothalamus, the pituitary and the adrenal glands of rats was determined by fluorimetric method. **Results.** Decrease in ACE activity in regulation centers of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system (HHAS) — in the hypothalamus, the adenohypophysis and the adrenal glands and also in the blood plasma of animals was caused by single administration of ACE inhibitor — perindopril — into intact rats. Increased level of the transcription factor c-fos was revealed in the adrenal glands of rats after perindopril administration. The possible participation of transcription factor c-fos in steroidogenic effects of angiotensin II and ACE is discussed by us.

**Conclusions.** It was shown that a single administration of ACE inhibitor perindopril into intact rats in a dose of 5 mg/kg, that is accompanied by a decrease of ACE activity in regulation centers of HHAS (the hypothalamus, the adenohypophysis and the adrenal glands of animals) and circulating blood enzyme leads to increased transcription factor c-fos in the adrenal glands of animals.

**Keywords:** transcription factor c-fos, angiotensin-converting enzyme (ACE), ACE inhibitors, structures of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system.