

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ПРЕПРООРЕКСИНА В ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС ПРИ ОГРАНИЧЕНИИ ПОДВИЖНОСТИ И ОХЛАЖДЕНИИ

ШАИНИДЗЕ К. З., НОВИКОВА Н. С., АЛЕШИНА Г. М., ДАРИНСКИЙ Ю. А.¹,
СЫНЧИКОВА А. П., академик РАМН КОРНЕВА Е. А.

ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН»,
Санкт-Петербург,

¹ГУ «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена»,
Санкт-Петербург

Шаинидзе К. З., Новикова Н. С., Алешина Г. М., Даринский Ю. А., Сынчикова А. П., Корнева Е. А. Изменение уровня экспрессии гена препроорексина в гипоталамусе крыс при ограничении подвижности и охлаждении // Мед. akad. журн. 2009. Т. 9. № 2. С. 36–40. ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН», Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12; ГУ «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена», Санкт-Петербург.

Воздействие стрессорных факторов разного рода приводит к значительным изменениям активности иммунной системы, что сказывается на течении инфекционного процесса. Показано изменение уровней экспрессии гена препроорексина при комбинированном стрессорном воздействии – ограничение подвижности и охлаждение, – вызывающем иммуносупрессию. Установлено избирательное изменение иммунореактивности орексинсодержащих нейронов при данных воздействиях, что свидетельствует о дискретности и функциональной неоднородности популяции орексинсодержащих нейронов гипоталамуса. Выявленные изменения реакций в центральной нервной системе на фоне стресс-индуцированной дисфункции иммунной системы важно учитывать в клинической практике при наличии инфекционного процесса у людей, перенесших сильный психоэмоциональный стресс.

Ключевые слова: орексины, иммуносупрессивный стресс, гипоталамус.

Shainidze K. Z., Novikova N. S., Aleshina G. M., Darinsky J. A., Sychikova A. P., Korneva E. A. Changes in immunoreactivity of orexin-A-positive neurons after restraint stress and cold stress applications // Med. Acad. Journ. 2009. Vol. 9. № 2. P. 36–40. Research Institute of Experimental Medicine of the RAMS, St. Petersburg, 197376; Gertsen State Pedagogical University, St. Petersburg.

As it is known influence of any stressor factors leads to considerable changes of immune system activity that affects current of infection process. Change of the expression level of preproorexin gene has been studied after restraint and cold-restraint stress application. Also selective alteration of immunoreactivity of orexin-containing neurons is established after these kinds of stress application. Orexin-containing neurons are located mostly in structures on brain slices of 28, 29, 31 levels, and have different immunoreactivity, that testifies a functional heterogeneity of population of orexin-containing neurons in hypothalamus. The revealed changes of reactions in the central nervous system during stress-induced dysfunction of immune system are important for considering in clinical practice in the people with infection process who have transferred strong psychoemotional stress.

Key words: orexin, immune supression stress, restraint stress, hypothalamus.

Широко известно, что развитие инфекционного процесса в большей степени зависит от функциональной активности иммунной системы, которая, в свою очередь, находится под влиянием нейрогуморальных факторов. Данные экспериментальных и клинических исследований подтверждают, что воздействие стрессорных факторов разного рода приводит к значительным изменениям активности иммунной системы, что сказывается и на течении инфекционного процесса [1, 2, 4, 8, 9, 10, 23, 25]. Поэтому одной из важнейших задач современной иммунофизиологии является исследование механизмов центральной регуляции функций иммунной системы и коррекции ее стресс-индуцированных дисфункций. В настоящий момент есть основания полагать, что

орексины могут принимать участие в регуляции нейроиммунных взаимодействий. Изучение возможной роли нейромедиатора орексина, открытого в 1998 г. только начинается [21]. Орексинсодержащие нейроны локализованы, главным образом, в периферической области латерального гипоталамического поля (ЛНА). Небольшое количество их также представлено в паравентрикулярном (PVN), дорзомедиальном (DMH) ядрах и заднем поле гипоталамуса (PH) [24, 18]. В настоящий момент есть основания полагать, что орексины могут принимать участие в регуляции нейроиммунных взаимодействий. Нейроны латеральной гипоталамической области связаны полисинаптически с нейронами, иннервирующими красный костный мозг [5, 6] и селезенку [26], а элек-

тностимуляция латеральной области гипоталамуса усиливает цитотоксическую активность НК-клеток селезенки [27, 13, 22]. Кроме того, нейроны гипоталамических структур, в том числе в латеральной гипоталамической области (ЛНА), активируются в первые часы после введения антигенов различной природы [27, 13, 22, 17].

Показано снижение иммунореактивности орексинсодержащих нейронов гипоталамуса через 6 ч после введения ЛПС [17]. Внутривенное введение LPS ингибирует активность орексинсодержащих нейронов и снижает синтез м-РНК препроорексина в гипоталамусе животных с пищевой депривацией, что проявляется в снижении аппетита и двигательной активности животного [3]. Внутривентрикулярное введение орексина А на фоне лихорадки, вызванной введением LPS, приводит к понижению температуры тела животного [12], а у здоровых животных, напротив, вызывает повышение температуры тела, которое подавляется предварительным введением индометацина (ингибитора синтеза простагландина E₂) [15, 28]. На основании этих данных мы можем предположить, что орексины могут принимать участие в механизмах регуляции нейроиммунных взаимодействий.

Известно, что при формировании реакции организма на различные стрессорные воздействия изменяется взаимодействие нервной и иммунной систем, развиваются дисфункции иммунной системы [1, 19, 23]. Иммунизационный стресс в сочетании с охлаждением, как было показано в ряде работ, оказывает иммуносупрессирующее действие [1, 19, 23]. Как при охлаждении, так и при ограничении подвижности молодых крыс показано увеличение количества с-Fos-позитивных орексинсодержащих клеток гипоталамуса на 15 и 24 % соответственно, а также усиление экспрессии м-РНК препроорексина в нейронах гипоталамуса [11, 20].

Применение данной стрессорной модели позволяет исследовать возможность участия орексинсодержащих нейронов в механизмах реализации взаимодействия нервной и иммунной систем. Цель данной работы – изучение эффектов действия комбинированного стресса (ограничение подвижности и охлаждение) на синтез и перераспределение орексина в нейронах гипоталамуса крысы. Для ответа на этот вопрос определяли уровни экспрессии гена препроорексина в гипоталамусе крыс при ограничении подвижности и охлаждении, а также изменения иммунореактивности орексинсодержащих нейронов гипоталамуса крыс при ограничении подвижности и охлаждении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опыте использованы 21 крыса-самец породы Wistar весом 200–250 г. Животных содержали в стан-

дартных условиях. Опыты начинали в 11 ч утра с целью нивелирования различий, связанных с суточными колебаниями содержания орексина в клетках гипоталамуса. Контрольной группе животных ограничивали подвижность в течение 1 ч. Экспериментальной группе также ограничивали подвижность в течение часа, но после первых 20 мин они подвергались охлаждению: – 20 °С в течение 20 мин. После охлаждения животные II группы находились в контейнерах, ограничивающих подвижность, оставшиеся 20 мин. Далее обе группы животных через 1 ч были наркотизированы фенобарбиталом (в/б 60 мкг/кг веса животного).

Измерение уровня экспрессии гена препроорексина в гипоталамусе крыс (метод PCR RT). Выделение пула РНК клеток гипоталамуса производилось с помощью набора «Aurum Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Pack» (Bio-Rad). Реакция синтеза к-ДНК, а также полимеразно-цепная реакция в реальном времени (RT-PCR) производилось с помощью набора «One Step SuperMix for RT PCR» (Bio-Rad). Протокол ПЦР в реальном времени был взят в статье [20]. Регистрация длины продукта была проведена методом электрофореза в агарозном геле.

Иммуногистохимическое выявление орексинсодержащих нейронов гипоталамуса крыс (авидин-биотиновый метод). Окрашивание орексинсодержащих нейронов на срезах мозга животных всех групп проводили одновременно. Время окраски было строго стандартизировано. Для статистического анализа учитывались срезы мозга с 28 по 32 уровень в соответствии с атласом мозга крыс Swanson L. W., так как в структурах на этих уровнях представлено максимальное количество орексинсодержащих нейронов. Детекцию орексинсодержащих нейронов гипоталамуса осуществляли авидин-биотиновым методом. Подробное описание методики приведено в статье [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С помощью RT PCR при изучении изменений экспрессии гена, кодирующего препроорексин, определена электрофорезом в агарозном геле длина продуктов RT-PCR, которая соответствовала заданной при подборе праймеров (рис. 1А). Кроме того, в каждой реакции длина продукта отслеживалась по кривым плавления продуктов RT-PCR (рис. 1Б). Выявлено увеличение уровня экспрессии м-РНК препроорексина у животных после ограничения подвижности в 5,5 раза по сравнению с уровнем ее экспрессии у интактных животных. При комбинированном воздействии наблюдалось нивелирование наблюдаемых изменений (рис. 2).

Как уже было отмечено, орексинсодержащие нейроны в основном расположены в ЛНА, DMH,

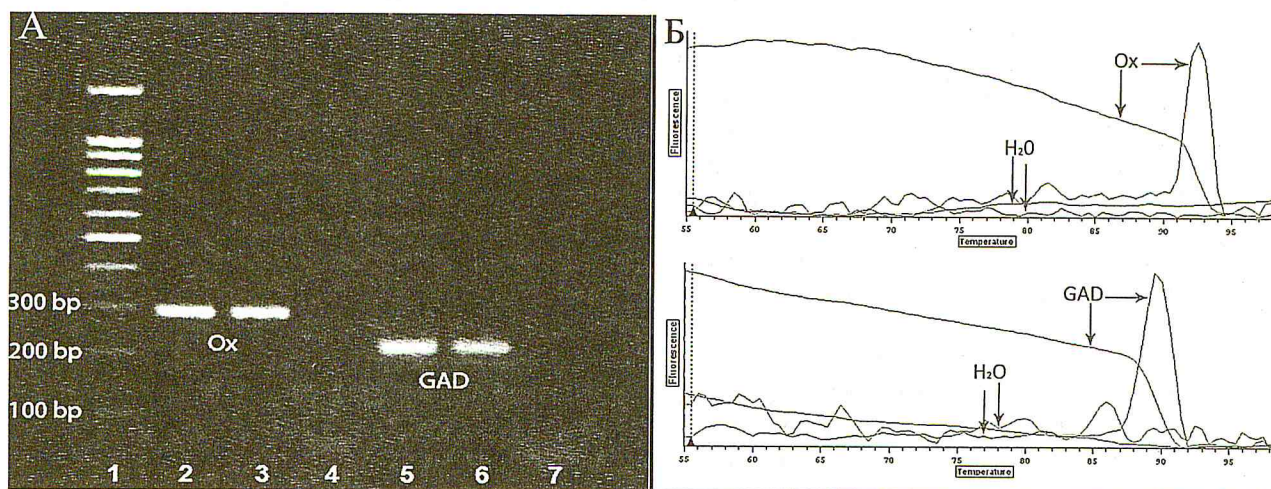


Рис. 1. А: Результаты электрофореза в агарозном геле: 1 – маркер молекулярного веса ДНК; 2, 3 – пробы, содержащие амплифицированную кДНК препроорексина; 4 – контрольная проба, содержащая праймеры к Ох и воду; 5, 6 – пробы, содержащие амплифицированную кДНК GAD; 7 – контрольная проба, содержащая праймеры к GAD и воду.
 Б: Кривые плавления продуктов RT-PCR: Ох – кривая плавления амплифицированной кДНК препроорексина; H₂O – кривая плавления контрольной пробы, содержащей праймеры к Ох и воду; GAD – кривая плавления амплифицированной кДНК GAD; H₂O – кривая плавления контрольной пробы, содержащей праймеры к GAD и воду

РН. Дифференцированное определение количества орексинпозитивных клеток в исследуемых структурах гипоталамуса позволило установить, что после ограничения подвижности животных иммунореактивность орексинсодержащих нейронов, локализованных в ЛНА на 28 уровне срезов мозга (рис. 3А), снизилась на 17% по сравнению с количеством орексинсодержащих нейронов у животных интактной группы. После применения комбинированного воздействия иммунореактивность орексинсодержащих нейронов, локализованных в области ЛНА на 28 уровне срезов мозга, повысилась на 29% по сравнению с иммунореактивностью у животных после

ограничения подвижности. В области DMH на 29 уровне срезов мозга после ограничения подвижности животных количество орексинпозитивных нейронов повысилось на 39% по сравнению с их количеством у животных интактной группы (рис. 3Б). В DMH на срезах 31 уровня количество орексинпозитивных нейронов повышается на 138% по сравнению с количеством орексинпозитивных нейронов у животных контрольной группы. После применения комбинированного воздействия степень иммунореактивности орексинсодержащих нейронов, локализованных в DMH на 28 уровне срезов мозга, увеличилась на 65% (рис. 3Б). Иммунореактивность орексинсодержащих нейронов, расположенных в РН на 31 уровне срезов мозга, после применения ограничения подвижности крыс повысилась на 76% по сравнению с иммунореактивностью орексинсодержащих нейронов животных интактной группы (рис. 3В).

После применения комбинированного стрессорного воздействия иммунореактивность орексинсодержащих нейронов крыс понижается в РН на 39% на 31 уровне срезов мозга (рис. 3В). Изменений иммунореактивности орексинсодержащих нейронов гипоталамуса крыс в структурах, расположенных на 29, 30 и 32 уровнях срезов мозга, после комбинированного воздействия не выявлено.

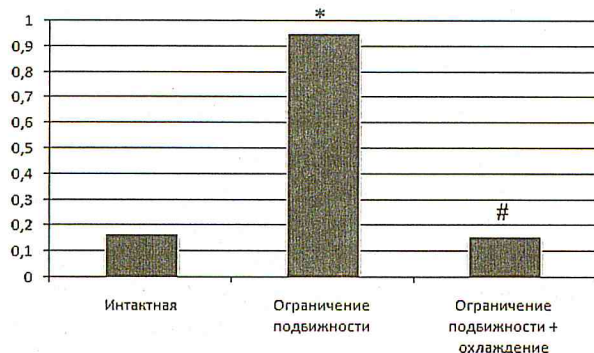


Рис. 2. Уровень экспрессии гена препроорексина в гипоталамусе крыс при различных стрессорных воздействиях.

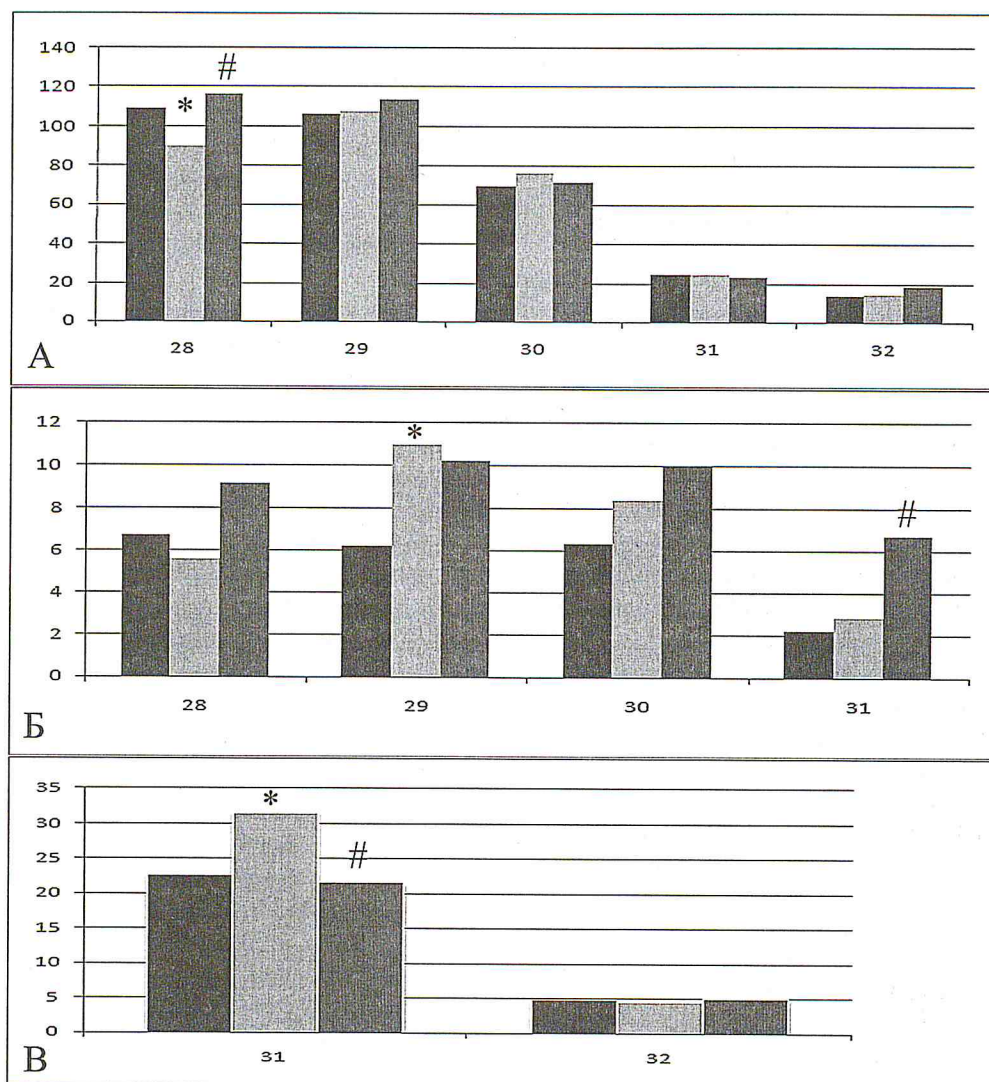
По оси ординат (Y) – уровень экспрессии гена препроорексина в гипоталамусе крыс; по оси абсцисс (X) – группы животных.

* $p < 0.05$ по сравнению с количеством орексинпозитивных клеток у животных интактной группы;

$p < 0.05$ по сравнению с количеством орексинпозитивных клеток у животных с ограничением подвижности

ОБСУЖДЕНИЕ

Сочетанное применение молекулярно-биологических и морфологических методов исследования позволило впервые установить изменение уровня баланса синтеза и потребления орексина в нейронах



Группы животных: ■ – интактная; ▨ – ограничение подвижности; ▩ – ограничение подвижности и охлаждение

Рис. 3. Количество орексинпозитивных нейронов в перифорникальной зоне гипоталамуса крыс после ограничения подвижности: А – латеральное гипоталамическое поле; Б – дорзомедиальное гипоталамическое ядро; В – заднее гипоталамическое поле.

По оси ординат (Y) – абсолютное количество орексинпозитивных нейронов на срезе; по оси абсцисс (X) – уровни срезов мозга крыс по атласу Swanson L.W.

* $p < 0.05$ по сравнению с количеством орексинпозитивных клеток у животных интактной группы; # $p < 0.05$ по сравнению с количеством орексинпозитивных клеток у животных с ограничением подвижности

гипоталамуса крыс при данных стрессорных воздействиях. Установлена избирательность реакции орексинсодержащих нейронов различных структур (LHA, PH, DMH) гипоталамуса крыс в ответ на иммуносупрессивное стрессорное воздействие. Полученные данные могут свидетельствовать о функциональной дискретности популяции орексинсодержащих нейронов, расположенных в перифорникальной области гипоталамуса, что согласуется с данными о различных уровнях их активации в ответ на разные виды стресса [7, 14, 16].

Показанное увеличение уровня синтеза и потребления орексина в разных структурах гипоталамуса позволяет заключить, что система орексинсодержа-

щих нейронов вовлекается в развитие комплекса реакций, протекающих в мозге в процессе формирования ответа на стрессорное воздействие, вызывающее иммуносупрессию. Это согласуется с новыми литературными данными об участии орексинсодержащих нейронов в механизмах реализации нейроиммунных взаимодействий. Интерпретация результатов проведенного исследования позволяет выявить изменения реакций в центральной нервной системе на фоне стресс-индуцированной дисфункции иммунной системы. Эти изменения важно учитывать при наличии инфекционного процесса в клинической практике у людей, перенесших сильный психоэмоциональный стресс.

Литература

1. Корнева Е. А., Шхинек Э. К. Гормоны и иммунная система. Л.: Наука, 1988. 251 с.
2. Bartlett J. A., Demetrikopoulos M. K., Schleifer S. J. Phagocytosis and Killing of *Staphylococcus aureus*: Effects of Stress and Depression in Children // *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. May 1997. Vol. 4. № 3. P. 362–366.
3. Becskei C., Hernadfalvy N., Arsenijevic D. et al. Inhibitory effects of LPS on hypothalamic nuclei involved in the control of food intake // Elsevier Ltd. 2007.
4. Coppinger T. R., Minton J. E., Reddy P. G. Repeated restraint and isolation stress in lambs increases pituitary-adrenal secretions and reduces cell-mediated immunity. Kansas State University, Manhattan, 66506-0201 // *J. Anim. Sci.* 1991. Vol. 69. P. 2808–2814.
5. Denes A., Boldogkoi Z., Uherezky G. et al. Central automatic control of the bone marrow: multisynaptic tract tracing by recombinant pseudorabies virus // *Neurosci.* 2005. Vol. 134. №3. P. 947–963.
6. Denes A., Boldogkoi Z., Uherezky G. et al. Characterization of the central nervous system innervations of the rat spleen using viral transneuronal tracing // *J. Comp. Neurol.* 2001. Vol. 439. P. 1–18.
7. Estabrooke I. V., McCarthy M. T., Ko E. et al. Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state // *J. Neurosci.* 2001. Vol. 21. P. 1656–1662.
8. Fleshner M., Nguyen T. K., Cotter C. S., Watkins L. R. Acute stressor exposure both suppresses acquired immunity and potentiates innate immunity // *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 2002. Vol. 282. P. R1680–R1686.
9. Friedman E. M., Lawrence D. A. Environmental Stress Mediates Changes in Neuroimmunological Interactions // *Toxicological sciences*. 2002. Vol. 67. P. 4–10.
10. Harbuz M. Neuroendocrine function and chronic inflammatory stress // *Exp. Physiol.* 2002. Vol. 87. № 5. P. 519–525.
11. Ida T., Nakahara K., Murakami T. et al. Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. Vol. 270. P. 318–323.
12. Jaszberenyi M., Bujdoso and Telegdy G. The role of neuropeptide Y in orexin-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activation // *J. Neuroendocrinol.* 2001. Vol. 13. P. 438–441.
13. Korneva E. A., Abdullaeva Z. A., Klimenko V. M., Nevidimov M. G. Immune response and changes in electrical activity of the brain // *Peripheral signaling of the brain: role in neural-immune interaction and learning and memory: Program and proceeding*. Irvine, USA. 1989. Vol. 6. P. 37.
14. Kurose T., Ueta Y., Yamamoto Y. et al. Effects of restricted feeding on the activity of hypothalamic orexin (OX)-A containing neurons and OX2 receptor mRNA level in the paraventricular nucleus of rats // *Regul. Pept.* 2002. Vol. 104. P. 145–151.
15. Monda M., Viggiano A., Mondola P., de Luca V. Inhibition of prostaglandin synthesis reduces hyperthermic reactions induced by hypocretin-1/orexin A // *Brain Res.* 2001. Vol. 909. P. 68–74.
16. Moriguchi T., Sakurai T., Nambu T. et al. Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia // *Neurosci Lett.* 1999. Vol. 264. P. 101–104.
17. Perekrest S. V., Abramova T. V., Novikova N. S. et al. Changes in immunoreactivity of orexin-A-positive neurons after an intravenous lipopolysaccharide injection // *Med. Sci. Monitoring*. 2008. Vol. 14. № 4.
18. Peyron C., Tighe D. K., van den Pol A. N. et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems // *J. Neurosci.* 1998. Vol. 18 (23). P. 9996–10015.
19. Rybakina E. G., Shanin S. N., Kozinets I. A. et al. Cellular mechanisms of cold stress-related immunosuppression and the action of interleukin 1 // *Int. J. Tiss. React.* 1997. XIX (3/4). P. 135–140.
20. Sakamoto F., Yamada S., and Ueta Y. Centrally administered orexin-A activates corticotrophin-releasing factor (CRF)-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats // *Regul. Pept.* 2004. P. 118.
21. Sakurai T., Amemiya A., Ishii M. et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior // *Cell.* 1998. Vol. 92. P. 573–585.
22. Shanin S. N. Natural killer cell cytotoxic activity and c-Fos protein synthesis in rat hypothalamic cells after painful electric stimulation of the hind limbs and EHF irradiation of the skin // *Med. Sci. Monit.* 2005. Vol. 11 (9). P. BR309–315.
23. Sheridan J., Feng N., Bonneau R. et al. // *J. Neuroimmunol.* 1991. Vol. 31. № 2. P. 245–255.
24. Swanson L. W. Organization of mammalian neuroendocrine systems // *Handbook of Physiology. The Nervous System. Intrinsic Regulatory Systems of the Brain*. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc. 1986. S. 1. Vol. IV. P. 17–363.
25. Tamura R., Kondoh T., Ono T., Nishijo H., Tori K. Effects of repeated cold stress on activity of hypothalamic neurons in rats during performance of operant licking task // *Am. Physiol. Society*. 2000.
26. Wenner M., Kawamura N., Ishikawa T. Reward linked to increased natural killer cell activity in rats // *Neuroimmunol. Modulation*. 2000. Vol. 7. P. 1–5.
27. Wrona D., Trojniar W. Chronic electrical stimulation of the lateral hypothalamus increases natural killer cell cytotoxicity in rats // *J. Neurosci.* 2000. Vol. 20 (17). P. 6578–6586.
28. Yang Y. L. and Lu K. T. Effects of orexin-A on rat thermoregulation: the roles of prostaglandin E2 // *Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society*. 2008.