

© Колесник Ю.М., Ганчева О.В., Абрамов А.В.

УДК 612.017.1+611.814.1]-616.055.1:578.264

ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА C-FOS В НЕЙРОСЕКРЕТОРНЫХ ЯДРАХ ГИПОТАЛАМУСА КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

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

Кафедра патологической физиологии (зав. – проф. Ю.М.Колесник) Запорожского государственного медицинского университета

ЕКСПРЕСІЯ ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ФАКТОРА C-FOS В НЕЙРОСЕКРЕТОРНИХ ЯДРАХ ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ЛІНІЇ ВІСТАР У ВІКОВОМУ АСПЕКТІ

Резюме. Експресія транскрипційного фактора c-Fos в ядрах гіпоталамуса має фазну динаміку, залежить від віку тварини та функціональної активності нейронів. У паравентрикулярних і супраоптичних ядрах гіпоталамуса значна активність експресії білка c-Fos спостерігалася з періоду статевого дозрівання й до періоду старіння. У період статевого дозрівання в нейронах аркуатного ядра гіпоталамуса спостерігається активація експресії транскрипційного фактора c-Fos, а в нейронах вентромедіального ядра – зниження.

Ключові слова: ген c-fos, білок c-Fos, ядра гіпоталамуса, віковий аспект.

Впервые "ранние гены" были идентифицированы в культуре клеток при изучении механизмов геномного ответа на действие факторов роста. Установлено, что кратковременная активация экспрессии гена c-fos необходима для перехода клеток из фазы G₀ в фазу G₁ клеточного цикла [1]. Продукт гена c-fos белок c-Fos образует гетеродимер с белками семейства c-jun, формируя транскрипционный комплекс AP-1. Регуляторные элементы, связывающие AP-1 фактор, обнаружены в промоторах многих генов, продукты которых необходимы для прохождения клеточного цикла [2]. В дальнейшем оказалось, что ген c-fos необходим не только на ранних стадиях онтогенеза для регуляции пролиферации и роста, но и во взрослом возрасте для формирования долговременной памяти индивида, его обучения и специализации [2-4]. Объясняют это тем, что экспрессия гена c-fos запускает каскад молекулярно-генетических процессов, обуславливающих морфологические и

функциональные изменения в нейронах мозга [5, 6].

Цель исследования. Изучить у крыс линии Вистар возрастной аспект экспрессии транскрипционного фактора c-Fos в нейросекреторных ядрах гипоталамуса: паравентрикулярном (ПВЯ), супраоптическом (СОЯ), аркуатном (АрЯ) и вентромедіальном (ВМЯ).

Материал и методы. Исследования проведены на 40 самцах крыс линии Вистар (2, 4, 6 и 18 месяцев, по 10 особей соответственно). Животные находились на стандартном рационе при свободном доступе к воде и пище. Крыс декапитировали под этиминаловым наркозом (40 мг/кг, внутривенно). Мозг немедленно извлекали и помещали в фиксатор Буэна на 20 часов при комнатной температуре, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, хлороформе и заливали в парафин. На ротационном микротоме готовили серийные срезы гипоталамуса толщиной 14 мкм, кото-

рые депарафинировали в ксилоле, проводили регидратацию в нисходящих концентрациях этанола (100 %, 96 %, 70 %, 50 %). С помощью метода непрямой иммунофлюоресценции в гипоталамусе выявляли экспрессию белков раннего ответа (*c-Fos*). В качестве первичных антител использовали кроличьи антитела к *c-Fos* крысы (Sigma Chemical, США), с которыми гистологические срезы инкубировали в течение 18 часов во влажной камере при $T=4^{\circ}\text{C}$. После 10-минутной трехкратной отмывки избытка первичных антител в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4 срезы инкубировали 60 минут ($T=37^{\circ}\text{C}$) со вторичными антителами в разведении 1:64. В качестве вторичных антител использовали козы антитела к полной молекуле IgG кролика, конъюгированные с FITC (Sigma Chemical, США). После инкубации срезы промывали 0,1 М фосфатным буфером рН 7,4 и заключали в смесь глицерина и фосфатного буфера (9:1) для последующей люминесцентной микроскопии.

Исследовали нейроны ПВЯ, СОЯ, АРЯ и ВМЯ гипоталамуса. Принадлежность идентифицированных *c-Fos* позитивных нейронов отдельным структурам гипоталамуса определяли в соответствии со стереотаксическим атласом мозга крысы (G.V.Paxinos, C.C.Watson, 1986). Изображения с помощью видеокамеры COHU-4922 (США) вводили в систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elek-

tronik, Германия). В ходе автоматической обработки изображений ядер гипоталамуса определяли: площадь материала, иммунореактивного к транскрипционному фактору *c-Fos* (мкм^2), 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.

Полученные экспериментальные данные обработаны параметрической *t*-статистикой Стьюдента, считая достоверными отличия в сравниваемых группах при $p_{\text{ст}} < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. При изучении экспрессии транскрипционного фактора *c-Fos* в нейронах ПВЯ гипоталамуса отмечена следующая динамика: у 4- и 6-месячных животных по сравнению с 2-месячными площадь материала, иммунореактивного к белку *c-Fos*, возрастала более чем в 2 раза с увеличением его содержания в нейронах и в площади материала, иммунореактивного к нему. У 18-месячных животных все исследуемые показатели снижались по сравнению с 4- и 6-месячными крысами, но превышали таковые у 2-месячных (табл. 1).

В крупноклеточных нейронах СОЯ гипоталамуса 4-месячных животных площадь материала, иммунореактивного к белку *c-Fos*, его содержание в нейронах и в пло-

Таблица 1

Экспрессия транскрипционного фактора *c-Fos* в нейронах паравентрикулярного ядра гипоталамуса ($M \pm m$)

Возраст экспериментального животного	Площадь материала, иммунореактивного к белку <i>c-Fos</i> , мкм^2	Содержание белка <i>c-Fos</i> в нейронах, ЕИФ	Содержание белка <i>c-Fos</i> в площади материала, иммунореактивного к нему, ЕИФ/ мкм^2
2 месяца	1244,6 \pm 109,7	0,2 \pm 0,008	264,9 \pm 28,6
4 месяца	2274,3 \pm 184,6*	0,23 \pm 0,005*	552,1 \pm 53,7*
6 месяцев	2682,4 \pm 153,3	0,26 \pm 0,004*	726,9 \pm 50,2*
18 месяцев	1685,9 \pm 88,1*	0,2 \pm 0,007*	350,1 \pm 19,7*

Примечание: * – достоверные ($p_{\text{ст}} < 0,05$) отличия по отношению к крысам-самцам линии Wistar предыдущего возраста.

щади іммунореактивності возрастала більше ніж в 2 рази. В наступуючі строки (6 і 18 місяців) площа матеріала, іммунореактивного к белку c-Fos, не змінювалася по сравнению с 4-місячним строком, но была достоверно выше, чем у 2-місячних самцов. Содержание белка c-Fos в площади, іммунореактивной к нему, и в нейронах снижалось у 18-місячних крыс, оставаясь достоверно выше, чем у 2-місячних животных (табл. 2).

В нейронах АрЯ гипоталамуса 4-місячних животных наблюдалось максимальное увеличение исследуемых показателей по сравнению со всеми возрастными группами, а в возрастных группах 6 и 18 месяцев экспрессия белка c-Fos достоверно снижалась (табл. 3).

В нейронах ВМЯ гипоталамуса 2- и 6-місячних животных площадь материала, іммунореактивного к белку c-Fos, и его со-

держание в площади іммунореактивности достоверно не отличались и были максимальными по сравнению с остальными возрастными группами. У 4- и 18-місячных крыс исследуемые показатели достоверно снижались, при этом наиболее низкие значения экспрессии транскрипционного фактора c-Fos наблюдались у 4-місячных животных (табл. 4).

Анализируя полученные результаты, необходимо отметить, что экспрессия транскрипционного фактора c-Fos в исследуемых ядрах гипоталамуса подвержена фазной динамике, зависит от возраста животного, специализации и функциональной активности нейронов. В клетках ПВЯ и СОЯ с 4-місячного возраста животного наблюдается значительное увеличение площади іммунореактивности к белку c-Fos, возможно, за счет увеличения числа нейронов, его экспрессирующих, и его содержания в них.

Таблица 2

Экспрессия транскрипционного фактора c-Fos в нейронах супраоптического ядра гипоталамуса (M±m)

Возраст экспериментального животного	Площадь материала, іммунореактивного к белку c-Fos, мкм ²	Содержание белка c-Fos в нейронах, Еиф	Содержание белка c-Fos в площади материала, іммунореактивного к нему, Еиф/мкм ²
2 месяца	1148,2±142,6	0,18±0,006	214,2±28,7
4 месяца	2465,7±198,5*	0,3±0,009*	770,1±70,7*
6 месяцев	2639,9±135,3	0,31±0,009	844,8±57,9
18 месяцев	2471,9± 162,2	0,24±0,01*	623,2±60,7*

Примечание: * – достоверные ($p_{ST} < 0,05$) отличия по отношению к крысам-самцам линии Wistar предыдущего возраста.

Таблица 3

Экспрессия транскрипционного фактора c-Fos в нейронах аркуатного ядра гипоталамуса (M±m)

Возраст экспериментального животного	Площадь материала, іммунореактивного к белку c-Fos, мкм ²	Содержание белка c-Fos в нейронах, Еиф	Содержание белка c-Fos в площади материала, іммунореактивного к нему, Еиф/мкм ²
2 месяца	1389,1±154,5	0,23±0,008	346,6±45,7
4 месяца	1892,1±147,5*	0,27±0,009*	538,5±49,8*
6 месяцев	1355,2±100,3*	0,24±0,004*	351,7±34,5*
18 месяцев	1439,3±152,2	0,26±0,007*	384,6±43,9

Примечание: * – достоверные ($p_{ST} < 0,05$) отличия по отношению к крысам-самцам линии Wistar предыдущего возраста.

Експресія транскрипційного фактора c-Fos в нейронах
вентромедіального ядра гіпоталамуса (M±m)

Вік експериментального тварини	Площа матеріала, імунореактивного к белку c-Fos, мкм ²	Зміст білка c-Fos в нейронах, Еиф	Зміст білка c-Fos в площині матеріала, імунореактивного к нему, Еиф/мкм ²
2 місяці	1146,7±83,9	0,19±0,004	221,9±19,9
4 місяці	563,8±49,3*	0,19±0,004	105,7±9,5*
6 місяців	1167,9±121,6*	0,19±0,003	244,2±31,8*
18 місяців	813,8±116,6*	0,19±0,006	180,2±34,3

Примечание: * – достовірні ($p_{ST} < 0,05$) відмінності по відношенню к крысам-самцам лінії Wistar предыдущего віку.

Активацию експресії "ранніх генів" в нейронах ПВЯ і СОЯ у 4-місячних тварин можна пояснити тим, що у крыс 4-6-місячний вік розглядається як період статевого дозрівання, в час якого відбувається активний ріст організму, зміна ендокринного статусу, формування рефлексів, навиків і статевих поведінь. В цей період відзначається напруження діяльності багатьох нейрогуморальних і гормональних механізмів, сприяючих функціональній перестройке всіх фізіологічних систем (И.П.Западнюк і др., 1983).

Крім того, посилення експресії транскрипційного фактора c-Fos може бути пов'язано з функціональними особливостями вивчаємих структур гіпоталамуса: ПВЯ завдяки синтезу широкого спектра нейрогормонів і нейромедіаторів є координаційним центром вегетативних функцій, регулятором енергетичного гомеостазу, гіпофізарно-ендокринної системи, вуглеводного і ліпідного обміну [7], СОЯ є центральним сенсором осмотичного тиску, регулятором водно-солевого обміну, забезпечує стресс-реалізуючу функцію [8].

Оцінюючи відповіді "раннього гена" c-fos в нейронах АрЯ і ВМЯ гіпоталамуса, була помічена обернена залежність. В період статевого дозрівання тварини 4-го місяця життя відзначалося значне підвищення

активності експресії генів в АрЯ і зниження в ВМЯ. Вероятно, подібні зміни залежать від функцій, виконуваних досліджуємих ядрами. Так, відомо, що нейронами АрЯ гіпоталамуса синтезується нейрогормон НРҮ. В той же час ВМЯ гіпоталамуса є "їдливим центром", а саме "центром насичення", тому низька його активність в період статевого дозрівання (4 місяці) сприяє збільшенню імпульсної активності нейронів "центра голоду" і стимуляції їдливого поведіння [9].

Висновки. 1. Експресія транскрипційного фактора c-Fos в ядрах гіпоталамуса підвладна фазній динаміці, залежить від віку тварини, спеціалізації досліджуємих структур і функціональної активності нейронів. 2. В паравентрикулярному і супраоптичному ядрах гіпоталамуса висока активність експресії білка c-Fos спостерігається з періоду статевого дозрівання і практично до старечого віку. 3. В період статевого дозрівання в нейронах аркуатного ядра гіпоталамуса помічена активація експресії транскрипційного фактора c-Fos, а в нейронах вентромедіального ядра – зниження.

Перспективи наукового пошуку. Цілесобразно дослідити роль вивчених показателів в реакції на вплив різних несприятливих факторів у крыс різного віку.

Литература

1. Анохин К.В. Психофизиология и молекулярная генетика мозга / К.В.Анохин // Основы психофизиологии. – СПб., 2001. – С. 116-186.
2. Hai T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity / T.Hai, T.Curran // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 88. – P. 3720-3724.
3. Monje P. 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 / P.Monje, M.-J.Marinissen, S.Gutkind // Mol. Cell. Biol. – 2003. – Vol. 23, № 19. – P. 7030-7043.
4. Abate C. Transcriptional regulation by Fos and Jun in vitro: interaction among multiple activator and regulatory domains / C.Abate, D.Luk, T.Curran // Mol. Cell. Biol. – 1998. – Vol. 11. – P. 3624-3632.
5. The immediate early gene c-fos regulates the synthesis of phospholipids but not of gangliosides / M.E.Guido, G.A. de Arriba Zepa, D.F.Bussolino [et al.] // J. Neurosci. Res. – 1999. – Vol. 43. – P. 93-98.
6. Hughes, P. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system / P.Hughes, M.Dragunow // Pharmacol. Rev. – 1998. – Vol. 47. – P. 133-178.
7. Герништейн Л.М. Морфохимическая характеристика мозга крыс, генетически предрасположенных (Август) и устойчивых (Вистар) к эмоциональному стрессу / Л.М.Герништейн, А.В.Сергутина, Р.М. Худоевков // Нейрохимия. – 2000. – Т. 17, № 2. – С. 135-139.
8. Nishimura M. Upregulation of the brain renin-angiotensin system in rats with chronic renal failure / M.Nishimura, H.Takahashi, M.Yoshimura // Acta Physiol. (Oxf). – 2007. – Vol. 189, № 4. – P. 369-377.
9. Development of VMU obesity: in vivo insulin secretion and tissue insulin sensitivity / L.Penicaud, M.F.Kinebanyan, P.Ferre [et al.] // Amer. J. Physiol. – 1999. – Vol. 257, № 2, Pt.1. – P. 255-260.

ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА C-FOS В НЕЙРОСЕКРЕТОРНЫХ ЯДРАХ ГИПОТАЛАМУСА КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

Резюме. Экспрессия транскрипционного фактора c-Fos в ядрах гипоталамуса динамична, зависит от возраста животных и функциональной активности нейронов. Высокая активность экспрессии белка c-Fos наблюдалась в паравентрикулярных и супраоптических ядрах с периода полового созревания до периода старения. В период полового созревания в нейронах аркуатного ядра отмечена активация экспрессии транскрипционного фактора c-Fos, а в нейронах вентромедиального ядра – снижение.
Ключевые слова: ген c-fos, белок c-Fos, ядра гипоталамуса, возрастной аспект.

THE EXPRESSION OF TRANSCRIPTION FACTOR C-FOS IN HYPOTHALAMIC NEUROSECRETORY NUCLEI IN WISTAR RATS IN AN AGE-RELATED ASPECT

Abstract. The expression of the transcription c-Fos factor has a phasic dynamics, depends on the age of the animals and the functional activity of neurons. A considerable activity of the expression of c-Fos protein in the paraventricular and supraoptic nuclei was observed during the period of pubescence up to the period of senescence. An activation of the expression of transcription factor c-Fos in the neurons of the arcuate nucleus of the hypothalamus, whereas in the neurons of the ventromedial nucleus – a decrease were observed during the period of pubescence.

Key words: c-fos gene, c-Fos protein, hypothalamic nuclei, age aspect.

State Medical University (Zaporizhzhia)

Надійшла 07.11.2008 р.
 Рецензент – проф. С.С.Ткачук (Чернівці)