

УДК: 612.826.4.018-092:616-008.9]:57.084

О.В. Ганчева

Запорожский государственный медицинский университет

ВОЗРАСТНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА РАННЕГО ОТВЕТА C-FOS В НЕЙРОНАХ СУПРАОПТИЧЕСКОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА У КРЫС-САМЦОВ ЛИНИИ WISTAR

Ключевые слова: гипоталамус, супраоптическое ядро, белок c-Fos, экспрессия, крысы.

Резюме. Учитывая важную роль окситоцин- и вазопрессинергических нейросекреторных систем гипоталамуса в регуляции большого числа физиологических функций организма, можно предположить изменение степени экспрессии транскрипционного фактора белка c-Fos в нейронах супраоптического ядра гипоталамуса в процессе развития животных и рассматривать ее вариабельность, как один из возможных показателей функциональной активности гипоталамуса. Целью исследования было изучить у крыс-самцов линии Wistar в возрастном аспекте особенности экспрессии транскрипционного фактора c-Fos в супраоптическом ядре гипоталамуса, установить наличие корреляционных связей между параметрами экспрессии белка c-Fos и концентрациями исследуемых гормонов. В ходе проведенного исследования было установлено, что степень выраженности экспрессии транскрипционного фактора белка c-Fos в нейронах супраоптического ядра гипоталамуса зависит от возраста, паттерны экспрессии белка c-Fos усиливаются в пубертатном периоде. Выявлены позитивные корреляционные связи между площадью материала, иммунореактивного к белку c-Fos и уровнем лептина, кортикостерона, адреналина; между концентрацией белка c-Fos и его содержанием в площади материала, иммунореактивного к нему и уровнями инсулина и адреналина.

Введение.

Супраоптическое ядро (СОЯ) гипоталамуса рассматривается как один из центральных органов осмотического контроля [13, 14]. Крупноклеточные нейроны этого ядра синтезируют окситоцин и вазопрессин, физиологические эффекты которых очень разнообразны. Так вазопрессин регулирует водно-солевой баланс, осуществляет вазопрессорную и нейромедиаторную функцию, регулирует секрецию кортикотропина и кортизола надпочечниками [12, 15], сердечно-сосудистую систему, температуру и другие висцеральные функции, стимулирует секрецию факторов свертывания сосудистым эндотелием, агрегацию тромбоцитов, эритропоэз и пролиферацию лимфоцитов [5, 12]. Тогда как окситоцин оказывает воздействие на обучение, память, сон и бодрствование, спонтанное поведение и груминг животных, половое и мате-

ринское поведение, лактацию, регуляцию потребления пищи и воды, температуру тела, сердечно-сосудистую и иммунную систему, поджелудочную железу [5, 8].

В нашем исследовании для изучения и анализа функциональной активности нейронов СОЯ был применен способ тестирования экспрессии гена c-fos по синтезу белка c-Fos который позволяет судить о процессах реализации полученного информационного сигнала нейроном в виде конечного продукта экспрессии гена - кодируемого им белка [1, 6]. Изменение чувствительности нервных клеток к регулирующим сигналам (нейромедиаторам, нейропептидам), по мнению ряда авторов [2, 10], может приводить как к сверхэкспрессии так и дефекту экспрессии белка c-Fos и, как следствие этого, формированию очагов застойных возбуждений, либо резистентности клеток к возбуж-

дающим стимулам. На наш взгляд, такие изменения ответа нейронов, являющихся структурными единицами пептидергической системы гипоталамуса, могут приводить к перестройке поведенческих реакций, эндокринных и вегетативных функций организма, в том числе применительно к различным фазам жизненного цикла и периодам его развития.

Учитывая вышесказанное о роли окситоцин- и вазопрессинергической нейросекреторной системе гипоталамуса можно предположить изменение степени экспрессии транскрипционного фактора белка c-Fos в нейронах СОЯ в процессе жизни и развития животных и рассматривать ее вариабельность, как одно из возможных звеньев в центральной регуляции функциональной активности гипоталамуса. Выбранные нами для изучения возрастные периоды у экспериментальных животных: препубертатный (2 месяца), пубертатный (4 месяца), зрелый (6 месяцев) и период старения (18 месяцев), позволят установить характер изменения степени экспрессии транскрипционного фактора c-Fos в нейронах СОЯ гипоталамуса в описанные периоды жизни животных, возможно связанные с особенностями гормонального статуса и метаболизма, характерные непосредственно для этих периодов.

Цель работы

Изучить у крыс-самцов линии Wistar в возрастном аспекте особенности экспрессии транскрипционного фактора белка c-Fos в супраоптическом ядре гипоталамуса, установить наличие корреляционных связей между параметрами экспрессии белка c-Fos и концентрациями исследуемых гормонов.

Материалы и методы

Исследования были проведены на 40 крысах-самцах линии Wistar, распределенных на четыре возрастных периода - 2-, 4-, 6- и 18 месяцев, по 10 крыс в каждой группе. Животные находились на стандартном рационе при свободном доступе к воде и пище. При достижении соответствующего возраста крыс декапитировали под этиминаловым наркозом (40 мг/кг, внутривенно). Мозг немедленно извлекали и помещали в фиксатор Буэна, после стандартной обработке заливали в парафин. На 14 мкм срезах гипоталамуса с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции иммуногистохимически выявляли экспрессию белков раннего ответа (c-Fos). В качестве первичных антител использовали кроличьи антитела к c-Fos крысы производства Sigma Chemical (США), в качестве вторичных антител использовали козы антитела

к полной молекуле IgG кролика, конъюгированные с FITC (Sigma Chemical, США).

Принадлежность идентифицированных c-Fos позитивных нейронов супраоптическому ядру гипоталамуса определяли в соответствии со стереотаксическим атласом мозга крысы [7].

Изображения с помощью видеокамеры СОНУ-4922 (США) вводили в систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). В ходе автоматической обработки изображений ядер гипоталамуса определяли: площадь материала, иммунореактивного к транскрипционному фактору c-Fos (мкм²) (ИРМ), содержание белка c-Fos в площади иммунореактивности и его концентрацию в нейроне (ЕИФ). Анализ исследуемых структур гипоталамуса проводили с помощью оригинального программного обеспечения, разработанного на основе макроязыка программирования VIDAS.

Концентрации гормонов в плазме крови определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов для определения инсулина (DRG, США, кат. №104-2935D), лептина (DRG, США, кат. № 104-2395D), кортикостерона (DRG, США, кат. № 1124164D). Процесс проведения исследований строго соответствовал инструкции фирмы-производителя наборов и проводился на микропланшетном фотометре DigiScan-400 (зав. № 70384). Для определения концентраций адреналина и норадреналина в плазме крови экспериментальных животных использовали разработанную и запатентованную нами методику [3], принцип которой заключался в избирательной экстракции адреналина и норадреналина с последующим флюорометрическим анализом окисленных комплексов.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали параметрической статистикой t-статистикой Стьюдента, считая достоверными отличия в сравниваемых группах при $pSt < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Анализ экспрессии транскрипционного белка c-Fos в крупноклеточных нейронах СОЯ у крыс-самцов показал, что у животных пубертатного возраста, соответствующего 4 месяцу жизни, по сравнению с 2-месячными самцами, площадь ИРМ к белку c-Fos, его концентрация и содержание в площади ИРМ, возрастала более чем в 2 раза ($pSt < 0,05$) (рис.).

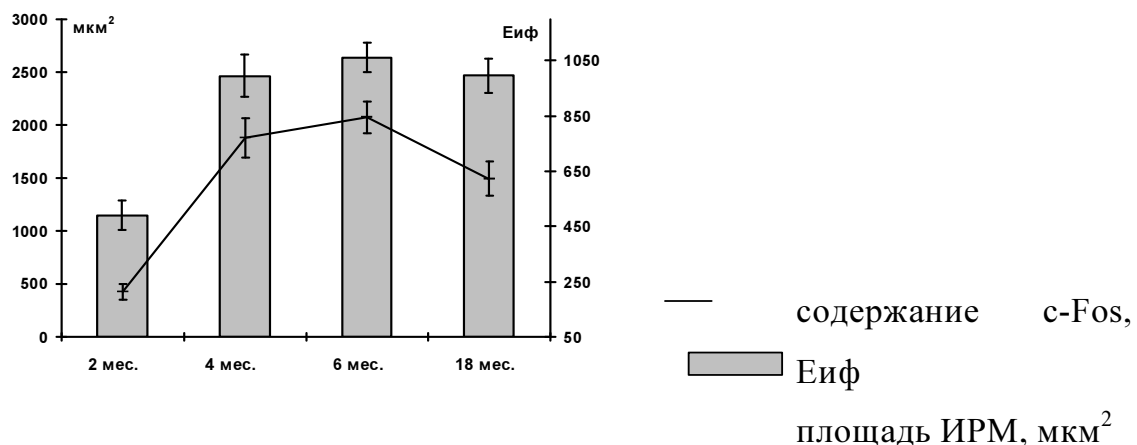


Рисунок. Візирна динаміка експресії транскрипційного фактора c-Fos в нейронах СОЯ у крыс-самців лінії Wistar.

В наступні строки, 6- і 18-місяців, площа ІРМ к белку c-Fos не змінювалася, по сравнению с 4-місячним строком, но была достоверно выше в 2,3 раза ($p_{St}<0,05$) і 2,1 раза ($p_{St}<0,05$), відповідно, чем у 2-місячних самців. Содержание белка c-Fos у 18-місячних крыс в площади ІРМ к нему, снижалось на 26 % ($p_{St}<0,05$) і 20 % ($p_{St}<0,05$), его концентрация - на 20 % ($p_{St}<0,05$) і 23 % ($p_{St}<0,05$), по сравнению с 4- і 6-місячними животними, соответственно. При этом содержание транскрипційного фактора в площади ІРМ и его концентрация оставались достоверно выше практически в 3 раза ($p_{St}<0,05$) и на 33 % ($p_{St}<0,05$), чем у 2-місячних животних, соответственно (см. рис.).

При изучении показателей гормонального ста-

туса в группах самцов-крыс в візирном аспекте нами было установлено, что к периоду полового созревания (4 місяця життя) происходило достоверное, более чем на 75 % ($p_{St}<0,05$) (табл. 1), увеличение концентрации инсулина в плазме крови с одновременным достоверным на 20 % ($p_{St}<0,05$) увеличением концентрации в крови лептина, по сравнению с препубертатным 2-х місячним периодом. В отношении контринсулярных гормонов следует отметить, что концентрация кортикостерона, являющегося основной активной фракцией глюкокортикоидов у крыс, достоверно не отличалась от показателей 2-місячних крыс, а концентрация адреналина на 10 % ($p_{St}<0,05$) достоверно превышала показатели предыдущего візирта, без изменения уровня норадреналина.

Таблица 1

Візирна динаміка концентрацій досліджуваних гормонів у крыс-самців лінії Wistar (M±m)

| Візирні групи | Конц. инсулина, мкЕД/мл | Конц. лептина, нг/мл | Конц. кортикостерона, нг/мл | Конц. адреналина, нМоль/л | Конц. норадреналина, нМоль/л |
|---------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|
| 2 мес. | 1,25±0,05 | 3,26±0,15 | 21,8±2,2 | 6,58±0,25 | 5,54±0,19 |
| 4 мес. | 2,21±0,2* | 3,93±0,25* | 25,1±3,2 | 7,34±0,28* | 5,36±0,31 |
| 6 мес. | 1,44±0,15* | 3,49±0,12 | 35,5±7,6* | 7,12±0,37 | 6,25±0,44 |
| 18 мес. | 1,34±0,16 | 4,39±0,35* | 44,9±7,4 | 6,98±0,35 | 5,21±0,15* |

Примечание. (*) - достоверные отличия параметров ($p_{St}<0,05$) по отношению к группе крыс предыдущего візирта.

Следующий изученный жизненный этап животных - 6 і 18 місяців життя, по сравнению с самцами пубертатного периода, характеризовался динамичным снижением плазменных концентраций инсулина на 53 % ($p_{St}<0,05$) і 64 % ($p_{St}<0,05$), соответственно. Установленные изменения концентраций гормонов, вероятно, обусловлены изменением секреторной активности β -клеток панкреатических островков, возможной цито-архитектонической перестройкой в них [14,

11], связанных с изменением активности метаболических процессов по сравнению с предыдущим жизненным периодом. Концентрация лептина у 6-місячних самців оставалась стабильной, по сравнению со значениями предыдущего візирта, а у старых 18-місячних животных происходило увеличение плазменной концентрации гормона на 25 % ($p_{St}<0,05$), по сравнению с предыдущим візиртом, и на 12 % ($p_{St}<0,05$), по сравнению с 4-місячними

животными. Вероятно, установленные изменения концентрации лептина связаны с повышенной метаболической активностью жировой ткани и, возможно, изменением состояния гипоталамо-гипофизарной системы [9].

При анализе концентраций изученных контринсулярных гормонов кортикостерона, адреналина и норадреналина отмечалась интересная тенденция. По сравнению с пубертатным периодом (4 месяца) у зрелых и старых самцов концентрация кортикостерона с возрастом увеличивалась на 40 % ($pSt < 0,05$) и 79 % ($pSt < 0,05$) у 6-ти 18-месячных животных, соответственно, концентрация адреналина оставалась стабильной, а норадреналина к старости снижалась практически на 20 % ($pSt < 0,05$), по сравнению с предыдущим возрастным периодом (см. табл. 1). По-видимому, выявленные изменения в активности катехоламинергической системы обусловлены существенными метаболическими перестройками, характерными для постпубертатного периода и периода инволютивных изменений.

Исследуя динамику формирования возрастной корреляционной зависимости степени экспрессии белка c-Fos в крупноклеточных нейронах СОЯ и состоянием гормонального статуса было

установлено, что у крыс в процессе их роста и развития формировалась позитивные корреляционные связи между площадью ИРМ к белку c-Fos и уровнями лептина, кортикостерона и адреналина; между концентрацией белка c-Fos и его содержанием в площади ИРМ к нему и уровнем инсулина и адреналина (табл. 2).

Таким образом нами было установлено, что в нейронах СОЯ (см. рис.) с 4-месячного возраста животного и вплоть до периода старения (18 месяцев) наблюдалось достоверное повышение концентрации белка c-Fos и площади ИРМ к нему, возможно, за счет увеличения числа нейронов, его экспрессирующих, и их функциональной активности. По-видимому, высокую экспрессию "ранних генов" в клетках СОЯ у 4-месячных крыс можно объяснить тем, что у мелких грызунов этот возраст рассматривается как период полового созревания, во время которого происходит активный рост организма, изменение эндокринного статуса, формирование полового поведения. При этом отмечается напряжение деятельности многих нейрогуморальных и гормональных механизмов способствующих перестройке всех физиологических систем. Также усиление экспрессии транскрипционного фактора c-Fos может быть

Таблица 2

Возрастная корреляционная зависимость показателей экспрессии транскрипционного фактора c-Fos в нейронах СОЯ у контрольных животных и

| Гормоны | Площадь ИРМ к белку c-Fos | Концентрация белка c-Fos в СОЯ | Содержание белка c-Fos в площади ИРМ |
|----------------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Инсулин | +0,42 | +0,62 | +0,52 |
| Лептин | +0,6 | +0,23 | +0,4 |
| Кортикостерон | +0,63 | +0,24 | +0,44 |
| Адреналин | +0,89 | +0,92 | +0,92 |
| Норадреналин | +0,15 | +0,41 | +0,3 |

связано с функциональными особенностями изучаемой структуры гипоталамуса. Установленные корреляционные зависимости степени экспрессии транскрипционного фактора c-Fos в нейронах СОЯ и уровня гормонов, регулирующих метаболизм, обеспечивающих формирование стресс-реакций, позволяют предположить существование определенных функциональных взаимосвязей между активностью нейронов СОЯ и состоянием гормонального статуса.

Выводы

1. Степень выраженности экспрессии транскрипционного фактора белка c-Fos в нейронах СОЯ зависит от возраста животного.
2. Паттерны экспрессии белка c-Fos усиливаются в нейронах СОЯ в пубертатном периоде

сохраняясь на достаточно высоком уровне вплоть до периода старения.

3. Показатели экспрессии транскрипционного фактора c-Fos в нейронах СОЯ позитивно коррелируют с уровнями лептина, инсулина, кортикостерона, адреналина, норадреналина.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейшей работе по изучению экспрессии белка c-Fos в структурах гипоталамуса планируется изучить ее особенности в нейронах аркуатного, вентромедиального и паравентрикулярного ядер гипоталамуса как в норме, так и при экспериментальных патологиях, таких как артериальная гипертензия, гестационный диабет, стрептозотоциновый диабет.

Литература. 1. Абрамов А.В. Особенности влияния

хронического пренатального стресса на структурно-функциональную организацию бета-эндокриноцитов / А. В. Абрамов, М. А. Тихоновская, Ю. М. Колесник // Клінічна та експериментальна патологія. - 2004.- Т. 3, № 2. - С. 176-179. 2. Абрамов А. В. Состояние толерантности к глюкозе у самцов, перенесших хронический пренатальный стресс / А. В. Абрамов, Ю. М. Колесник, М. А. Тихоновская // Запорожский медицинский журнал. - 2004. - № 6. - С. 38-41. 3. Панков Ю. А. Лептин - новый гормон в эндокринологии / Ю. А. Панков // Успехи физиологических наук. - 2003. - Т. 34, №2. - С. 3-20. 4. Патент 11455 Україна, МПК G01 №33/48. Спосіб визначення адреналіну та норадреналіну в одній пробі біологічного матеріалу / Колесник Ю. М., Беленічев І. Ф., Абрамов А. В., Ганчева О. В., Бухтіярова Н. В., Количева Н. Л., Павлов С. В. - № u 2005 06909; заявл. 13.07.05; опубл. 15.12.05, Бюл. № 12. 5. Buisman-Pijlman F. Individual differences underlying susceptibility to addiction: Role for the endogenous oxytocin system // F. Buisman-Pijlman, N.M. Sumracki, J.J. Gordon et al. - Pharmacol. Biochem. Behav. - 2013. - Vol. 18, № 13. - P. 221-229. 6. Guido, M.E., de Arriba Zerpa, G.A., Bussolino, D.F., Caputto, B.L. The immediate early gene c-fos regulates the synthesis of phospholipids but not of gangliosides // J. Neurosci. Res. - 1996.- Vol. 43, P. 93-98. 7. Hashimoto H. Pathophysiological function of oxytocin secreted by neuropeptides: A mini review // H. Hashimoto, Y. Uezono, Y. Ueta. - Pathophysiology. - 2012. - Vol. 19, № 4. - P. 283-298. 8. Hindmarch C. C. Whole transcriptome organisation in the dehydrated supraoptic nucleus // C. C. Hindmarch, P. Franses, B. Goodwin et al. - Braz. J. Med. Biol. Res. - 2013. - Vol. 2, № 46. - P. 1000-1006. 9. Japund?i?igon N. Vasopressin and oxytocin in control of the cardiovascular system // N. Japund?i?igon Curr Neuropharmacol. - 2013. - Vol. 11, № 2. - P. 218-230. 10. Lucibello F., Ehler F., Muller R. Multiple interdependent regulatory sites in the mouse c-fos promoter determine basal level transcription: cell type-specific effects // Nucleic. Acids. Res. -1991.- Vol. 19.-P. 3583-3591. 11. Monje P., Marinissen M.-J., Gutkind S. Phosphorylation of the Carboxyl-Terminal Transactivation Domain of c-Fos by Extracellular Signal-Regulated Kinase Mediates the Transcriptional Activation of AP-1 and Cellular Transformation Induced by Platelet-Derived Growth Factor// Mol. Cell. Biol. -2003- Vol. 23, № 19,- P. 7030-7043. 12. Ogilvie K.M., Lee S. Role of arginine-vasopressin and corticotropin-releasing factor in mediating alcohol-induced adrenocorticotropin and vasopressin secretion in male-rats bearing lesions of the paraventricular nuclei // Brain. Res.- 1997. - Vol.744, №1. - P. 83-95. 13. Paxinas G. B. The Rat Brain in Stereotaxis Coördinates // G. B. Paxinas, C. C. Watson // Sydney, Academia Press second edit, 1986. - 264 p. 14. Ueta Y. Hypothalamic vasopressin response to stress and various physiological stimuli: visualization in transgenic animal models // Y. Ueta, G. Dayanithi, H. Fujihara. - Horm. Behav. -2011. - Vol. 59, № 2. - P. 221-226. 15. Fleischmann A., Jochum W., Eferl R. et al. Rhabdomyosarcoma development in mice lacking Trp53 and Fos: tumor suppression by the Fos protooncogene // Cancer Cell.-2003.- Vol. 4.-P. 477-482.

**ВІКОВА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПРЕСІЇ БІЛКА
РАНЬОЇ ВІДПОВІДІ С-FOS У НЕЙРОНАХ
СУПРАОПТИЧНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА У
ЩУРІВ-САМЦІВ ЛІНІЇ WISTAR**

О.В. Ганчева

Резюме. Враховуючи важливу роль окситоцин - і вазопресинергічних нейросекреторних систем гіпоталамуса в регуляції великої кількості фізіологічних функцій

організму, можна припустити зміну ступеню експресії транскрипційного фактора білка c-Fos у нейронах супраоптичного ядра гіпоталамуса в процесі розвитку тварин і розглядати її варіабельність, як один із можливих показників функціональної активності гіпоталамуса. Метою дослідження було вивчити у щурів-самців лінії Wistar у віковому аспекті особливості експресії транскрипційного фактору білку c-Fos у супраоптичному ядрі гіпоталамуса, встановити кореляційні зв'язки параметрів експресії білка з рівнями досліджуваних гормонів. В ході проведеного дослідження було встановлено, що ступінь вираженості експресії транскрипційного фактора білка c-Fos у нейронах супраоптичного ядра гіпоталамуса залежить від віку, патерни експресії білка c-Fos посилюються в пубертатному періоді. Виявлені позитивні кореляційні зв'язки між площею матеріалу, імунореактивного до білка c-Fos та рівнем лептину, кортикостерону, адреналіну; концентрацій інсуліну та адреналіну з концентрацією білка c-Fos й його вмістом у площі матеріалу, імунореактивного до нього.

Ключові слова: гіпоталамус, супраоптичне ядро, білок c-Fos, експресія, щури.

**AGE-RELATED CHARACTERISTIC OF C-FOS
PROTEIN EXPRESSION IN THE NEURONS OF
HYPOTHALAMIC SUPRAOPTIC NUCLEUS IN MALE
WISTAR RATS**

O.V. Gancheva

Abstract. Taking into account the important role of oxytocin- and vasopressinergic hypothalamic neurosecretory systems in the regulation of many of organism's physiological functions the alterations of transcription factor c-Fos expression in it can be supposed. The rate of c-Fos expression may vary in the process of animals' development; it's variability can be considered to be an index of hypothalamus' functional activity. The aim of research was to study peculiarities of c-Fos transcription factor expression in hypothalamic supraoptic nucleus in male Wistar rats of different age groups, to define correlative relations of protein expression parameters with the level of the analyzed hormones. The results of research demonstrate that the rate of manifestation of transcription factor c-Fos protein expression in the neurons of hypothalamic supraoptic nucleus is age-dependent; the patterns of c-Fos protein expression intensify in the period of puberty. Positive correlative relations are established between: the area of immunoreactive material to c-Fos protein in the neurons with the level of leptin, epinephrine and corticosterone; c-Fos protein concentration and content in the immunoreactive material in the neurons with the level of insulin and epinephrine.

Key words: hypothalamus, supraoptic nucleus, c-Fos protein, expression, rats.

Zaporozhye State Medical University

Clin. and experim. pathol. - 2014. - Vol.13, №1 (47).-P.20-24.

Надійшла до редакції 10.03.2014

Рецензент – проф. С.С. Ткачук

© О.В. Ганчева, 2014