

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *Fos* И НЕКОТОРЫХ СВЯЗАННЫХ С НИМ ГЕНОВ В ГИПОТАЛАМУСЕ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС НИСАГ (ISIAN) ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РЕСТРИКЦИОННОГО СТРЕССА

© 2024 г. Ю. В. Маковка^{a, b, *}, Л. А. Федосеева^a, Д. Ю. Ощепков^a,
А. Л. Маркель^{a, b}, О. Е. Редина^a

^a Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090
Россия

^b Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: makovkayv@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 02.06.2023 г.

После доработки 27.06.2023 г.

Принята к публикации 30.06.2023 г.

Стрессовые воздействия могут играть значимую роль в развитии артериальной гипертензии и многих других осложнений сердечно-сосудистых заболеваний. Изучению молекулярных механизмов, вовлеченных в ответ организма на стрессовые воздействия, уделяется значительное внимание, но в понимании деталей этих механизмов все еще остается много белых пятен. Крысы линии НИСАГ моделируют стресс-чувствительную форму артериальной гипертензии. Они характеризуются генетически обусловленной повышенной активностью гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной и симпато-адреномедуллярной систем, что предполагает функциональное состояние повышенной стресс-реактивности. Впервые в гипоталамусе взрослых самцов гипертензивных крыс НИСАГ исследована динамика экспрессии гена *Fos* и некоторых связанных с ним генов после однократного воздействия рестрикционного стресса разной продолжительности (30, 60 и 120 мин). Показана активация транскрипции гена *Fos* с пиком через 1 ч после начала такого воздействия. Динамика активации гена *Fos* совпадает с динамикой увеличения артериального давления. В процессе активации нейронов гипоталамуса изменяется уровень транскрипции и других генов, кодирующих транскрипционные факторы (*Jun*, *Nr4a3*, *Jdp2*, *Ppargc1a*), ассоциированные с развитием кардиоваскулярных заболеваний. Поскольку индукция *Fos* является маркером активации нейронов мозга, можно заключить, что повышенная стрессовая реактивность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной и симпатоадреналовой систем гипертензивных крыс НИСАГ при кратковременном рестрикционном стрессе сопровождается активацией нейронов гипоталамуса и повышением уровня артериального давления.

Ключевые слова: гены раннего ответа, гипоталамус, однократный рестрикционный стресс, крысы линии НИСАГ

DOI: 10.31857/S0026898424010079, **EDN:** OENGDY

ВВЕДЕНИЕ

Развитие гипертензивного статуса и его регуляция — это многокомпонентный процесс, на который влияют как генетические, так и средовые факторы. Крысы линии НИСАГ (ISIAN, inherited stress induced arterial hypertension) моделируют стресс-чувствительную форму артери-

альной гипертензии [1, 2]. Селекцию этих крыс проводили по признаку увеличения артериального давления (АД) при воздействии кратковременного рестрикционного стресса (ограничение подвижности в тесной проволоочной клетке в течение 30 мин), который можно рассматривать как психоэмоциональный стресс [3].

У крыс НИСАГ гипертензия развивается спонтанно к 2-месячному возрасту, что обеспечивается генетически детерминированной повышенной реактивностью нейроэндокринной гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной и симпато-адреномедуллярной систем [3]. У крыс НИСАГ в покое концентрации АКТГ

Сокращения. НИСАГ — линия крыс с наследуемой индуцированной стрессом артериальной гипертензией; WAG — линия крыс Wistar Albino Glaxo; АД — артериальное давление; ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени; АКТГ — адренкортикотропный гормон.

и кортикостерона в плазме крови не отличаются от значений у контрольных нормотензивных крыс, но в гипоталамусе увеличена концентрация норадреналина [4], а в надпочечниках повышена экспрессия гена тирозингидроксилазы, ключевого гена синтеза катехоламинов, и уровень адреналина [3], что предполагает снижение порога симпатической активации в ответ на стимуляцию. Сравнение транскриптомов ствола мозга, гипоталамуса, надпочечников и почек у гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных контрольных крыс WAG в возрасте 3 мес. выявило многочисленные дифференциально экспрессирующиеся гены, многие из которых, согласно их функциональной аннотации, ассоциированы с ответом на стресс [5–9]. Эти данные позволяют говорить о том, что крысы НИСАГ находятся в состоянии хронического функционального напряжения нейроэндокринной системы, участвующей в регуляции АД.

У крыс НИСАГ рестрикционный стресс приводит к статистически значимому увеличению концентрации кортикостерона уже через 15 мин от начала стресса, а через 30 мин концентрация кортикостерона в плазме крови крыс НИСАГ становится значимо выше, чем у крыс контрольной линии [3], что можно рассматривать как важное звено в формировании повышенной реактивности в ответ на стрессовую стимуляцию.

Ранее нами было показано, что воздействия рестрикционного стресса в течение 2.5 ч достаточно для того, чтобы у крыс НИСАГ достоверно изменился уровень транскрипции ряда ключевых генов, характеризующих активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [3], а также ряда генов почек, ассоциированных с регуляцией водно-солевого баланса и уровня АД [10–12].

Известно, что концентрация глюкокортикоидов в плазме крови может быть важным фактором, регулирующим стресс-индуцированную экспрессию генов раннего ответа (immediate-early genes, IEG) как в структурах мозга, так и в периферических органах/тканях [13, 14]. Неоднократно было показано, что в ответ на острые стрессовые воздействия, в том числе на рестрикционный стресс, происходит активация генов раннего ответа, многие из которых кодируют факторы транскрипции [15, 16]. Индукция генов раннего ответа приводит к активации нейронов [17] и изменению синаптической пластичности [18]. Однако при хроническом воздействии стресса гены раннего ответа не активируются [19, 20]. Учитывая, что крысы НИСАГ характеризуются генетически предтерминированным состоянием хронического физиологического стресса, встает вопрос о том,

происходит ли у них активация генов раннего ответа в условиях кратковременного рестрикционного стресса, использованного при проведении селекции крыс данной линии.

Наиболее известными маркерами нейрональной активации являются гены *Fos* и *Jun* (протоонкогены *Fos* и *Jun*, субъединицы транскрипционного фактора AP-1 – activator protein 1). Активация *Fos* в гипоталамусе наблюдается при различных физических и психологических стрессовых воздействиях, при этом кинетика ответа *Fos* на разные раздражители может различаться [16]. Белок *Fos* вместе с членами семейства белков *Jun* образует функционально активный гетеродимерный фактор транскрипции, называемый AP-1 [21]. Репрессором AP-1 является белок, кодируемый геном *Jdp2* (*Jun dimerization protein 2*). Этот белок способен подавлять трансактивацию, осуществляемую белками семейства *Jun* [22, 23]. Активность AP-1 может модулироваться транскрипционным фактором NOR-1 (*Neuron-derived orphan receptor-1*), кодируемым геном раннего ответа *Nr4a3*, экспрессия которого индуцируется многочисленными стрессовыми факторами [24]. Предполагается, что важным партнером AP-1 в регуляции ответа на стрессовые воздействия может быть PGC-1alpha (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*), способный коактивировать огромное число различных транскрипционных факторов [25]. PGC-1alpha, кодируемый геном *Ppargc1a*, считается главным регулятором биогенеза митохондрий и клеточного стресса [26]. Экспрессия генов, зависящая от PGC-1alpha, также контролируется многими другими факторами, включая эстроген-связывающий рецептор альфа (*ERRalpha*) [25, 27].

Участие генов раннего ответа в реакции крыс НИСАГ на стресс не изучалось. Поскольку нейроны гипоталамуса играют ключевую роль в запуске нейроэндокринных и вегетативных адаптивных реакций на различные воздействия [28], в данной работе оценены возможные изменения в уровне транскрипции гена *Fos*, а также нескольких упомянутых выше, связанных с ним ключевых генов раннего ответа, кодирующих факторы транскрипции, в гипоталамусе крыс НИСАГ в условиях кратковременного рестрикционного стресса разной продолжительности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. Работа выполнена на самцах крыс гипертензивной линии НИСАГ/*Icgn* (крысы с Наследуемой Индуцируемой Стрессом Артериальной Гипертонией; *ISIAN/Icgn* – *Inherited Stress Induced Arterial Hypertension*) в возрасте 3 мес. Крыс содержали в стандартных условиях

конвенционального вивария Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН. Воду и сбалансированный корм крысы получали без ограничения. Крыс содержали в стандартных пластиковых клетках при режиме день/ночь — 12/12.

Воздействие рестрикционного стресса разной продолжительности на уровень транскрипции генов раннего ответа изучали на четырех группах самцов: 1) контрольная группа (без стресса); 2) стресс в течение 30 мин; 3) стресс в течение 1 ч; и 4) стресс в течение 2 ч. В каждой группе было по 7–8 крыс. В связи с тем, что активация молекулярных механизмов в ответ на стрессовые воздействия зависит от времени суток [14], все экспериментальные процедуры проводили в одно и то же время (в 2 ч дня по местному времени).

Базальный уровень АД в этом эксперименте не измеряли, чтобы избежать стресса, связанного с процедурой измерения. Измерение АД при стрессе проводили на ненаркотизированных крысах после помещения их на 30 мин, 1 либо 2 ч в тесную проволочную клетку-цилиндр (рестрикционный стресс). АД измеряли непрямым методом на хвосте (tail-cuff method), как описано в [3]. Для измерения АД за 30 мин до окончания стресса клетку с крысой помещали на теплую (37°C) платформу. Сразу после завершения стресса и измерения АД крыс быстро декапитировали и выделяли гипоталамус. Собранные образцы немедленно гомогенизировали в пробирках (1.5 мл) с использованием 700 мкл реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия) и 500 мкл Lysing matrix D (Cat#6540434 “MP Biomedicals”, США) в течение 20 с при 18 000 об./мин в гомогенизаторе Super FastPrep-2 (“MP Biomedicals”).

Все процедуры проводили в соответствии с Международными правилами проведения работ с использованием животных. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия), протокол № 115 от 20 декабря 2021 года.

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Суммарную РНК из гипоталамуса выделяли с использованием набора ExtractRNA (“Евроген”). Остаточную ДНК удаляли с помощью RQ1 RNase-Free DNase (“Promega”, США) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию выделенной РНК определяли на спектрофотометре Nanodrop 2000C (“Thermo Scientific”, США). Обратную транскрипцию проводили в растворе объемом 50 мкл, содержащем 2 мкг РНК, 0.25 нмоль праймеров (N9 — случайные нонануклеотидные праймеры, “Биосан”, Россия), 36 мкл буфера для обратной транскрипции, 0.4 mM dNTP (“Вектор-Бест”, Россия) и 100 ед.

акт. обратной транскриптазы MoMLV (“Биолаб-микс”, Россия). кДНК синтезировали в течение 1 ч при 37°C, затем 30 мин при 42°C и 10 мин при 50°C. Фермент инактивировали прогреванием смеси в течение 5 мин при 75°C. Из всех образцов отбирали по 5 мкл кДНК и смешивали. Этот усредненный раствор кДНК использовали в ПЦР-РВ в качестве “стандарта” для построения калибровочных кривых.

ПЦР-РВ проводили на приборе LightCycler 96 (“Roche Molecular Systems”, США). Реакционная смесь объемом 20 мкл включала 8 мкл 2.5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I (“Syntol”, Россия), кДНК и праймеры (по 0.15 мкМ каждого). Олигонуклеотидные праймеры подбирали с помощью программы PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Гены и последовательности праймеров, использованных в работе, перечислены в табл. 1. В качестве генов сравнения использовали *Nono* (non-POU domain containing, octamer-binding), *Ppia* (peptidylprolyl isomerase A) и *Hprt1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1). Анализ содержания мРНК этих генов сравнения в гипоталамусе крыс НИСАГ не выявил статистически значимых изменений при воздействии рестрикционного стресса разной продолжительности (рис. 1).

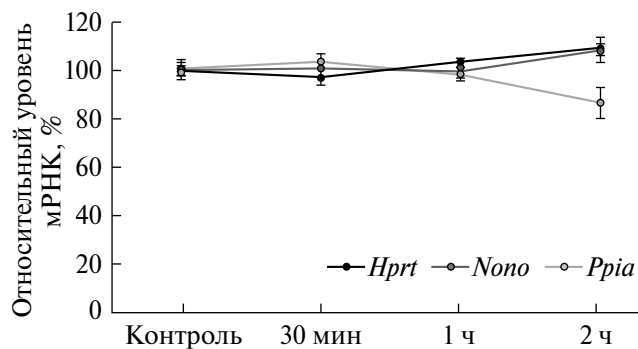


Рис. 1. Динамика изменений содержания мРНК генов сравнения в гипоталамусе крыс НИСАГ при воздействии рестрикционного стресса разной продолжительности.

Использовали следующие условия ПЦР: начальная денатурация (5 мин, 95°C), 40 циклов амплификации (денатурация — 15 с, 95°C; отжиг — 20 с; элонгация — 20 с, 72°C; регистрация флуоресценции продукта — 10 с; температуры отжига и регистрации флуоресценции приведены в табл. 1). Специфичность продукта оценивали с помощью анализа кривой плавления.

Относительное содержание кДНК в экспериментальных образцах определяли методом стандартных кривых [29]. В качестве коэффи-

циента нормирования использовали среднее геометрическое значение данных по амплификации трех генов сравнения. Нормированный уровень мРНК в группе контрольных крыс принимали за 100%.

Статистический анализ. Результаты измерения АД анализировали с помощью *t*-теста Стьюдента. Стресс-индуцированные изменения количества мРНК оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA, Post-hoc, LSD test) с использованием пакета компьютерных программ Statistica 12.0 (“StatSoft”, США). Данные представлены в виде средних арифметических значений и ошибки среднего ($M \pm SEM$). Корреляционный анализ проводили с помощью критерия Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уровень АД у крыс НИСАГ повышается в условиях рестрикционного стресса (рис. 2), достигая максимальных значений через 1 ч от начала стрессового воздействия и оставаясь на стабильно высоком уровне в течение второго часа.

Согласно данным, представленным во введении, для анализа были выбраны гены раннего ответа *Fos*, *Jun* и несколько связанных с ними генов, кодирующих транскрипционные факторы. Сравнение уровня транскрипции генов методом ПЦР-РВ показало, что воздействие рестрикционного стресса приводит к изменению уровня транскрипции почти всех взятых в анализ генов в гипоталамусе крыс НИСАГ (рис. 3). Однако максимальные изменения в уровне транскрипции разных генов наблюдаются при разной продолжительности стресса.

Наиболее значительными были изменения в количестве мРНК гена *Fos*, уровень транскрипции которого повысился более чем в 2 раза. Максимальная активация транскрипции гена *Fos* наблюдается через 1 ч после начала стресса. В течение следующего часа воздействия активация гена *Fos* оставалась достоверно более высокой, чем у контрольных животных (рис. 3а).

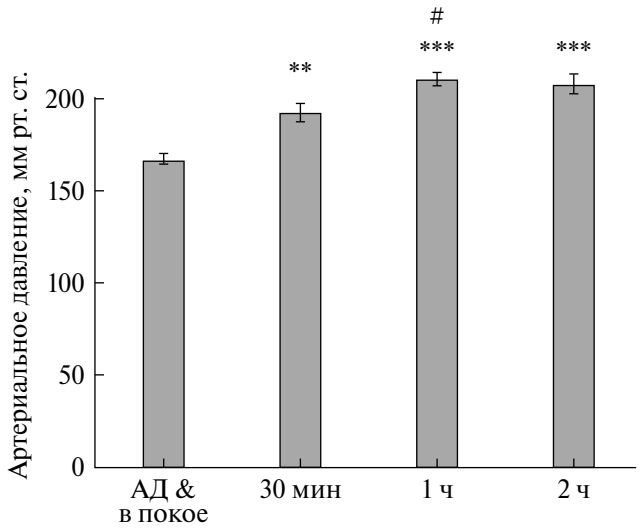


Рис. 2. Влияние рестрикционного стресса разной продолжительности на уровень артериального давления (АД) у самцов гипертензивных крыс НИСАГ. ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 по сравнению с базальным уровнем АД; #*p* < 0.05 по сравнению с уровнем АД в группе крыс после 30 мин рестрикционного стресса (тест Стьюдента); & среднепопуляционный уровень базального АД (по данным [3]).

Таблица 1. Праймеры, использованные для ПЦР с детекцией в режиме реального времени

Символ гена	Праймеры, 5'--->3'		Длина ПЦР-фрагмента, п.н.	Температура отжига, °C	Температура регистрции флуоресценции продукта, °C
	прямой	обратный			
<i>Ppia</i>	GTGTTCTTCGACATCACGGCT	CTGTCTTTGGAACCTTTGTCTGCA	82	60	83
<i>Hprt1</i>	CATTGTGGCCCTCTGTGTG	AACTTTTATGTCCCCCGTTGA	166	61	81
<i>Nono</i>	GCTAACACATTTCTCTCG	CTCATACTCAAAGGACCCA	157	61	81
<i>Jun</i>	CGCACGCTCCTAAACAACT	TGAGGGCATCGTCGTAGAAG	176	64	84
<i>Fos</i>	CTCCTGAAGAGGAAGAGAAACG	TTCAAGTTGATCTGTCTCCGCT	122	58	82
<i>Jdp2</i>	AGGAGCTGAAATACGCTGAC	TCTTCTTCCTCATCTAGCTCAC	121	60	84
<i>Esrra</i>	TGCTCAGCTCTCTACCCAAA	CGCTTGGTGATCTCACACTC	169	63	86
<i>Nr4a3</i>	CGGTGCAGAAAAACGCAAAAT	ATCTGTACGCACAACCTTCCTT	140	62	82
<i>Ppargc1a</i>	AATCAGACCTGACACAACGC	TGAAACCATAGCTGTCTCCATC	110	58	81

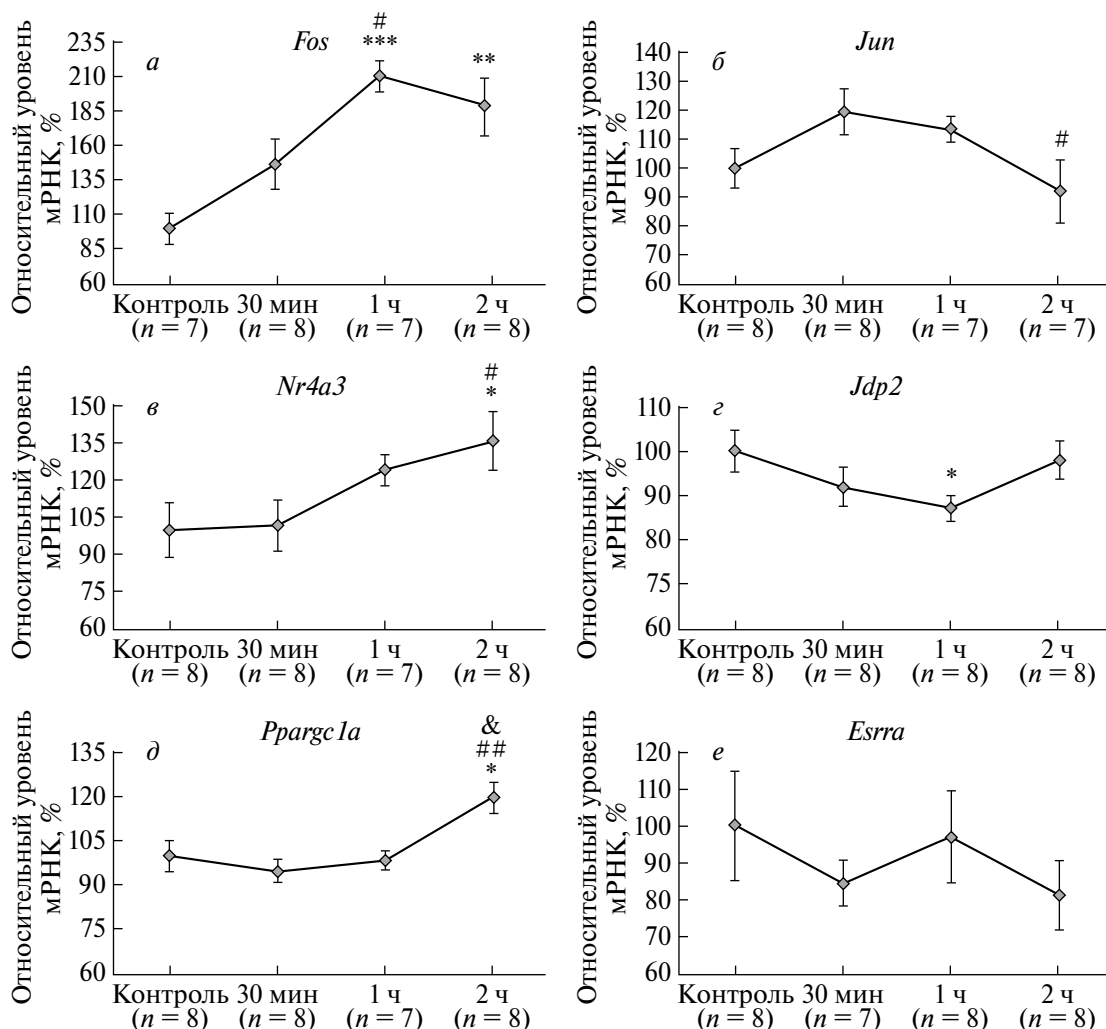


Рис. 3. Динамика стресс-индуцированных изменений содержания мРНК генов раннего ответа в гипоталамусе крыс НИСАГ при воздействии рестрикционного стресса разной продолжительности: *Fos* (а), *Jun* (б), *Nr4a3* (в), *Jdp2* (г), *Ppargc1a* (д), *Esrra* (е). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ и *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем, # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ по сравнению с группой 30-минутного стресса; & $p < 0.05$ по сравнению с 1-часовым стрессом (Post-hoc, LSD test).

Экспрессия мРНК гена, кодирующего транскрипционный фактор *Jun*, после воздействия стресса не отличалась достоверно от значений в контроле ни в одной временной точке эксперимента. Максимальное повышение экспрессии гена *Jun* наблюдалось через 30 мин воздействия стресса, а через 2 ч от начала стресса уровень его транскрипции статистически значимо снижался, но при этом не отличался от контрольного уровня (рис. 3б). С использованием корреляционного анализа выявлена достоверная отрицательная корреляция между экспрессией генов *Jun* и *Jdp2* ($r = -0.54$; $p = 0.002$), что подтверждает их функциональную связь. Снижение уровня мРНК гена *Jdp2* отмечено после 1 ч рестрикции, после чего уровень его транскрипции начал восстанавливаться (рис. 3г).

Анализ уровня мРНК гена *Nr4a3* показал, что его транскрипция начинает активироваться через 1 ч и продолжает возрастать в течение следующего часа, достигая достоверных отличий от значений в контрольной группе животных, а также от животных, подвергавшихся стрессу в течение 30 мин (рис. 3в).

Анализ количества мРНК гена *Ppargc1a* в гипоталамусе четырех групп животных показал, что экспрессия этого гена значимо повышается по сравнению с уровнем в контрольной группе через 2 ч после начала рестрикционного стресса (рис. 3д).

Не выявлено существенного влияния стресса на уровень транскрипции гена *Esrra* в гипоталамусе гипертензивных крыс НИСАГ (рис. 3е).

Полученные результаты выявляют картину каскадной активации генов. Наиболее быстро активируются гены раннего ответа *Fos* и *Jun*. Учитывая значительную (более чем в 2 раза) активацию транскрипции *Fos*, можно предположить, что рестрикционный стресс в течение 1 ч может приводить к активации нейронов гипоталамуса. Поскольку динамика активации транскрипции гена *Fos* совпадает с динамикой повышения АД, можно выдвинуть предположение о существовании функциональных связей между этими процессами. Отрицательная корреляция между экспрессией генов *Jun* и *Idp2* подтверждает их ожидаемую функциональную взаимосвязь и свидетельствует о значительной активации транскрипционного комплекса AP-1. Более поздняя активация генов *Nr4a3* и *Ppargc1a* хорошо согласуется с концепцией их каскадной активации, на которую, предположительно, могут влиять и другие гены раннего ответа, не проанализированные в данном исследовании. Возможно, ограничение эксперимента 2-часовым периодом стрессового воздействия не позволило выявить изменений в уровне транскрипции гена *Esrra*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании проведен анализ уровня транскрипции нескольких генов раннего ответа в гипоталамусе крыс гипертензивной линии НИСАГ, подвергнутых воздействию однократного краткосрочного рестрикционного стресса разной продолжительности (30 мин, 1 и 2 ч).

Проведенный ранее сравнительный анализ транскрипции генов в гипоталамусе крыс НИСАГ, моделирующих стресс-чувствительную форму артериальной гипертензии, и нормотензивных контрольных крыс WAG показал, что многие гены, имеющие межлинейные различия в уровне транскрипции, ассоциированы с ответом на стресс [5]. Соответственно, патофизиологическое состояние крыс НИСАГ можно рассматривать как состояние, характеризующееся хроническим напряжением ряда физиологических систем. Эти функциональные особенности обусловлены специфичностью гипертензивного генотипа крыс НИСАГ, который закрепился в результате селекции на резкое повышение уровня АД в условиях кратковременного (30 мин) рестрикционного стресса [1, 2]. Повышенный базальный уровень норадреналина в гипоталамусе [4] и адреналина в надпочечниках крыс НИСАГ [3] объясняет их повышенную стресс-реактивность и позволяет предположить, что состояние физиологического стресса гипертензивных крыс НИСАГ может быть ассоции-

ровано с хронической активацией симпатической нервной системы.

В ряде исследований, направленных на изучение активации генов раннего ответа, показано, что хронический (повторяющийся) рестрикционный стресс не вызывает активацию гена *Fos* в гипоталамусе крыс-самцов разных нормотензивных линий — Wistar [19] и Sprague-Dawley [20]. Согласно полученным нами результатам, состояние генетически обусловленного функционального стресса крыс НИСАГ не препятствует увеличению транскрипции гена *Fos* в гипоталамусе, а также ряда других ключевых генов раннего ответа при кратковременном однократном воздействии рестрикционного стресса. Активация экспрессии *Fos* считается признанным маркером активации нейронов [16]. Соответственно, можно предполагать, что кратковременный рестрикционный стресс приводит к активации нейронов гипоталамуса у гипертензивных крыс НИСАГ.

Пик транскрипционной активности гена *Fos* в гипоталамусе крыс НИСАГ наблюдается через 1 ч от начала стрессового воздействия и остается высоким по крайней мере в течение следующего часа (рис. 3а). Несколько отличающиеся результаты получены при изучении динамики активации гена *Fos* у других линий крыс.

У нормотензивных крыс Sprague-Dawley пик активации гена *Fos* в паравентрикулярном ядре гипоталамуса наблюдался через 15 мин после начала рестрикционного стресса, а через 1 ч он восстанавливался до контрольного уровня [20]. Несколько иные результаты получены при изучении активации гена *Fos* в гипоталамусе гипертензивных крыс под действием кратковременного рестрикционного стресса. Пик кратковременного увеличения транскрипции гена *Fos* в гипоталамусе самцов крыс с пограничной гипертензией (F1-гибриды SHR×WKY) наблюдался через 30 мин иммобилизационного стресса и возвращался к контрольному уровню только через 3 ч [15]. В паравентрикулярном ядре гипоталамуса самцов гипертензивных крыс SHRSP пик активности гена *Fos* выявлен через 30 мин после начала рестрикционного стресса [30]. При взрослении и усугублении патофизиологического состояния у гипертензивных крыс SHRSP, подвергнутых воздействию кратковременного (30 мин) стресса, наблюдается более сильная активация гена *Fos*, чем у нормотензивных контрольных животных [31]. Можно предположить, что динамика активации гена *Fos* может зависеть от патофизиологического состояния крыс, связанного с особенностями проявлений гипертензивного статуса. Изучение центральных механизмов активации нейронов при развитии соль-чувствительной гипертензии показало, что

активация центральной нервной системы крыс может зависеть от их генотипа [32]. Кинетика ответа *Fos* на острые стрессовые воздействия может быть как сходной, так и различаться при разных типах стресса [16, 33], а также в разных структурах мозга [20, 34, 35].

Fos является субъединицей транскрипционного комплекса AP-1, который непосредственно участвует в регуляции “поздних” генов, имеющих сайт связывания с AP-1 и контролирующих разнообразные функции клеток. AP-1 имеет большое значение для поддержания гомеостаза и регуляции стрессовых реакций посредством взаимодействия с сигнальными путями, регулируемые глюкокортикоидами [36]. Глюкокортикоиды могут влиять не только на активацию AP-1, они могут также контролировать активацию изученного нами гена *Nr4a3*. Недавно было показано, что гены *Fos* и *Nr4a3* относятся к генам, уровень транскрипции которых наиболее сильно изменяется (увеличивается) в паравентрикулярном ядре гипоталамуса через 1 ч после введения кортикостерона самцам крыс Wistar [37]. Поскольку рестрикционный стресс, использованный в нашем исследовании, значительно увеличивает концентрацию кортикостерона в плазме крови крыс НИСАГ [3], можно предположить участие этого механизма в активации транскрипции генов *Fos* и *Nr4a3* в гипоталамусе этих крыс.

Показано, что повышение транскрипции гена *Fos* в ряде структур мозга может происходить и при активации симпатической нервной системы [38]. Известно, что различные виды стресса активируют норадренергические нейроны, и синтезированный норадреналин через восходящие (афферентные) пути поступает в различные области мозга, включая ядра гипоталамуса [38]. В паравентрикулярном ядре гипоталамуса норадреналин может вызывать увеличение возбуждающих постсинаптических потенциалов. Показано, что этот процесс опосредован активацией $\alpha 1$ -адренорецепторов [39, 40].

Связь активации генов раннего ответа с симпатической (адренергической) стимуляцией экспериментально подтверждена с использованием в качестве модели фибробластов rat-1, стабильно экспрессирующих $\alpha 1a$ -адренергический рецептор. Анализ адренергического стресса разной продолжительности, вызванного в фибробластах rat-1 добавлением фенилэфрина, выявил активацию многих генов раннего ответа, при этом особое внимание уделено кинетике экспрессии генов *Fos* и *Nr4a3*, которые относятся к пулу наиболее сильно активированных генов [41]. Пик транскрипции *Fos* наблюдали через 60 мин после стимуляции, а пик транскрипци-

онной активности *Nr4a3* — через 2 ч от начала стимуляции [41]. Видно, что кинетика транскрипции *Fos* и *Nr4a3* в гипоталамусе крыс НИСАГ очень похожа на динамику активации *Fos* и *Nr4a3* при адренергическом стрессе, описанную на модели фибробластов rat-1. В связи с этим можно предполагать, что активация генов *Fos* и *Nr4a3* в гипоталамусе крыс НИСАГ, вызванная кратковременным рестрикционным стрессом, может быть ассоциирована с симпатической активацией.

Мы наблюдали одинаковую динамику активации гена *Fos* в гипоталамусе крыс НИСАГ и увеличения АД при воздействии рестрикционного стресса разной продолжительности, что указывает на существование функциональной связи между этими процессами. Аналогичные результаты получены ранее при изучении экспрессии *Fos* у крыс гипертензивной линии Lewis, у которых повышение АД сопровождалось увеличением *Fos*-подобной иммунореактивности в различных областях мозга, включая гипоталамус [42].

Комплекс AP-1 считается партнером PGC-1 α в регуляции гипоксии, как показано на примере сложной транскрипционной сети пластичности мышечных клеток [25]. Как гипоксия [43], так и рестрикционный стресс [44, 45] вызывают состояние повышенного окислительного стресса в клетках. Активация *Fos* и последующая активация *Pprgc1a* при воздействии кратковременного рестрикционного стресса в нашем эксперименте указывает на возможность функциональной связи между AP-1 и PGC-1 α в гипоталамусе крыс НИСАГ. Повышение экспрессии PGC-1 α связано со снижением окислительного стресса и повреждения митохондрий [46] и считается механизмом защиты нейронов от вызванных стрессом повреждений [47], в частности, способствует снижению воспалительных процессов и апоптоза в гипоталамусе [48]. PGC-1 α необходим для экспрессии генов, вовлеченных в процесс синхронного высвобождения нейротрансмиттеров [49], целостности аксонов в головном мозге [50], регуляции окислительно-метаболизма [51] и гипертензии [52].

Ранее было показано, что PGC-1 α -зависимая экспрессия генов может зависеть от эстрогенсвязывающего рецептора альфа (ERR α) [27]. Однако в нашем исследовании не выявлено значимых изменений в уровне транскрипции гена *Esrra*. Это может быть связано с тем, что активация гена *Pprgc1a* в гипоталамусе крыс НИСАГ наблюдается только через 2 ч после начала стресса. Возможно, для активации гена *Esrra* требуется более продолжительное время.

Соответственно, обнаруженные нами изменения уровня транскрипции группы генов раннего ответа подтверждают, что, несмотря на признаки функционального хронического стресса, острый кратковременный рестрикционный стресс вызывает увеличение транскрипции гена *Fos*, указывая, возможно, на активацию нейронов гипоталамуса крыс НИСАГ. Этот процесс происходит при участии комплекса AP-1 и PGC-1 α , что свидетельствует об активации транскрипции с участием РНК-полимеразы II. Предполагается вовлеченность в эти процессы как глюкокортикоидной, так и адренергической стимуляции. Полученные результаты характеризуют крыс НИСАГ как модель, подходящую для изучения центральных механизмов активации нейронов при воздействии кратковременного рестрикционного (эмоционального) стресса. Выявление ключевых звеньев, ассоциированных с резким повышением уровня АД при воздействии рестрикционного стресса, будет способствовать определению потенциальных мишеней для коррекции и стабилизации уровня АД при стресс-чувствительной форме гипертонии у человека.

Авторы выражают благодарность конвенциональному виварию Центра генетических ресурсов лабораторных животных (ФИЦ ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия) за разведение, регулярный уход и содержание экспериментальных крыс в рамках проекта Правительства России FWNR-2022-0008, а также Объединенному центру исследований генома ИЦиГ (бюджетный проект ИЦиГ № FWNR-2022-0017) за возможность использования приборов для определения качества и количества нуклеиновых кислот.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 22-14-00082).

Все процедуры проводили в соответствии с Международными правилами проведения работ с использованием животных. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия), протокол № 115 от 20 декабря 2021 года.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Markel A.L. (1992) Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *Genetic Hypertension*. **218**, 405–407.
2. Markel A.L., Maslova L.N., Shishkina G.T., Bulygina V.V., Machanova N.A., Jacobson G.S. (1999) Developmental influences on blood pressure regulation in ISIAH rats. *Dev. Hypertensive Phenotype: Basic and Clin. Studies*. **19**, 493–526.
3. Markel A.L., Redina O.E., Gilinsky M.A., Dymshits G.M., Kalashnikova E.V., Khvorostova Y.V., Fedoseeva L.A., Jacobson G.S. (2007) Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension. *J. Endocrinol.* **195**, 439–450.
4. Redina O.E., Smolenskaya S.E., Polityko Y.K., Ershov N.I., Gilinsky M.A., Markel A.L. (2021). Hypothalamic norepinephrine concentration and heart mass in hypertensive ISIAH rats are associated with a genetic locus on chromosome 18. *J. Pers. Med.* **11**(2), 67.
5. Klimov L.O., Ershov N.I., Efimov V.M., Markel A.L., Redina O.E. (2016) Genome-wide transcriptome analysis of hypothalamus in rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *BMC Genet.* **17**(Suppl 1), 13.
6. Fedoseeva L.A., Klimov L.O., Ershov N.I., Alexandrovich Y.V., Efimov V.M., Markel A.L., Redina O.E. (2016) Molecular determinants of the adrenal gland functioning related to stress-sensitive hypertension in ISIAH rats. *BMC Genomics*. **17**(Suppl 14), 989.
7. Fedoseeva L.A., Ryazanova M.A., Ershov N.I., Markel A.L., Redina O.E. (2016) Comparative transcriptional profiling of renal cortex in rats with inherited stress-induced arterial hypertension and normotensive Wistar Albino Glaxo rats. *BMC Genet.* **17**(Suppl 1), 12.
8. Ryazanova M.A., Fedoseeva L.A., Ershov N.I., Efimov V.M., Markel A.L., Redina O.E. (2016) The gene-expression profile of renal medulla in ISIAH rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *BMC Genet.* **17**(Suppl 3), 151.
9. Fedoseeva L.A., Klimov L.O., Ershov N.I., Efimov V.M., Markel A.L., Orlov Y.L., Redina O.E. (2019) The differences in brain stem transcriptional profiling in hypertensive ISIAH and normotensive WAG rats. *BMC Genomics*. **20**, 297.
10. Пыльник Т.О., Плетнева Л.С., Редина О.Е., Смоленская С.Э., Маркель А.Л., Иванова Л.Н. (2011) Влияние эмоционального стресса на экспрессию мРНК гена α -ENaC в почке гипертензивных крыс линии НИСАГ. *Докл. Акад. Наук*. **439**(4), 563–565.
11. Абрамова Т.О., Редина О.Е., Смоленская Ю.П., Маркель А. (2013) Усиленная экспрессия гена *EPHX2* в почках гипертензивных крыс НИСАГ. *Молекуляр. биология*. **47**(6), 942–948.
12. Абрамова Т.О., Смоленская С.Э., Антонов Е.В., Редина О.Е., Маркель А.Л. (2016) Экспрессия генов катехол-*о*-метилтрансферазы (COMT), минералокортикоидного рецептора (MLR) и эпителиального натриевого канала (ENaC) в почках гипертензивных крыс линии НИСАГ (ISIAH) в покое и при ответе на стресс. *Генетика*. **52**(2), 180–187.
13. Senba E., Ueyama T. (1997) Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci. Res.* **29**, 183–207.

14. Girotti M., Weinberg M.S., Spencer R.L. (2007) Differential responses of hypothalamus-pituitary-adrenal axis immediate early genes to corticosterone and circadian drive. *Endocrinology*. **148**, 2542–2552.
15. Mansi J.A., Rivest S., Drolet G. (1998) Effect of immobilization stress on transcriptional activity of inducible immediate-early genes, corticotropin-releasing factor, its type 1 receptor, and enkephalin in the hypothalamus of borderline hypertensive rats. *J. Neurochem.* **70**, 1556–1566.
16. Kovacs K.J. (2008) Measurement of immediate-early gene activation – *c-fos* and beyond. *J. Neuroendocrinol.* **20**, 665–672.
17. Guez-Barber D., Fanous S., Golden S.A., Schrama R., Koya E., Stern A.L., Bossert J.M., Harvey B.K., Picciotto M.R., Hope B.T. (2011) FACS identifies unique cocaine-induced gene regulation in selectively activated adult striatal neurons. *J. Neurosci.* **31**, 4251–4259.
18. Okuno H. (2011) Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neurosci. Res.* **69**, 175–186.
19. Melia K.R., Ryabinin A.E., Schroeder R., Bloom F.E., Wilson M.C. (1994) Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. *J. Neurosci.* **14**, 5929–5938.
20. Girotti M., Pace T.W., Gaylord R.I., Rubin B.A., Herman J.P., Spencer R.L. (2006) Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced *c-fos* expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience*. **138**, 1067–1081.
21. Foletta V.C., Segal D.H., Cohen D.R. (1998) Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 139–152.
22. Aronheim A., Zandi E., Hennemann H., Elledge S.J., Karin M. (1997) Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3094–3102.
23. Katz S., Heinrich R., Aronheim A. (2001) The AP-1 repressor, JDP2, is a bona fide substrate for the c-Jun N-terminal kinase. *FEBS Lett.* **506**, 196–200.
24. Odagiu L., Boulet S., Maurice De Sousa D., Daudelin J.F., Nicolas S., Labrecque N. (2020) Early programming of CD8(+) T cell response by the orphan nuclear receptor NR4A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117**, 24392–24402.
25. Baresic M., Salatino S., Kupr B., van Nimwegen E., Handschin C. (2014) Transcriptional network analysis in muscle reveals AP-1 as a partner of PGC-1 α in the regulation of the hypoxic gene program. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 2996–3012.
26. Wenz T. (2013) Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1 α under cellular stress. *Mitochondrion*. **13**, 134–142.
27. McMeekin L.J., Joyce K.L., Jenkins L.M., Bohannon B.M., Patel K.D., Bohannon A.S., Patel A., Fox S.N., Simmons M.S., Day J.J., Kralli A., Crossman D.K., Cowell R.M. (2021) Estrogen-related receptor alpha (ERR α) is required for PGC-1 α -dependent gene expression in the mouse brain. *Neuroscience*. **479**, 70–90.
28. Hausl A.S., Brix L.M., Hartmann J., Pohlmann M.L., Lopez J.P., Menegaz D., Brivio E., Engelhardt C., Roeh S., Bajaj T., Rudolph L., Stoffel R., Hafner K., Goss H.M., Reul J., Deussing J.M., Eder M., Ressler K.J., Gassen N.C., Chen A., Schmidt M.V. (2021) The co-chaperone Fkbp5 shapes the acute stress response in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male mice. *Mol. Psychiatry*. **26**, 3060–3076.
29. Ginzinger D.G. (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* **30**, 503–512.
30. Imaki T., Shibasaki T., Chikada N., Harada S., Naruse M., Demura H. (1996) Different expression of immediate-early genes in the rat paraventricular nucleus induced by stress: relation to corticotropin-releasing factor gene transcription. *Endocr. J.* **43**, 629–638.
31. Imaki T., Naruse M., Harada S., Chikada N., Nakajima K., Yoshimoto T., Demura H. (1998) Stress-induced changes of gene expression in the paraventricular nucleus are enhanced in spontaneously hypertensive rats. *J. Neuroendocrinol.* **10**, 635–643.
32. Budzikowski A.S., Vahid-Ansari F., Leenen F.H. (1998) Chronic activation of brain areas by high-sodium diet in Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Physiol.* **274**, H2046–2052.
33. Rivest S., Laflamme N. (1995) Neuronal activity and neuropeptide gene transcription in the brains of immune-challenged rats. *J. Neuroendocrinol.* **7**, 501–525.
34. Cullinan W.E., Herman J.P., Battaglia D.F., Akil H., Watson S.J. (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*. **64**, 477–505.
35. Crane J.W., French K.R., Buller K.M. (2005) Patterns of neuronal activation in the rat brain and spinal cord in response to increasing durations of restraint stress. *Stress*. **8**, 199–211.
36. Karin M., Chang L. (2001) AP-1–glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level. *J. Endocrinol.* **169**, 447–451.
37. Itoi K., Motoike I., Liu Y., Clokie S., Iwasaki Y., Uchida K., Sato T., Aguilera G. (2019) Genome-wide analysis of glucocorticoid-responsive transcripts in the hypothalamic paraventricular region of male rats. *Endocrinology*. **160**, 38–54.
38. Kvetnansky R., Sabban E.L., Palkovits M. (2009) Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol. Rev.* **89**, 535–606.
39. Daftary S.S., Boudaba C., Tasker J.G. (2000) Noradrenergic regulation of parvocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroscience*. **96**, 743–751.

40. Perez D.M. (2020) Alpha(1)-adrenergic receptors in neurotransmission, synaptic plasticity, and cognition. *Front. Pharmacol.* **11**, 581098.
41. Morris D.P., Lei B., Longo L.D., Bomsztyk K., Schwinn D.A., Michelotti G.A. (2015) Temporal dissection of rate limiting transcriptional events using Pol II ChIP and RNA analysis of adrenergic stress gene activation. *PLoS One*. **10**, e0134442.
42. Ang S.A., Harrison J.L., Powers-Martin K., Reddrop C., McKittrick D.J., Holobotovskyy V.V., Arnold L.F., Phillips J.K. (2007) C-Fos activation in renal hypertension. *Hypertension*. **49**, 1468–1468.
43. Maiti P., Singh S.B., Sharma A.K., Muthuraju S., Banerjee P.K., Ilavazhagan G. (2006) Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochem. Int.* **49**, 709–716.
44. Zafir A., Banu N. (2009) Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. *Indian J. Biochem. Biophys.* **46**, 53–58.
45. Dal Santo G., Conterato G.M., Barcellos L.J., Rosemberg D.B., Piatto A.L. (2014) Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. *Neurosci. Lett.* **558**, 103–108.
46. Liu D., Ma Z., Xu L., Zhang X., Qiao S., Yuan J. (2019) PGC1alpha activation by pterostilbene ameliorates acute doxorubicin cardiotoxicity by reducing oxidative stress via enhancing AMPK and SIRT1 cascades. *Aging (Albany NY)*. **11**, 10061–10073.
47. Zhao X., Liu F., Jin H., Li R., Wang Y., Zhang W., Wang H., Chen W. (2017) Involvement of PKCalpha and ERK1/2 signaling pathways in EGCG's protection against stress-induced neural injuries in Wistar rats. *Neuroscience*. **346**, 226–237.
48. Pang D., Yang C., Luo Q., Li C., Liu W., Li L., Zou Y., Feng B., Chen Z., Huang C. (2020) Soy isoflavones improve the oxidative stress induced hypothalamic inflammation and apoptosis in high fat diet-induced obese male mice through PGC1-alpha pathway. *Aging (Albany NY)*. **12**, 8710–8727.
49. Lucas E.K., Dougherty S.E., McMeekin L.J., Reid C.S., Dobrunz L.E., West A.B., Hablitz J.J., Cowell R.M. (2014) PGC-1alpha provides a transcriptional framework for synchronous neurotransmitter release from parvalbumin-positive interneurons. *J. Neurosci.* **34**, 14375–14387.
50. Lin J., Wu P.H., Tarr P.T., Lindenberg K.S., St-Pierre J., Zhang C.Y., Mootha V.K., Jager S., Viana C.R., Reznick R.M., Cui L., Manieri M., Donovan M.X., Wu Z., Cooper M.P., Fan M.C., Rohas L.M., Zavacki A.M., Cinti S., Shulman G.I., Lowell B.B., Kraic D., Spiegelman B.M. (2004) Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell*. **119**, 121–135.
51. Fan W., Evans R. (2015) PPARs and ERRs: molecular mediators of mitochondrial metabolism. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **33**, 49–54.
52. Zhao Q., Zhang J., Wang H. (2015) PGC-1alpha overexpression suppresses blood pressure elevation in DOCA-salt hypertensive mice. *Biosci. Rep.* **35**, e00217.

Restraint Stress-Induced Expression of *Fos* and Several Related Genes in the Hypothalamus of the Hypertensive ISIAH Rats

Yu. V. Makovka^{1, 2, *}, L. A. Fedoseeva¹, D. Yu. Oshchepkov¹,
A. L. Markel^{1, 2}, and O. E. Redina¹

¹ Federal Research Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: makovkayv@bionet.nsc.ru

Stress can play a significant role in the development of arterial hypertension and many other complications of cardiovascular diseases. Considerable attention is paid to the study of the molecular mechanisms involved in the body's response to stressful influences, but there are still many blank spots in understanding the details. ISIAH rats model a stress-sensitive form of arterial hypertension. ISIAH rats are characterized by genetically determined enhanced hypothalamic-adrenal-cortical and sympathetic adrenomedullary systems activity, which suggests a functional state of increased stress reactivity. In the present study, for the first time, the time course of the *Fos* and several related genes' expression was studied in the hypothalamus of adult male hypertensive ISIAH rats after exposure to a single restraint stress of different duration (30, 60, and 120 minutes). The results of the study showed the activation of *Fos* transcription with a peak 1 hour after the onset of restraint stress. The dynamics of *Fos* gene activation coincides with the dynamics of blood pressure increase after stress. Restraint stress also alters the transcription of several other genes encoding transcription factors (*Jun*, *Nr4a3*, *Jdp2*, *Ppargc1a*) associated with the development of cardiovascular diseases. Since *Fos* induction is a marker of brain neuron activation, we can conclude that increased stress reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal systems of hypertensive ISIAH rats during short-term restriction is accompanied by activation of hypothalamic neurons and increased blood pressure level.

Keywords: immediate early genes, hypothalamus, single restraint stress, ISIAH rat strain