

Е.В. Чаплинская

## СТРЕССИНДУЦИРОВАННЫЕ И ВОЗРАСТЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ В ТКАНЯХ ОРГАНИЗМА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

*Концентрация фактора роста нервов в тканях организма самцов мышей выражено изменяется при изоляции, ресоциализации, а также при старении. Установлена лабильность концентрационного поведения нейроростового протеина в организме самцов мышей при хроническом и остром стрессах, а также в возрастных изменениях.*

*Разнонаправленные сдвиги его содержания в большей степени характерны для периферических мест его синтеза (подчелюстная слюнная железа) и транспортной системы организма (сыворотка крови). Церебральное содержание нейроростового протеина характеризуется относительным постоянством при стрессорных воздействиях и подъемом при старении.*

**Ключевые слова:** фактор роста нервов, изоляция, хронический и острый стресс, старение, подчелюстная слюнная железа, мозг, сыворотка крови.

**E. V. Chaplinskaya**

### STRESS-INDUCED AND AGE-RELATED CHANGES IN THE CONTENT OF NERVE GROWTH FACTOR (NGF) IN THE TISSUE OF MALE MICE

*The concentration of nerve growth factor in the tissue of male mice is highly labile in isolation, re-socialization, as well as in aging. Multi-directional shifts of the content is more prevalent in the peripheral locations of its synthesis (submandibular salivary gland) and the transport system of the body (blood serum). Protein levels of nerve growth in the brain is characterized by a relative constancy under stress influences and increases with age.*

**Key words:** nerve growth factor, chronic stress, isolation, acute stress (re-socialization), age-related changes, the aging of the body.

Современный социум характеризуется стремительным ростом темпа жизни, природных катаклизмов, экстремальных ситуаций, нервно-психических информационных перегрузок, общей глобализацией, а также иными негативными факторами, приводящими к повышению психоэмоционального напряжения и эмоциональному стрессу. Именно он служит одной из основных причин все более прогрессирующих в своей численности отклонений в деятельности различных физиологических систем [1], злокачественного перерождения клеток и преждевременного старения организма [4,17]. Последнее состояние сопровождается как правило поступательным генерализованным снижением функций органов и систем, расстройством обменных процессов, ведущих к дисбалансу между про- и антиоксидантной регуляциями, падением реактивности организма, толерантности к стрессам, интеллектуального и мнестического потенциала со стороны центральной нервной системы (ЦНС). Ослабляется и деятельность периферического звена ее в силу редукции чувствительности висцеральной сферы к сенсорным стимулам и, соответственно, афферентации с нее [4].

Участие, в столь разнящихся по природе процессах, ростовых и нейротрофных агентов, в частности фактора роста нервов (ФРН), остается исследованным далеко не в полной мере [18,19,21].

Имея богатый арсенал продуцентов и многообразие функций в целостном организме, опирающихся, главным образом, на ауто- и паракринных регуляторных механизмах, ФРН обеспечивает сопряжение нервной, эндокринной, иммунной, репродуктивной и других физиологических систем [8]. Имеется информация об участии нейроростового протеина в контроле деятельности гипоталамо-гипофизарного комплекса [20] и его вовлечении в ответную реакцию организма животных и человека на некоторые формы стресса [10,11,12] и ряда неврологических нарушений [15, 16].

Известно, что кристаллические эмоции служат лимбико-ретикулярные структуры мозга, откуда возбуждение рас-

пространяется как в восходящем направлении к коре, так и нисходящем, вовлекая вегетативное их сопровождение и активацию гипофизарно-надпочечникового звена [3]. Поэтому, детальное изучение роли ФРН как агента, задействованного в стрессорном ответе и возрастзависимых альтерациях, представляет собой несомненный интерес в связи с тем, что данный протеин играет важную роль в реализации генетической программы межклеточных взаимоотношений как в развивающемся так и в зрелом организме [9].

Длительная социальная изоляция мышей и последующая их ресоциализация, равно как продолжительное проживание животных в стандартных условиях вивария - могут служить адекватными экспериментальными моделями для изучения интимных процессов, лежащих в основе или сопровождающих стресс-индуцированные состояния организма и возраст-опосредованные его изменения.

Отсюда оправданной кажется **цель** работы: выяснить концентрационные альтерации биологически активной  $\beta$ -субъединицы ФРН у животных, в некоторых местах его продукции и транспортной системе организма при двух вариантах стресса и возрастных изменениях.

Основные **задачи** сводились к следующему:

1. Определить массу внутренних органов: подчелюстные слюнные железы (ПСЖ), мозг - у самцов мышей находившихся в условиях изоляции, подвергнутых психосоциальному стрессированию и после продолжительного совместного проживания («старожилы»);
2. Установить содержание общего белка в ПСЖ и мозге при трех вариантах межвидового пребывания особей;
3. Оценить уровни  $\beta$ -ФРН в сыворотке крови, ПСЖ и базальном отделе переднего мозга у всех объектов наблюдения.

Работа выполнена на 24 половозрелых самцах белых беспородных мышей массой 22-27 г, содержащихся в стандартных условиях вивария, которые сообразно поставленным задачам были поделены на 4 группы. В качестве модели

Таблица 1. Масса органов (мг) самцов мышей

Исследуемая ткань	Группы животных			
	Контроль (n=6)	Изоляция (n=6)	Стресс (n=6)	Старожилы (n=6)
Мозг	360,17 ± 14,06	301,17 ± 17,62*	330,17 ± 15,32	349,75 ± 32,35
ПСЖ	192,33 ± 22,29	163,67 ± 15,33	149,83 ± 13,72	211,00 ± 10,07

Таблица 2. Содержание общего белка (мкг/мг) в тканях организма самцов мышей

Исследуемая ткань	Группы животных			
	Контроль (n=6)	Изоляция (n=6)	Стресс (n=6)	Старожилы (n=6)
Мозг	56,72 ± 2,24	57,54 ± 4,71	42,42 ± 1,20*	41,58 ± 7,56*
ПСЖ	92,02 ± 11,21	106,07 ± 15,30*	86,00 ± 9,62*	78,48 ± 9,54*

Таблица 3. Содержание ФРН в тканях организма самцов мышей

Исследуемая ткань	Группы животных			
	Контроль (n=6)	Изоляция (n=6)	Стресс (n=6)	Старожилы (n=6)
Сыворотка крови (мкг/мл)	1,94 ± 0,14	1,63 ± 0,16*	5,01 ± 1,24*	2,21 ± 0,10
Мозг (нг/мг)	25,71 ± 8,33	28,19 ± 10,92	25,55 ± 0,01	42,48 ± 1,07
ПСЖ (мкг/мг)	50,06 ± 8,06	54,69 ± 9,46 <sup>□</sup>	45,14 ± 8,69 <sup>□</sup>	44,05 ± 2,16 <sup>□</sup>

была использована общепринятая методика зоосоциального стресса [2]. Животные первой группы, служившие контролем (n=6), находились в течение трех недель наблюдения в стандартных внутривидовых отношениях и представляли собой сообщество с устоявшейся иерархической структурой. Вторая и третьи группы животных – соответственно изолянт (n=6) и особи подвергавшиеся дальнейшему зоосоциальному стрессированию (n=6) – в течение 14 сут пребывали в одиночных клетках. По прошествии 2-недельного обособления, 6 особей объединялись в сообщество (помещались в одну общую клетку). В течение 1 ч наблюдения отмечалось максимальное число зоосоциальных взаимодействий, характеризовавшихся проявлением агрессивного поведения, что выражалось разным числом взаимных атак, погонь, укусов, угрожающих поз, защитных стоек и т.п. Ткани забирались спустя 1ч после ресоциализации у стрессированных животных, затем последовательно в группах изолянтов и у особей, служивших контролем. Четвертая группа животных, т.н. «старожилы» (n=6) – представляла собой самцов проживающих в стандартных межвидовых отношениях в условиях вивария в течение 9 месяцев; по истечении этого срока у которых должны проявиться начальные возрастные изменения со стороны всех систем организма.

При завершении экспериментов, животных наркотизировали эфиром, кровь получали из подключичной впадины из вскрытых сосудов плечевого сплетения. Оптимальность такого забора была обоснована ранее [2]. Образцы крови собирались в пластиковые эпидорфы и после 2ч инкубирования при 37°C центрифугировались 30 мин при 3000 об/мин. Собранная сыворотка при необходимости хранилась в жидком азоте.

Получение тканевого материала (ПСЖ, мозг) осуществлялось следующим образом: выделяли целостный орган, путем взвешивания устанавливалась масса каждого из них во всех экспериментальных группах. После этого из целостного органа иссекали кусочки тканей, которые промывались 0,9 % NaCl и высушивали на бумажном фильтре. Затем взвешивали по 100 мг ткани, гомогенизировали в 1мл 0,1М фосфатного буфера pH 7,4 (т.е. готовился 10 % гомогенат) и центрифугировали на MPW-310 (ПНР) (30 мин при 10000 об/мин). Все вышеописанные процедуры выполнялись на холоду. Полученные супернатанты хранили в жидком азоте.

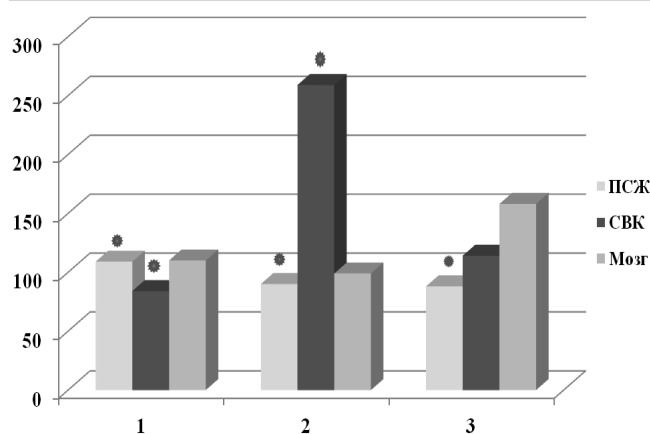
Непосредственно перед тестированием образцов на предмет присутствия в них нейроростового протеина, супер-

натанты размораживали, тщательно перемешивали, а получаемые из ПСЖ экстракты разводили в соотношении 1:1000 в фосфатном буфере (0,1М PBS pH 7,4), поскольку содержание ФРН в данном органе половозрелых самцов мышей более чем на порядок превосходит таковое в других тканях мышей.

Количественную оценку уровня β-ФРН проводили используя авторский вариант двухсайтового твердофазного ИФА [6]. Концентрация белка в супернатантах тканей оценивалась спектрофотометрически по Лоури. Для статистической обработки данных использовался пакет прикладных программ STATISTICA – 6.0 в среде Windows XP. Оценка результатов проводилась исходя из средних значений с учетом стандартного отклонения, стандартной ошибки и U-критерия Манна-Уитни.

Суммарные результаты экспериментов представлены в Табл.1-3. Из них явствует, что обособленное нахождение животных, создающее эмоционально ущербную ситуацию, приводило к снижению массы исследуемых органов: достоверно мозга (на 16%) и выражено ПСЖ (на 15%) (Табл.1). Однако, концентрация общего белка в церебральной ткани сохранялась на уровне контрольных величин (Табл.2), что может свидетельствовать о редукционных процессах в мозге, минуя синтез протеинов и затрагивающих, очевидно, иные метаболические пулы (водный обмен, электролитный состав, обмен углеводов, липидов и пр.). Уровень общего белка в ПСЖ оказался значимо выросшим (на 15%) (Табл.2), констатируя интенсификацию накопления белка в данной железистой ткани в условиях измененного гормонального статуса организма, сопутствующего индивидуальному обособлению, которое является противоположной, отличающейся от природной ситуацией. Параллельно означенным сдвигам происходило достоверное уменьшение содержания β-ФРН в сыворотке крови (на 16%), при одновременном приблизительно одинаковом по значению увеличении его в церебральной ткани (на 10%) и в ПСЖ (на 9%) (Табл.3). Возможными причинами тому служили: либо блокада высвобождения синтезирующими его элементами в циркуляторное русло, либо активация потребления протеина его мишенями, наделенными его специализированными рецепторами [18]. Созвучные данные получены и другими авторами, работающими в данном направлении [2].

Часовое объединение обитавших порознь особей, сопровождавшееся агрессивными взаимодействиями, не



**Рис. 1.** Содержание ФРН в тканях организма самцов мышей при изоляции (1), зоосоциальном стрессе (2) и у «старожилов» (3). За 100% принята концентрация нейроростового протеина в соответствующие ткани у контрольных животных. По оси ординат – отношение значений, полученных в опытных сериях к таковым в контрольной, выраженное в %.

приводило к изменению знака отклонений массы органов, имевших место у изолянтов, которая оставалась меньшей в сравнении с контрольными животными (мозг – 92%, ПСЖ – 78%) (Табл.1). Содержание общего белка, и в церебральной ткани, и в ПСЖ выявило достоверную редукцию, соответственно, на 15% и 6% (Табл. 2). В сыворотке крови отмечался достаточно выраженный и прогнозируемый, исходя из данных литературы [2], подъем уровня нейроростового протеина (до 258%) (Табл.3). Содержание ФРН в ПСЖ, синхронно с достоверным падением в ней количества общего белка, значимо снижалось (на 10%). Относительно индифферентной по данному показателю выглядела церебральная ткань – в ней отсутствовали видимые сдвиги содержания ФРН на фоне статистически значимого падения количества общего белка (Табл.3). Возможно, это подтверждает факт автономной регуляции его внутрицеребрального синтеза в сравнении с периферическими пулами, хотя есть данные о повышении уровня ФРН в различных областях мозга, включая гипоталамус и гиппокамп, при некоторых вариантах стресса [8,9] и его количественном снижении при ряде нейродегенеративных состояний [13].

В третьей экспериментальной группе животных, у «старожилов» отмечено незначительное уменьшение массы мозга (на 3%) и увеличение веса ПСЖ (на 10%) (Табл.1). Все это является созвучным с данными литературы, что вследствие различных причин, в первую очередь из-за снижения количества общей воды в тканях, в стареющем организме, происходит снижение общей массы тела, мышечной массы, повышение содержания жировой ткани, редукция объема циркулирующей крови и плазмы на 10-20% [4]. Так же и уровень общего белка был достоверно снижен в мозге (до 73%) и в ПСЖ (до 85%) (Табл.2), подтверждая тот факт, что основной обмен подвергается редукции во всех тканях в прямом соответствии с увеличением возраста. Уменьшение секреции слюны и ферментативной активности характерно и для слюнных желез стареющего организма [4]. Поэтому логично заключить, что на фоне компенсаторного роста массы ПСЖ стареющего организма, наблюдается недостаточность как белковой продукции в целом, так и ФРН в частности. Однако, содержание последнего возрастало в сыворотке крови (114%) «старожилов», вероятно за счет других клеточных элементов, задействованных в его продукции. Это предположение подтверждают и предыдущие данные наших исследований, об увеличении уровня нейроростового протеина (на 21%) в печени самцов мышей при их длительном совместном пребывании [5].

В мозге, на фоне стабильной массы органа и снижения уровня общего белка, значительно, но не достоверно, повышалась содержание ФРН (до 165%). Данные альтерации, возможно, могут быть объяснены выраженными морфо-физиологическими возрастными изменениями со стороны ЦНС: снижение ее активности, которое связано с уменьшением плотности нейронов, количества нейротрансмиттеров, нарушением нервной регуляции сосудов, их морфологическими изменениями и другими моментами [4]. В данных патофизиологических процессах задействованным оказывается и ФРН. Его участие в ряде нейродегенеративных и многих психопатологических нарушениях достаточно хорошо документировано [7]. В частности показано, что нейроростовой протеин, синтезируясь в форме предшественника (про-ФРН), затем протеолитически преобразуется в зрелую форму, которая связываясь с высокоаффинными Trk A рецепторами, инициирует клеточный ответ (дифференцировка, выживание и т.п.) [13]. Недавние наблюдения установили, что про-ФРН образуя комплекс со своим низкородственным рецептором p75 и его корецептором, способствует запуску программы клеточной смерти. Индукция ассоциации про-ФРН и p75 наблюдается при многих патологических состояниях и повреждениях ЦНС. Блокирование такого взаимодействия может быть эффективной в лимитировании апоптоза нейронов [14].

Таким образом, в при изоляции животных основные сдвиги величин изучаемых показателей свидетельствуют о том, что на фоне снижения массы исследуемых органов происходит накопление в ПСЖ и поддержание в мозге уровня общего белка. Параллельно означенным концентрационным сдвигам фиксируется нарастание содержания нейроростового протеина в данных органах, при истощении его количества в транспортной системе организма. Дополняя эти факты нашими предыдущими данными, о редукции содержания ФРН в сердце, селезенке и печени при изоляции [5], можно заключить, что в условиях замкнутого пространства, вызывающего первоначальную дезадаптацию организма, с последующим усугублением патологических реакций организма, наблюдается торможение образования нейроростового протеина во многих местах его синтеза за исключением ПСЖ и мозга. В условиях острого стресса (в ходе часового группирования животных) основные изменения величин изучаемых показателей сводились к следующему: масса органов (мозг, ПСЖ), была меньшей по сравнению с контрольными величинами, уровень общего белка достоверно снизился в обеих тканях. Это, вероятно, может свидетельствовать о наличии задействованных в данных стресс-реакциях белковых агентов, которые, «выходя» из мест образования, осуществляют разнообразные функции (регуляторные, информационные, трофические и др.) при остром стрессе. Концентрация ФРН в ПСЖ синхронно с количеством общего белка снижается: значимый «выход» нейроростового протеина фиксируется из ПСЖ в циркуляторное русло, хотя внутримозговой пул остается неизменным, возможно, ввиду важности его местных регуляторных ролей и меньшей зависимости от внецеребральных стресс-реакций организма. В стареющем же организме наблюдается увеличение синтезстимулирующих и секреторных потенциалов нейротрофин-продуцирующих элементов, а также перераспределение доли вклада синтетических источников в общий уровень нейроростового протеина: роль ПСЖ сокращается, а значение других и адресной доставки ФРН от них по циркуляторному руслу возрастает.

Все эти факты свидетельствуют о задействованности ФРН в стрессиндуцированных и возрастноопосредованных состояниях организма. Наиболее сходные, практически синхронные изменения уровня нейроростового протеина отме-



ченые при остром зоосоциальном стрессе и у стареющих самцов мышей. В этой связи дальнейшее исследование участия ФРН, а также других нейротрофных и ростовых агентов в подобных модельных состояниях организма животных, несомненно является актуальным и весьма значимым.

#### Литература

1. Александровский, Ю.А. Лобастов О.С., Спивак Л.И., Щукин Б.П. Психогении в экстремальных условиях. – М.: Медицина, 1991. – С.12.
2. Горбунова, Н.Б., Калюнов В.Н. Количество фактора роста нервов (b-ФРН) в крови и тканях мышей при психосоциальном стрессе // Изв. АНБ, Сер. биол. наук. - 1990. - № 1. - С. 84-88.
3. Потанин, М.Б., Писарев В.Б., Туманов В.П., Ерофеев А.Ю. Роль различных иерархических структур головного мозга при психосоциальном перенапряжении // Бюл. Экспер. Биол. и мед. - 1996. - №5. – С.578-582.
4. Федоровский, Н.М. Физиологические особенности стареющего организма в оценке специалиста по анестезиологии, реаниматологии и интенсивной терапии // Клиническая геронтология. - 2003.- № 2.-С.36-40.
5. Чаплинская, Е.В. Содержание фактора роста нервов в печени самцов мышей в различных зоосоциальных условиях // В сб.ст. «Фундаментальные и прикладные аспекты физиологии», Тр., 2009. – С.171-174.
6. Чаплинская, Е.В., Лукашевич В.С., Калюнов В.Н. Иммуноферментный анализ содержания фактора роста нервов (b-ФРН) в жидкостных средах животных и человека // Вестн. НАНБ. Сер. биол. наук. - 1998. - № 3. - С. 72-75.
7. Alleva, E, Francia N. Psychiatric vulnerability: Suggestions from animal models and role of neurotrophins // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2009. – Vol. 33, № 4. – P. 525-536.
8. Aloe, L., Levi-Montalcini. R. The discovery of nerve growth factor and modern neurobiology // *Trends Cell Biology.* – 2004. – Vol.14, №7. – P.395-399.
9. Branchi, I, Francia N, Alleva E. Epigenetic control of neurobehavioural plasticity: the role of neurotrophins // *Behav Pharmacol.* – 2004. – Vol. 15(5-6). – P. 353-362.
10. Cirulli, F, Alleva E. The NGF saga: from animal models of psychosocial stress to stress-related psychopathology // *Front Neuroendocrinol.* – 2009. - Vol. 30(3). – P. 379-395.
11. Cirulli, F, Francia N, Branchi I, Antonucci MT, Aloe L, Suomi SJ, Alleva E. Changes in plasma levels of BDNF and NGF reveal a gender-selective vulnerability to early adversity in rhesus macaques // *Psychoneuroendocrinology.* – 2009. Vol. 34(2). P. 172 - 180.
12. Emanuele, E., Politi P, Bianchi M., Minoretti P, Bertona M., Geroldi D. Raised plasma nerve growth factor levels associated with early-stage romantic love // *Psychoneuroendocrinology.* – 2006. – Vol. 31(3). – P. 288 - 294.
13. Fortress, A.M., Buhusi M., Helke K.L., Granholm A.-C. E. Cholinergic degeneration and alterations in the TrkA and p75NTR balance as a result of pro-NGF injection into aged rats // *Journal of Aging Research.* – 2011. – ID 460543. – P. 1-10.
14. Hempstead, B.L. Regulating proNGF action: multiple targets for therapeutic intervention // *Neurotox. Res.* – 2009. – 16 (3). – P. 255 – 260.
15. Jang, M.U., Park J.W., Kho H.S., Chung S.C., Chung J.W. Plasma and saliva levels of nerve growth factor and neuropeptides in chronic migraine patients // *Oral Dis.* - 2011. - 17(2). – P. 187-193.
16. Lise, M.-C., Sparsa A., Marie I. et al. Serum neurotrophin profile in systemic sclerosis // *PLoS ONE.* - 2010. – Vol.5 (11). - e13918.
17. Morris, J.C., McManus D.Q. The neurology of aging: normal versus pathological change // *Geriatrics* – 1991. - 46(8):47-8 – P. 51-54.
18. Saruta, J, Sato S, Tsukinoki K. The role of neurotrophins related to stress in saliva and salivary glands // *Histol Histopathol.* - 2010. - 25(10). – P.1317-1330.
19. Schulte-Herbrüggen, O, Eckart S, Deicke U, Kühl A, Otten U, Danker-Hopfe H, Abramowski D, Staufenbiel M, Hellweg R. Age-dependent time course of cerebral brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 in APP23 transgenic mice // *J Neurosci Res.* – 2008. - 86(12), – P. 2774-2783.
20. Tagliatela, G., Angelucci L., Scaecianose S. et al. Nerve growth factor modulator the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during the stress response // *Endocrinology.* - 1991. - Vol. 129, № 4. - P. 2212-2218.
21. Terry, AV Jr, Kutiyawalla A, Pillai A. Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats // *Physiol Behav.* – 2011. - 1; 102(2). – P. 149-157.