

# АКТИВАЦИЯ КЛЕТОК ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ СТРУКТУР ПРИ ВВЕДЕНИИ АНТИГЕНОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ (по экспрессии c-Fos гена)

Перекрест С.В., Гаврилов Ю.В., Абрамова Т.В.,  
Новикова Н.С., Корнева Е.А.

Отдел общей патологии и патофизиологии;

ГУ НИИ Экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

**Резюме.** Проведен анализ степени активации гипоталамических структур (AHN, PVH, DMH, VMH, LHA, PH) в первые часы после введения антигенов различной природы (липополисахарид и бычий сывороточный альбумин). Во всех исследованных гипоталамических структурах после введения антигенов наблюдалось увеличение числа c-Fos позитивных клеток по сравнению с контролем. Реакция на ЛПС характеризовалась активацией большего числа нейронов. Наиболее активно на липополисахарид реагировали структуры AHN, PVH, LHA и PH. Введение бычьего сывороточного альбумина инициировало активацию меньшего количества клеток, но содержание в них белка c-Fos было более высоким, что проявлялось в повышении оптической плотности клеток VMH, LHA и PH. Таким образом, в настоящей работе показано, что при введении антигенов разной природы паттерн активации гипоталамических структур различен.

**Ключевые слова:** c-Fos, гипоталамус, липополисахарид, бычий сывороточный альбумин.

*Perekrest S.V., Gavrilov Yu.V., Abramova T.V., Novikova N.S., Korneva E.A.*

## ACTIVATION OF CELLS FROM HYPOTHALAMIC STRUCTURES AFTER INJECTION OF ANTIGENS DIFFERENT IN THEIR NATURE (by the c-Fos expression)

**Abstract.** Activation levels of hypothalamic structures (AHN, PVH, DMH, VMH, LHA, PH) were analyzed within first hours after injection of antigens [lipopolysaccharide (LPS) and bovine serum albumine [BSA]]. For all investigated hypothalamic structures, an increase of c-Fos positive cells numbers was observed after injection of the antigens, as compared to the controls. LPS injection caused activation of more multiple neuron populations. AHN, PVH, LHA, and PH structures exhibited the highest levels of c-Fos activation upon LPS application. BSA injection induced activation of lesser cells quantities, but their enrichment in c-Fos protein was higher, thus resulting into increased optical density of VMH, LHA and PH neurons. Hence, the present work has shown that activation pattern of hypothalamic structures differs upon application of antigens that are different by their origin.

*(Med. Immunol., 2006, vol.8, № 5-6, pp 631-636)*

## Введение

Одним из перспективных научных направлений, интенсивно развивающихся в мире, является иммунофизиология, рассматривающая процессы взаимодействия нервной и иммунной системы. Совокупная работа этих систем обеспечивает поддержание постоянства внутренней среды организма, сохранение его гомеостаза. Многие регуляторные факторы, такие

как гормоны, цитокины, нейромедиаторы и нейропептиды, не только функционируют в обеих системах, но и продуцируются клетками и нейроэндокринной, и иммунной систем. Обнаружение рецепторов к гормонам и нейромедиаторам на иммуокомпетентных клетках, с одной стороны, и рецепторов цитокинов на клетках нейроэндокринной системы, с другой, сделало понятным механизм влияния этих регуляторных факторов как на иммунологические процессы, так и на функциональное состояние структур центральной нервной системы (ЦНС) [6].

Поскольку гипоталамус участвует в регуляции всех эндокринных и вегетативных функций, особый интерес представляет изучение роли активации ги-

## Адрес для переписки:

Перекрест София Владимировна, ГУ НИИ  
экспериментальной медицины, 197376,  
Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д.12.  
Тел.: 234-07-64, факс 234-93-94.  
E-mail: Soleil15@yandex.ru

поталамических структур для выявления механизмов регуляции развития иммунного ответа со стороны нервной системы.

Показана активация различных гипоталамических структур по интенсивности экспрессии маркера активации нейронов – белка c-Fos в ответ на разнообразные воздействия [1, 5, 7-11, 14, 15, 16, 18]. При введении антигенов различной природы и разной степени иммуногенности происходит увеличение интенсивности экспрессии белка c-Fos в различных областях мозга крыс, включая гипоталамические структуры [8, 9, 12, 14, 18], но в подобных исследованиях не проводилось сравнительного анализа влияния различных антигенов на активацию структур мозга. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что интенсивность, локализация и продолжительность изменений экспрессии гена c-fos в ЦНС зависит от характера стимула и способа воздействия. Например, уже через 2 часа после введения липополисахарида (ЛПС) наблюдается активация экспрессии белка c-Fos в паравентрикулярном (PVN), супраоптическом (SO) и аркуатном (ARH) ядрах гипоталамуса, структур амигдаллы, а также ядрах таламуса [14]. В то же время при введении антигена иной природы (стафилококковый энтеротоксин В) происходит преимущественно активация нейронов амигдаллы [12, 13]. Такое различие реакций может быть связано с природой антигена. Как известно, ЛПС – тимус-независимый антиген, ответ на него не требует Т-В-клеточной кооперации и потому развивается быстрее, чем иммунный ответ на стафилококковый энтеротоксин В, который является тимус-зависимым антигеном. Кроме того, ЛПС является мощным индуктором синтеза дополнительного пула провоспалительных цитокинов, в частности IL-1, что может усиливать сигнал, получаемый ЦНС при введении ЛПС. Известно, что такие гипоталамические структуры, как переднее ядро (АН) и заднее гипоталамическое поле (РН) оказывают наибольшее влияние на динамику развития иммунных реакций [2-4]. В связи с этим, особый интерес представляет изучение паттерна активации данных структур мозга при воздействии разных антигенов различной природы и степени иммуногенности, инициирующих различные пути развития иммунного ответа.

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы определить особенности активации клеток гипоталамических структур при развитии иммунных реакций в ответ на введение антигенов различной природы: липополисахарида (ЛПС) и бычьего сывороточного альбумина (БСА), по экспрессии белка c-Fos.

## Материалы и методы

Работа выполнена на 50 крысах, взрослых самцах породы Wistar весом 200-250 г., адаптированных к условиям эксперимента. Животных содержали в условиях вивария при комнатной температуре с 12-

часовым циклом свет/темнота, свободным доступом к воде и пище, на стандартной диете в соответствии с нормами содержания лабораторных животных.

### Экспериментальные группы:

**Группа 1.** Интактные животные.

**Группа 2.** Контрольные животные, которым внутривенно вводили 200 мкл физиологического раствора.

**Группа 3.** Животные, которым внутривенно вводили 25 мкг/кг липополисахарида (*E.coli* 055:B5, SIGMA) в 200 мкл физиологического раствора.

**Группа 4.** Животные, которым внутривенно вводили 25 мг/кг бычьего сывороточного альбумина (SIGMA) в 200 мкл физиологического раствора.

Через 2 часа после инъекции крыс наркотизировали внутривенно фенобарбиталом (60 мг/кг). Фиксацию мозга осуществляли путем интракардиальной перфузии, охлажденным раствором параформальдегида (100 мл 4% параформальдегида на 0,1M PBS (pH 7,4), содержащего 0,2% пикриновой кислоты), предварительно промыв 50 мл физиологического раствора с гепарином (20 ед./мл).

### Иммуногистохимическое выявление c-Fos белка

Через 1-2 часа у перфузированных животных извлекали мозг с последующей дофиксацией в новой порции фиксирующей смеси, содержащей 15% сахарозу, в течение 12 часов при +4°C, после чего перекладывали в 20% раствор сахарозы. Фронтальные срезы (30 мкм) готовили на замораживающем микротоме при -27°C. Готовые срезы собирали в десятилуночные планшеты (объем лунок – 3 мл) в 20% раствор сахарозы с последующей отмывкой фосфатно-солевым буфером (ФСБ) 2 раза по 5 минут, затем на 10 минут перекладывали в 3% раствор перекиси водорода и снова дважды отмывали ФСБ. После этого для подавления неспецифической реакции срезы помещали в 0,1 % раствор БСА на 0,4% тритоне. Планшет со срезами 2 часа держали на шейкере, а затем срезы в течение 12 часов инкубировали с первичными поликлональными антителами к семейству c-Fos белков (Sigma) при +4°C (разведение 1:5000 в ФСБ, содержащем 0,1% БСА и 0,4% тритона). Трижды отмыв срезы в ФСБ, их инкубировали с вторичными антикроличьими IgG антителами, меченными пероксидазой (Sigma), в разведении 1:300 в ФСБ, содержащем 0,4% тритона. На все время инкубации планшеты со срезами помещали на шейкер. По истечении двух часов срезы дважды отмывали ФСБ и однократно в 0,01% трис-HCl буфере (pH=7,4). Визуализацию иммуногистохимической реакции производили 0,02% раствором диаминобензидина (ДАБ) на 0,01% трис-HCl буфере, содержащем 0,001% перекиси водорода, в течение 15 минут. После этого срезы отмывали в ФСБ, помещали в дистиллированную воду и монтировали на стекла. Высушенные на воздухе препараты погружали на 15

мин в 100% этиловый спирт и на 10 мин в ксилол, после чего заключали в канадский бальзам.

#### Подсчет клеток:

Подсчет клеток производили, используя систему Иста-Видео-Тест. Срезы мозга исследовали при 40-кратном увеличении светового микроскопа. С помощью компьютерной программы Иста-Видео-Мастер определяли площадь среза, на которой проводили подсчет клеток и оптическую плотность окраски клеток и фона для каждого среза и структуры. При анализе количества с-Fos позитивных клеток учитывали только те клетки, оптическая плотность которых превышала окраску фона как минимум в 1,25 раза и выше. Для сопоставления количества с-Fos позитивных клеток данные количественных подсчетов пересчитывали на унифицированную площадь, равную 10000 мкм<sup>2</sup>. Для сравнительного анализа степени активации экспрессии с-Fos-подобного белка в структурах гипоталамуса определяли относительный коэффициент (ОК) и относительную оптическую плотность (ООП) окраски с-fos-позитивных клеток по формулам:

$$OK = \frac{\text{число с-Fos-позитив. клеток после введения антигена (ЛПС или БСА)}}{\text{число с-Fos-позитив. клеток после введения физ. раствора}}$$

$$ООП = \frac{\text{ср. опт. плотность с-Fos-позитив. клеток}}{\text{ср. опт. плотность фона}}$$

Кроме того, с-Fos-позитивные клетки распределяли на несколько классов в зависимости от их оптической плотности, при этом последующий класс отличался от предыдущего на 25%. Для каждой структуры оценивали процентное соотношение количества клеток различных классов.

#### Статистическая обработка:

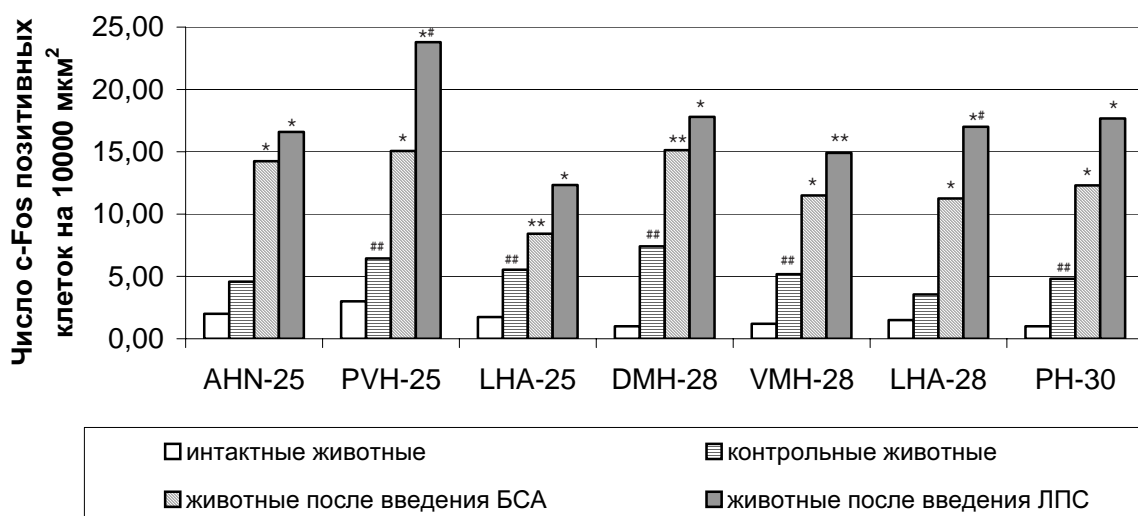
Статистическую обработку результатов проводили с использованием описательной статистики, а также по t-критерию Стьюдента. Для построения диаграмм использовали пакет программ Microsoft Office XP.

## Результаты

Проанализирована реакция клеток различных гипоталамических структур: паравентрикулярного ядра (PVH-25); переднего гипоталамического ядра (АНН-25); латеральной гипоталамической области (ЛНА-25; ЛНА-28); дорзомедиального ядра (ДМН-28); вентромедиального ядра (ВМН-28); заднего гипоталамического поля (РН-30) на 25, 28 и 30 уровнях согласно атласу Swanson's [17].

Анализ количества с-Fos-позитивных клеток показал, что у животных, которым внутривенно вводили антиген (ЛПС или БСА), во всех исследуемых структурах гипоталамуса происходило увеличение числа активированных нейронов по сравнению с их количеством у интактных и контрольных животных (рис. 1). Тенденция к более выраженной активации гипоталамических структур после введения ЛПС, по сравнению с реакцией на введение БСА, наблюдалась в большинстве структур, хотя достоверность была показана только для ЛНА-28 и PVH-25 (рис. 1).

Поскольку исходно количество клеток в различных структурах не одинаково, то по абсолютному количеству с-Fos позитивных клеток можно судить лишь о степени активации каждой данной структуры в ответ на различные воздействия. Кроме того, при введении физиологического раствора (контрольная группа) в различных гипоталамических структурах интенсивность экспрессии белка с-Fos была не оди-



**Рис. 1.** Изменение количества с-Fos позитивных клеток различных гипоталамических структур мозга крыс после введения антигенов ЛПС и БСА. \* –  $P < 0,01$  по отношению к количеству с-Fos-позитивных клеток у контрольных животных (введение физиологического раствора), # –  $P < 0,01$  по отношению к количеству с-Fos-позитивных клеток у животных после введения БСА; \*\* –  $P < 0,05$  по отношению к количеству с-Fos-позитивных клеток у контрольных животных, \*\*\* –  $P < 0,05$  по отношению к количеству с-Fos-позитивных клеток у интактных животных.

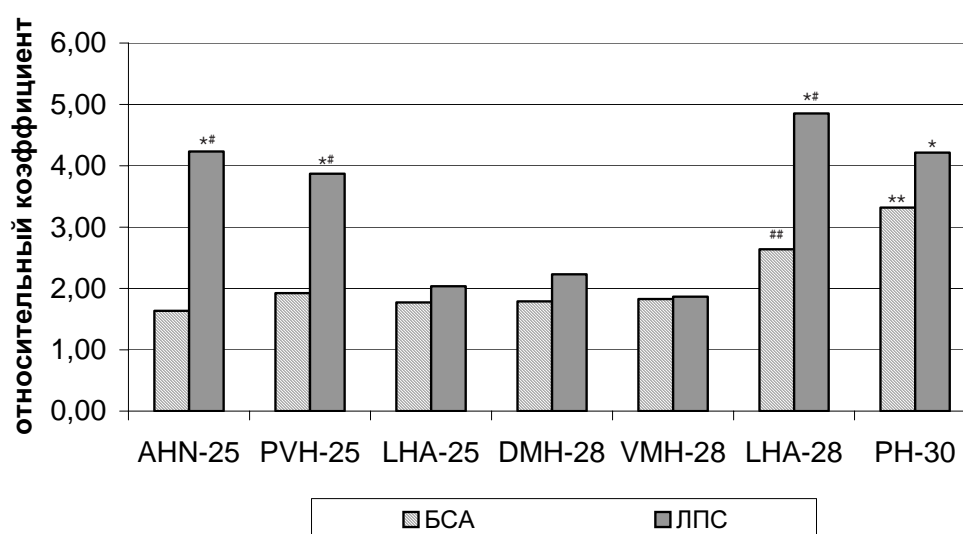
накова, поэтому для проведения сравнения степени активации нейронов различных структур были ОК и ООП.

Анализ результатов ОК позволил выявить, что выраженная реакция на введение ЛПС происходит в АНН-25, PVH-25, LHA-28 и PH-30. После введения БСА активация гипоталамических структур была менее выражена (рис. 2).

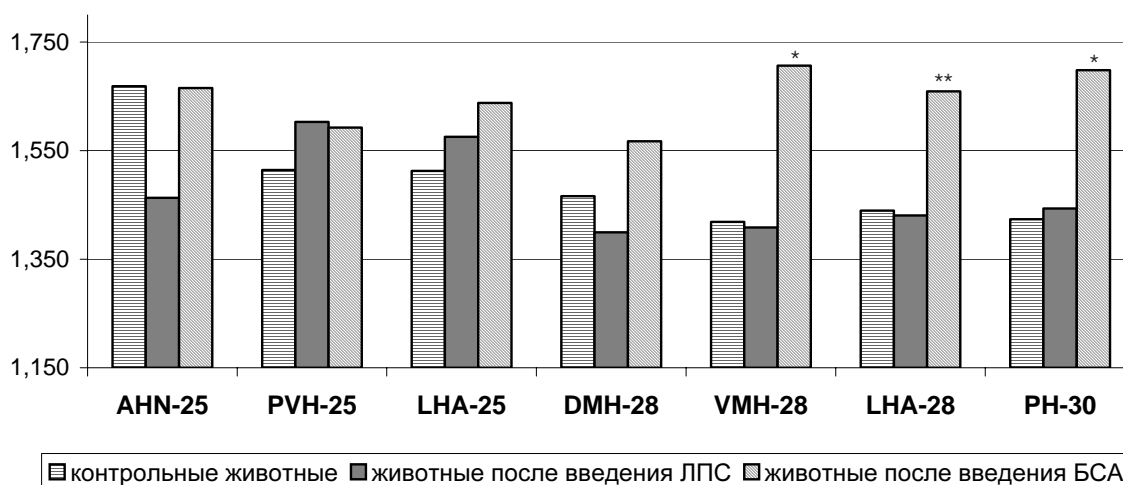
Степень активации структуры определяли не только по количеству с-Fos позитивных клеток, но и по их оптической плотности, отражающей содержание с-Fos белка в клетке. Сравнение степени активации гипоталамических структур производилось на основе анализа ООП. Анализ исследуемых структур по данному показателю выявил, что после введения

ЛПС при возрастании количества с-Fos-позитивных клеток не наблюдается увеличения их средней оптической плотности по отношению к контролю. При введении БСА показатель ООП с-Fos-позитивных клеток возрастал по отношению к контролю в VMH-28, LHA-28 и PH-30 (рис. 3).

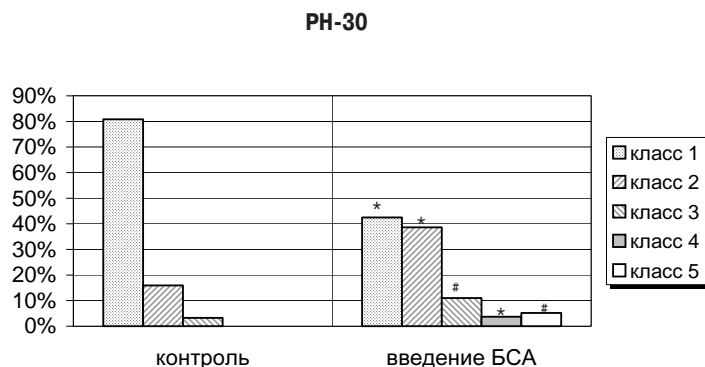
Ранжирование с-Fos позитивных клеток по классам согласно их оптической плотности позволило обнаружить, что возрастание показателя ООП с-Fos-позитивных клеток в VMH-28, LHA-28 и PH-30 в ответ на введение БСА происходит в основном за счет увеличения числа активированных клеток с более высокой оптической плотностью (рис. 4, 5). В других исследованных структурах при введении БСА, как и после введения ЛПС, распределение



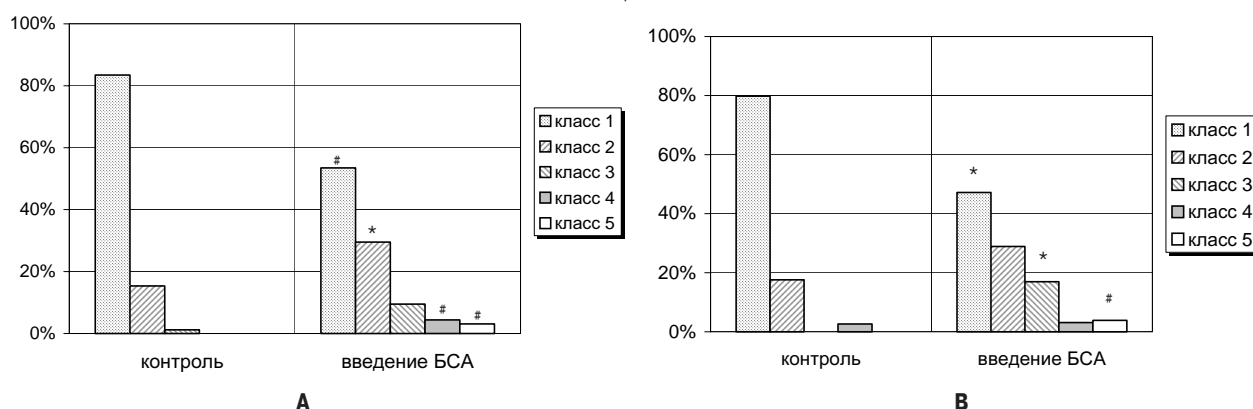
**Рис. 2. Изменение относительного коэффициента активации гипоталамических структур мозга крыс по экспрессии белка с-Fos при введении антигенов.** \* –  $P < 0,001$  по отношению к его значению для LHA-25, DMH-28, VMH-28; \*\* –  $P < 0,05$  по отношению к его значению для АНН-25, LHA-25, VMH-28, \*\* –  $P < 0,05$  - АНН-25; \* –  $P < 0,01$  по отношению к его значению у животных после введения БСА. Величина относительного коэффициента рассчитывалась как отношение числа с-Fos-позитивных клеток после введения антигена к их количеству у контрольных животных (введение физиологического раствора).



**Рис. 3. Изменение относительной оптической плотности с-Fos позитивных клеток гипоталамических структур мозга крыс при введении антигенов ЛПС и БСА.** \* –  $P < 0,01$  по отношению к значению относительной оптической плотности с-Fos-позитивных клеток у животных контрольной группы \*\* –  $P < 0,05$  по отношению к значению относительной оптической плотности с-Fos-позитивных клеток у животных контрольной группы.



**Рис. 4. Распределение количества c-Fos позитивных клеток в заднем гипоталамическом поле крыс по классам согласно их оптической плотности.** \* –  $P < 0,01$ ; # –  $P < 0,05$  по отношению к количеству c-Fos-позитивных клеток определенного класса у животных контрольной группы (введение физиологического раствора). Относительная плотность клеток каждого последующего класса отличается от предыдущей на 25%.



**Рис. 5. Распределение количества c-Fos позитивных клеток в различных структурах гипоталамуса крыс по классам согласно их оптической плотности.** А – вентромедиальное ядро, уровень 28 (VMH-28); В – латеральная гипоталамическая область, уровень 28 (LHA-28) по атласу Swanson's; \* –  $P < 0,01$ ; # –  $P < 0,05$  по отношению к количеству c-Fos-позитивных клеток определенного класса у животных контрольной группы. Относительная плотность клеток каждого последующего класса отличается от предыдущей на 25%.

c-Fos позитивных клеток по классам не отличалось от контроля.

## Обсуждение

В настоящей работе проведен анализ степени активации гипоталамических структур в ответ на введение относительно малых доз различных антигенов. В качестве антигенов были использованы такие принципиально разные по своей природе и механизмам инициации иммунных процессов препараты, как ЛПС и БСА, обладающие разной степенью иммуногенности. Аппликация тимус-зависимых и тимус-независимых антигенов приводит к синтезу различных комбинаций цитокинов, и сигналы, получаемые структурами ЦНС, обуславливают активацию различных нейронов [14].

Использование в работе метода определения индукции синтеза c-Fos белка дает возможность судить о поступлении в клетки ЦНС информации об определенном воздействии, в конкретном случае, о введе-

нии антигена. Впервые проведен сравнительный анализ активации гипоталамических структур в ответ на действие таких принципиально разных по своей природе и степени иммуногенности антигенов, как ЛПС и БСА. Хотя все исследованные структуры активировались после их введения, уровень экспрессии c-Fos белка был различен, что позволило выявить структуры гипоталамуса, в первые часы после введения антигена отвечающие наибольшей активацией на действие ЛПС или БСА. Наблюдавшаяся тенденция к более выраженной активации структур по белку c-Fos через 2 часа после введения ЛПС, по сравнению с БСА, может быть связана с тем, что данный антиген, в отличие от БСА, способен вызывать более интенсивный иммунный ответ и приводить к появлению пула провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ), что способствует амплификации сигнала, воспринимаемого клетками нервной системы.

Более выраженная активация таких структур, как AN-25, PVN-25, LHA-28, RH-30, после введения ЛПС согласуется с уже имеющимися данными:



именно эти структуры (AHN-25, PVH-25, LHA-28, PH-30) оказывают наибольшее влияние на динамику развития иммунных реакций [2-4].

После введения БСА наиболее высокая степень активации наблюдалась в заднем гипоталамическом поле (PH-30). Следует отметить, что LHA имеет гетерогенный состав клеток, которые по-разному отвечают на антигенные стимулы. Более выраженная активация экспрессии c-Fos белка была констатирована в клетках каудальной области этой структуры (LHA-28) при введении как ЛПС, так и БСА.

Ранжирование клеток на классы согласно их оптической плотности позволило установить, что в ответ на введение БСА при меньшем количестве c-Fos позитивных клеток наблюдается более выраженная экспрессия гена в клетках VMH-28, LHA-28 и PH-30, чем при введении ЛПС.

Таким образом, показано, что при введении малых доз антигенов разной природы, происходит активация ряда гипоталамических структур: PVH-25, AHN-25, LHA-25, LHA-28, VMH-28, DMH-28, PH-30, но паттерн этой активации различен, что свидетельствует в пользу дифференцированного ответа нервной системы на сигналы, вызванные воздействием антигенов различной природы.

## Список литературы

1. Барабанова С.В., Головкин О.И., Казакова Т.Б., Корнева Е.А., Новикова Н.С., Носов М.А. Влияние стресса на экспрессию индуцибельных генов c-fos и ИЛ-2 в клетках нервной и иммунной систем // Нейрохимия. – 1998. – Т.15. – №4. – С.380-387.
2. Корнева Е.А., Хай Л.М. Влияние разрушения участков гипоталамической области на процесс иммуногенеза // Физиол. ж. – 1963. – Т.49. – №1. – С.42-48.
3. Корнева Е.А. О влиянии локального разрушения структур заднего гипоталамуса на интенсивность синтеза белков крови и органов у кроликов // Физиол. ж. СССР. – 1969. – Т.55. – №1. – С.93-98.
4. Лесников В.А., Аджиева С.Б., Исаева Е.Н. Гипоталамическая модуляция гемопоэтической функции костного мозга // Сб. I Всесоюз. Иммунол. Съезда. Тез. – М., 1989. – Т.1. – С.331.
5. Носов М.А. Экспрессия генов c-Fos и интерлейкина-2 в гипоталамических структурах головного мозга крыс после антигенного воздействия: дис. к.б.н.: 03.00.04.; 14.00.16. – СПб., 2001. – 115 с. (РАМН НИИЭМ).
6. Besedovsky H.O., del Rey A. Immune-neuroendocrine interactions: facts and hypotheses // Endocrine rev. – 1996. – Vol.17. – №1. – P.64-102.
7. Chang S.L., Ren T., Zadina J.E. Interleukin-1 activation of FOS proto-oncogene protein in the rat hypothalamus. Brain Res – 1993 – Vol. 617. – P.123-130.
8. Elmquist J.K., Saper C.B. Activation of neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus by intravenous lipopolysaccharide // J. of comp. neurol. – 1996. – Vol.374. – №3. – P.315-331.
9. Elmquist J.K., Scammell T.E., Jacobson C.D., Saper C.B. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration // J. of comp. neurol. – 1996. – Vol.371. – №1. – P.85-103.
10. Ericsson A., Kovacs K.J., Sawchenko P.E. A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons // J. Neurosci – 1994. – Vol.14. – P. 897-913.
11. Gavrilo Y. LPS induced expression of c-Fos-like protein in the cells of hypothalamic structures after painful electrical stimulation // The 6<sup>th</sup> meeting of the International Society for NeuroImmunoModulation (Athens, Greece, September 25-28, 2005). – Athens, Greece, 2005. – 87 p.
12. Gaykema R.P. A., Goehler L.E., Armstrong C.B., Khorsand J., Maier S.F., Watkins L.R. Differential FOS expression in rat brain induced by lipopolysaccharide and staphylococcal enterotoxin B. // Neuroimmunomodulation. – 1999. – Vol.6. – 220 p.
13. Goehler L.E., Gaykema R.P.A., Hansen K. Staphylococcal enterotoxin B induces fever, brain c-Fos expression, and serum corticosterone in rats // Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. – 2001. – Vol.280. – P. 1434-1439.
14. Goehler L.E., Gaykema R.P.A., Hansen M. K. Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. // Autonomic Neuroscience: Basic and clinical. – 2000. – Vol.85. – P.49-59.
15. Kovacs K. J. Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map // Neurochem. int. – 1998. – Vol. 33. – P.287-297.
16. Rivest S., Torres G., Rivier C. Differential effects of central and peripheral injection of interleukin-1-beta on brain c-fos expression and neuroendocrine function // Brain res. – 1992. – Vol.587. – №1. – P.13-23.
17. Swanson L.W. Brain maps III. Structure of the rat brain. – Trd. rev. ed. – San-Diego, Cal. USA: Elsevier acad. press, 2004. – 183p.
18. Zhang Y.-H., Jan Lu J.K., Elmquist J.K., Saper C.B. Lipopolysaccharide activates specific populations of hypothalamic and brainstem neurons that project of the spinal cord // J. of Neuroscience. – 2000. – Vol.20(17). – P.6578-6586.

поступила в редакцию 24.03.2006

принята к печати 17.06.2006