



Zastosowanie mapowania białka c-Fos w neuropsychofarmakologii

The application of c-Fos-immunoreactivity in neuropsychopharmacology

MAŁGORZATA LEHNER¹, ALEKSANDRA WISŁOWSKA², EWA TARACHA¹,
MAŁGORZATA ZIENOWICZ², ADAM PŁAŻNIK^{1,2}

Z: 1. Zakładu Neurochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

2. Katedry i Zakładu Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej w Warszawie

STRESZCZENIE. *Cel* – Przedstawienie najbardziej aktualnych przykładów zastosowania tej techniki do lokalizacji struktur ośrodkowego układu nerwowego aktywowanych przez substancje takie jak leki przeciwdepresyjne, neuroleptyki, substancje uzależniające, a także do mapowania dróg związanych z transmisją bólu, emocjami, lękiem i uczeniem. *Poglądy* – Białko c-Fos jest produktem genu c-fos, przedstawiciela genów tzw. wczesnej odpowiedzi komórkowej. W komórkach nie pobudzonych poziom mRNA dla c-fos jest prawie niewykrywalny, natomiast stymulacja różnorodnymi bodźcami wywołuje szybką i silną ekspresję tego genu. Immunocytochemiczne oznaczenie białka c-Fos pozwala na mapowanie aktywacji neuronalnej (tzw. transkrypcyjnej) mózgu. *Wnioski* – Mimo pewnych ograniczeń technika mapowania białka c-Fos znalazła zastosowanie w badaniu funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego zarówno w stanach fizjologicznych i patologicznych.

SUMMARY. *Aims* – The article presents new data concerning the c-Fos-immunoreactivity technique application to localization of the CNS structures activated by such substances as antidepressants, neuroleptics, or habit-forming substances, as well as to mapping of pathways implicated in pain transmission, anxiety and learning. *Review* – C-Fos protein is a product of c-fos gene – a member of the immediate early gene family (IEG). The basal level of c-fos mRNA is hardly detectable in non-stimulated cells, but its expression increases rapidly on administration of various stimuli. Fos immunocytochemistry offers a mapping tool enabling the investigation of functional neural activity (the so-called transcriptional activity) in the brain. *Conclusions* – Despite certain limitations, the technique of c-Fos protein mapping proved to be helpful in both in neurobiological and neuropharmacological studies investigating the central nervous system functioning in physiological and pathological states.

Słowa kluczowe: białko c-Fos / leki przeciwdepresyjne / neuroleptyki / substancje uzależniające / lęk / uczenie i pamięć

Key words: c-Fos protein / antidepressants / drugs of abuse / antipsychotics / anxiety / learning and memory

Słowniczek skrótów:

AMPA – kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy; AP1 – aktywator białkowy; BDNF – czynnik wzrostowy pochodzenia mózgowego; BNST – jądro leżące prążka kręcowego; GABA – kwas gammaaminomasłowy; 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{2B} – receptory serotoninowe, IEG – gen odpowiedzi wczesnej; LC – jądro miejsca sina-

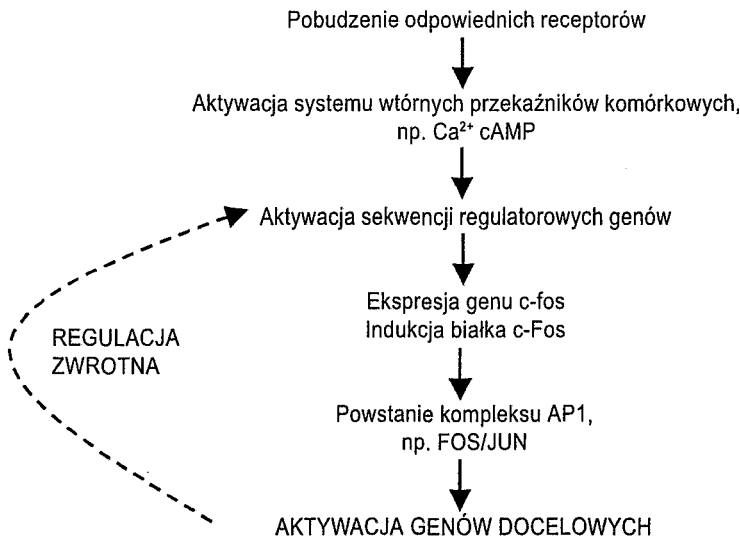
wego; mGluR – receptor metabotropowy dla glutamianu; NA – nucleus acumbens; NMDA – kwas N-metylo-d-asparaginowy; o.u.n. – ośrodkowy układ nerwowy; PAG – istota szara okołowodociągowa; PVN – okołokomorowe jądra wzgórze; PVN – paraventricular nucleus; TIMP – tkankowy inhibitor metaloproteinaz-1; TH – hydroksylaza tyrozyny; VIP – naczynioruchowy peptyd jelitowy; VTA – pole brzuszne nakrywki.

Gen *c-fos* wraz z innymi genami wczesnej odpowiedzi komórkowej (m.in. *jun*, *krox*, *myc*) (IEG – ang. *immediate early genes*) uczestniczy w procesach związanych z przekazywaniem informacji w komórce [8, 12, 17]. Produkt genu *c-fos* – białko *c-Fos* jest składową czynników transkrypcyjnych takich jak AP1 (*activator protein* – aktywator białkowy), które pełniąc funkcję „molekularnego włącznika” uruchamiają kaskadę genetycznego programu komórki [12, 17]. Istnieje koncepcja, zgodnie z którą w zależności od rodzaju bodźca zewnątrzkomórkowego, białka *c-Fos* mogą tworzyć kompleksy z różnymi białkami *Jun*, a to z kolei może decydować o specyficzności odpowiedzi genomowej [12, 17, 19]. Kompleks *Fos/Jun* prawdopodobnie decyduje o ekspresji m.in. hydroksylazy tyrozynowej, jelitowego peptydu naczynioruchowego (*VIP*), kalbindyny D28 (białko wiążące wapń), proenkefaliny i preprodynorfiny, endorfiny, *NGF* (czynnik wzrostu nerwów), neuropeptydów takich jak: *neurotensyna*, *neuropeptyd Y*, *TIMP-1* (*tissue inhibitor of metalloproteinases-1*), pojed-

nostki *GluR6* receptorów kainowych i *BDNF* (czynnik wzrostowy pochodzenia mózgowego) [12, 15, 19] (tabl. 1).

Ponadto białko *c-Fos* odgrywa ważną rolę w represji własnej transkrypcji [30]. W komórkach niestymulowanych ekspresja *c-fos* jest niska, natomiast wzrasta gwałtownie w kilka minut po zadziałaniu czynników uczestniczących w pobudzeniu neuronu (bodźce elektryczne, światło, stres, czynniki wzrostu, neurotransmitery, Ca^{2+} , cytokiny, estry forbolu, aktywność drgawkowa, ból, neurotoksyny, niektóre substancje: alkohol, narkotyki, leki) – rys. 1.

Transkrypcja mRNA genu *c-fos* rozpoczyna się po ok. 5 min. od momentu stymulacji komórki i trwa ok. 15–20 min. [8, 12, 30]. Stężenie m-RNA osiąga maksymalną wartość w ciągu 30–45 min. po pobudzeniu, po czym powraca do poziomu podstawowego w ciągu 3 h. Rozpoczęcie ekspresji *c-fos* oraz czas jej trwania nie są wielkościami stałymi – zależą od rodzaju stymulacji, badanej struktury i typu komórki [8, 12, 30]. Produktem genu *c-fos* jest białko *c-Fos* (62 kDa), którego naj-



Objaśnienia: AP1 – czynnik transkrypcyjny, aktywator białkowy (ang. *activator protein*)
cAMP – cykliczny adenozymonofosforan

Rysunek 1. Regulacja ekspresji genu *c-fos*, elementy regulatorowe

Tablica 1. Przykładowe produkty genów, których ekspresja jest prawdopodobnie regulowana przez białko Fos

Nazwa	Znaczenie	Podstawowe miejsca ekspresji w o.u.n.
Hydroksylaza tyrozyny	Enzym regulatorowy syntezy amin katecholowych, katalizuje reakcję, w której z tyrozyny powstaje lewodopa – prekursor dopaminy, noradrenaliny i adrenaliny	Neurony noradrenergiczne, adrenergiczne i dopaminergiczne
Kalbindyna (CD 28)	Wewnątrzkomórkowe białko wiążące jony wapnia	Wzgórze, prążkowie, układ limbiczny
Proenkefalina Preprodynorfina	Prekursory peptydów opioidowych o działaniu przeciwbólowym, przeciwłękowym. Biorą udział w regulacji uwalniania hormonów przez przysadkę w sytuacji stresowej	Prążkowie, rogi tylne rdzenia kręgowego, istota szara okołowodociągowa
Endorfina	Endogenny agonista receptorów opioidowych o działaniu przeciwbólowym, przeciwłękowym, wpływa na czynność hormonalną przysadki	Rdzeń kręgowy, PVN (jądro okołokomorowe)
TIMP-1 (tkankowy inhibitor metaloproteinazy typu 1)	Białko kontrolujące aktywność metaloproteinaz (m.in. gelatiny B), a przez to rozkład białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Odgrywa m.in. rolę w remodelowaniu obszarów o.u.n. po niedokrwieniu	Hipokamp (np. po podaniu kwasu kainowego lub pentyletetrazolu) oraz obszary o.u.n. które uległy niedokrwieniu
NGF (czynnik wzrostu nerwów)	Neurotrofina, odgrywa rolę w rozwoju i dojrzewaniu o.u.n., wykazuje działanie neuroprotektoryjne, moduluje odczucia bólowe m.in. w stanach zapalnych	Kora mózgową, podwzgórze, wzgórze, struktury pnia mózgu
VIP (jelitowy peptyd naczynioruchowy)	Peptyd, stymuluje wydzielanie hormonu wzrostu i prolaktyny, reguluje wydzielanie LH (hormonu luteinizującego)	Podwzgórze
Neuropeptyd Y	Neuropeptyd regulujący przyjmowanie pokarmów, posiada działanie przeciwłękowe, poprawiające pamięć, hipotensyjne, hipotermiczne	Podwzgórze
Neurotensyna	Neuropeptyd regulujący neurotransmisję dopaminergiczną, ma działanie hipotermiczne, hipotensyjne i przeciwbólowe	Prążkowie, ciało migdałowe, jądro nadwzrokowe i jądra okołokomorowe podwzgórza

większe stężenie jest obserwowane po ok. 1–2 h od momentu stymulacji komórki. Dlatego też zarówno mRNA jak i produkt białkowy tego genu uważane są za markery aktywacji komórki [12, 30]. Mapowanie aktywności neuronalnej poprzez określenie poziomu białka c-Fos jest cennym narzędziem pomocnym w identyfikacji struktur układu nerwowego zaangażowanych w procesy fizjologiczne i patologiczne. Ponadto pozwala ocenić zmiany aktywności układów neuroprzekaznikowych spowodowane działaniem substancji endo- i egzogennych [14, 32]. Technika

mapowania białka c-Fos może być przydatna w poszukiwaniu profilu farmakologicznego substancji psychoaktywnych poprzez ocenę ich wpływu na zmiany adaptacyjne w określonych strukturach mózgu [14, 32].

W artykule przedstawiono przykłady zastosowania techniki mapowania białka c-Fos w neurobiologii ze szczególnym zwróceniem uwagi na badania dotyczące działania substancji egzogennych, takich jak leki przeciwdepresyjne, neuroleptyki i substancje uzależniające, jak również identyfikacji struktur związanych z zaburzeniami emocjonalnymi

(lękiem), transmisją bodźców bólowych i powstawaniem śladów pamięciowych.

ZALETY I WADY IMMUNOCYTOCHEMICZNEJ METODY OZNACZANIA BIAŁKA C-FOS W NEUROPSYCHOFARMAKOLOGII

Indukcja białka c-Fos zachodząca w odpowiedzi na nowy bodziec odzwierciedla pobudzenie neuronu oraz postsynaptyczne zmiany w o.u.n. Białko c-Fos wydaje się najbardziej wiarygodne markerem aktywności neuronalnej spośród białkowych produktów genów odpowiedzi wczesnej, ponieważ zmiany ekspresji genu c-fos są bardzo wyraźne i łatwe do zmierzenia, a poziom aktywności podstawowej niski [8, 12, 30]. Detekcja białka c-Fos jest metodą immunocytochemiczną o dużej rozdzielczości, pozwalającą na wykrycie produktu z dokładnością do jednej komórki i rozróżnienie między zmianami w neuronie a zmianami zachodzącymi w synapsach czy komórkach glejowych [30]. Technika immunocytochemiczna z wykorzystaniem barwnej reakcji enzymatycznej nie jest metodą ściśle ilościową, ponieważ w wielu przypadkach intensywność zabarwienia tkanki nie odpowiada ściśle ilości wykrywanego białka [32]. Jednak pozwala ona w zadowalający sposób porównać liczbę wyznakowanych komórek w określonych strukturach. Dodatkowa detekcja markerów biochemicznych (neuropeptydów, receptorów, neuroprzekazników, enzymów) poprzez stosowanie kombinacji technik (użycie kilku przeciwciał w immunocytochemii, czy połączenie z metodą autoradiografii), a także standardowe metody określenia projekcji neuronalnej, dają możliwość identyfikacji fenotypu neuronów aktywowanych w wyniku stymulacji [12, 32]. Chociaż dystrybucja Fos-immunopozytywnych neuronów nie jest związana ściśle z konkretnym układem neurotransmitera czy systemem wtórnych przekazników w mózgu [12, 32], to metodę tę można wykorzystać do badań nad

interakcjami pomiędzy układami neuroprzekazników oceniając poziom białka c-Fos, np. po podaniu antagonistów poszczególnych receptorów. Technika mapowania białka c-Fos umożliwia prowadzenie doświadczeń w warunkach naturalnych, bez anestezji lub unieruchomienia, co jest zwykle konieczne w przypadku metod elektrofizjologicznych. Łatwiejsza jest przy tym ilościowa ocena zjawiska, ponieważ można oszacować ilość aktywowanych komórek [32].

Białko c-Fos łatwo indukuje się pod wpływem różnych, nawet subtelnych bodźców, np. związanych z przebywaniem zwierząt w nowym środowisku [30], dlatego ogromne znaczenie przywiązuje się do wyeliminowania lub kontrolowania czynników niespecyficznych, innych niż badany bodziec. Zwierzęta powinny unikać stresu na 1–24 h przed wykonaniem perfuzji. Już sama zmiana miejsca związana z procedurą eksperymentalną może być przyczyną zwiększenia stężenia białka c-Fos. W badaniach dotyczących wpływu alkoholu na ekspresję IEG (m.in. c-fos) stwierdzono różnice w ekspresji c-fos podczas „dobrowolnego” (samopodawanie) i „wymuszonego” (przy udziale eksperymentatora) podawania alkoholu, co można tłumaczyć wpływem stresu związanego z procedurą [27].

Leki przeciwbólowe i środki znieczulające wpływają na liczbę i dystrybucję neuronów Fos-pozytywnych [30]. Po zabiegu operacyjnym (np. zakładanie elektrod, kaniul) zwierzęta powinny być pozostawione na okres 2 tygodni, żeby poziom białka c-Fos powrócił do normy (podwyższona ekspresja c-fos może wystąpić nie tylko w samych neuronach, ale w miejscu rany, np. gleju) [30].

Staranny dobór grupy kontrolnej ma bardzo duże znaczenie przy stosowaniu tej techniki, ponieważ umożliwia ocenę specyficzności efektów wywołanych badanym bodźcem [12, 27]. Wrażliwość tej metody na jakiegokolwiek pobudzenie może być uważana za jej mankament. Z drugiej strony można wykorzystać niespecyficzną aktywację genu c-fos (np. stres związany z unieruchomieniem zwierzęcia) do analizy uspokajającego wpływu bada-

nych substancji. Taki model eksperymentalny bywa stosowany np. przy badaniu wpływu alkoholu i substancji przeciwłękowych [27].

Dystrybucja wyznakowanych komórek może być dodatkowo zaburzona na skutek czynności związanych z utrwalaniem i przechowywaniem tkanki czy nieprawidłowym sposobem przeprowadzenia reakcji immunocytochemicznej [8].

Przypuszcza się, że ekspresja c-fos nie zależy wyłącznie od połączeń dochodzących do danego neuronu i rodzaju oraz intensywności bodźca, ale również od pewnych wewnętrznych cech neuronu [32]. Istnieją przesłanki, że może ona nie zachodzić w komórkach, które mają wysoki poziom białek wiążących wapń, ze względu na udział Ca^{2+} w ekspresji c-fos. Zwiększona ilość białka c-Fos świadczy o tym, że komórka nerwowa została pobudzona, ale brak ekspresji c-fos nie zawsze wskazuje na brak jej aktywności.

C-Fos jest markerem aktywności neuronalnej w ostrej fazie pobudzenia, w przypadku bodźców przewlekłych komórki adaptują się i ekspresja c-fos ulega wyciszeniu [30, 32]. Wówczas aktywność komórki można stwierdzić używając innych IEG, np. zif268 (marker komórek, które uległy funkcjonalnemu wyciszeniu) [32].

Ogromną zaletą tej metody jest łatwość wykonania i niski koszt w porównaniu z innymi metodami biologii molekularnej [32]. Mimo pewnych ograniczeń metoda ta jest cennym narzędziem w badaniu o.u.n.

LEKI PRZECIWDEPRESYJNE

Badanie mechanizmów działania leków przeciwdepresyjnych przy pomocy techniki oznaczania białka c-Fos napotyka wiele trudności. Efekt działania tej grupy leków zależy od zmian adaptacyjnych w receptorach i neuroprzekaznikach. Pojawia się dopiero po 2–3 tygodniach ich stosowania, dlatego, po jednorazowym podaniu leków przeciwdepresyjnych ich wpływ może być nieselektywny [22, 29]. Ponieważ białko c-Fos jest markerem

zmian ostrych, a nie przewlekłych, po wielokrotnym stosowaniu leków przeciwdepresyjnych różnice między zwierzętami badanymi i kontrolnymi są zwykle mało widoczne [22, 29]. Jednak przy przewlekłym podawaniu fluoksetyny zaobserwowano statystycznie znamienne wzrost białka c-Fos w korze przedczołowej i hipokampie, co pośrednio przemawia za udziałem tych struktur w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych [22, 29]. Po jednorazowym podaniu innych leków przeciwdepresyjnych (citalopram, imipramina, fluoksetyna, fluwoksamina, flesinoksan) obserwuje się wzrost ilości białka c-Fos ograniczony jedynie do obszaru jądra środkowego ciała migdałowatego i jąder podwzgórza, co może sugerować, że struktury te biorą udział w patogenezie depresji [22, 29]. W badaniach Torresy i wsp. [29] wykazano, że po podaniu fluoksetyny (selektywnego inhibitora wychwyty zwrotnego serotoniny) następuje wzrost białka c-Fos w jądrach podwzgórza – miejscu uwalniania CRF (*corticotropin releasing factor*). Przypuszcza się, że fluoksetyna zmienia poziom hormonów steroidowych poprzez wpływ na regulację uwalniania CRF przez podwzgórze [29]. Obecnie jednak nieznanym jest mechanizm łączący wzrost ekspresji c-fos ze wzrostem wydzielania hormonów steroidowych [29].

NEUROLEPTYKI

W licznych eksperymentach wykazano [5, 12, 14, 28], że ekspresja c-fos po typowych (klasycznych) neuroleptykach różni się od ekspresji po neuroleptykach atypowych. Haloperidol (przedstawiciel neuroleptyków klasycznych) powoduje wzrost ekspresji c-fos w obrębie jądra półleżącego, prążkowie i istry czarnej, podczas gdy nietypowe neuroleptyki (klozapina i remoksyprid) indukują c-fos głównie w korowej części jądra półleżącego oraz w korze przedczołowej [30]. Wyniki te jednak poddano krytyce, sugerując że użycie zbyt dużych dawek neuroleptyków w tych badaniach mogło mieć działanie uspokajające

i wpływać na dystrubucję neuronów wykazujących obecność białka c-Fos. W pracy Murphy'ego [23] haloperidol i klozapinę podawano w niższych dawkach oraz oceniano dodatkowo wpływ otoczenia (grupę zwierząt umieszczono w nowym środowisku) na działanie tych leków. Zaobserwowano, że haloperidol powodował wzrost ilości białka c-Fos w jądrze półleżącym i prążkowie u wszystkich zwierząt, zaś u szczurów umieszczonych w nowym środowisku indukował białko c-Fos także w korze przedczołowej. W przypadku podawania klozapiny, stwierdzono, że lek ten powodował istotny spadek immunoreaktywności we wszystkich badanych obszarach mózgu u wszystkich zwierząt umieszczonych w nowym środowisku [23]. Wyniki te wskazują na różną aktywację c-fos w zależności od poziomu stresu i na istnienie związku pomiędzy działaniem leków przeciwpsychotycznych a wpływami środowiska [23]. Różnice w aktywacji neuronów prążkowiec stanowią dodatkowy dowód na słabsze występowanie objawów pozapiramidowych po klozapinie. Ponadto wykazano, że wzrost poziomu białka c-Fos po haloperidolu zależy od działania antagonistycznego względem receptorów D_2 i od wpływu na receptory NMDA, co może wskazywać, że haloperidol pośrednio moduluje także transmisję glutaminergiczną w niektórych obszarach mózgu, takich jak boczne prążkowie i część korowa jądra półleżącego [14, 28]. Wyniki analizy ekspresji c-fos w poszczególnych strukturach mózgu po podaniu neuroleptyków oraz ocena ich skuteczności klinicznej i objawów niepożądanych sugerują, że część korowa jądra półleżącego, w której obserwowano ekspresję białka c-Fos w odpowiedzi na wszystkie rodzaje neuroleptyków, jest wybiórczo zaangażowana w efekty antypsychotyczne tej grupy leków [14, 28].

SUBSTANCJE UZALEŻNIAJĄCE

Harlan i Garcia [9] w poszukiwaniu wspólnych cech dla różnych substancji uzależniających zestawili neuroanatomiczne wzorce eks-

presji IEG po podaniu: alkoholu, nikotyny, kofeiny, pochodnych amfetaminy, kokainy, morfiny i kanabinoli. Wszystkie wyżej wymienione związki wywołują silną ekspresję c-fos przede wszystkim w jądrze ogoniastym i skorupie. W jądrze półleżącym indukcja białka c-Fos była słabsza, mimo iż struktura ta związana jest z działaniem nagradzającym. Ponadto substancje te aktywowały korę mózgu (kora obręczy, gruszkowata, skroniowa) [9]. Na podstawie danych klinicznych wiadomo, że środki psychostymulujące u młodzieży i dorosłych powodują przejściową euforię, natomiast u dzieci najczęściej dysfориę. W badaniach z wykorzystaniem modeli zwierzęcych analizowano ekspresję c-fos u 21-, 35- i 60-dniowych szczurów [1]. W obrębie dopaminergicznego „układu nagrody” zaobserwowano wyższy poziom białka c-Fos u zwierząt 21-dniowych w porównaniu ze zwierzętami starszymi. Informacje te potwierdzają więc wcześniejsze doniesienia kliniczne, w których stwierdzono, że podawanie środków psychostymulujących wywołuje różne efekty u dzieci, nastolatków i osób dorosłych. Może to sugerować, że nadmierne pobudzenie dopaminergicznego układu nagrody prowadzi do zmiany euforii w dysfориę zależnie od wieku [1].

Eksperymenty z użyciem techniki mapowania białka c-Fos pozwoliły także na zlokalizowanie struktur mózgu odpowiedzialnych za rozwój sensytyzacji wywołanej przyjmowaniem substancji uzależniających [4, 9]. W badaniach na zwierzętach stwierdzono, że po jednorazowym podaniu heroiny występowała wzmocniona indukcja białka c-Fos w części korowej jądra półleżącego, natomiast po podaniach wielokrotnych zauważono zwiększoną ilość białka c-Fos w grzbietowo-przyśrodkowej części kompleksu jądro ogoniaste-skorupa i zmniejszoną ilość białka c-Fos w części korowej j. półleżącego [4]. Podobne wyniki otrzymano po wielokrotnym stosowaniu innych substancji psychoaktywnych [4]. Nie obserwowano przy tym żadnych zmian w obszarze czuciowym i ruchowym kory somatomotorycznej [4]. W zgodzie z tymi wyni-

kami pozostaje obserwacja, że wielokrotne podanie morfiny nasilało transmisję dopaminergiczną w CPU (kompleks jądro ogoniaste-skorupa) oraz osłabiało ją w j. półleżącym. Obniżonej aktywacji neuronalnej w jądrze półleżącym towarzyszyło nasilenie polekowej stereotypii [4]. Doniesienia te mogą wskazywać, że część prążkowiec odpowiadająca za reakcje motoryczne (posiada liczne połączenia z układem limbicznym) łatwiej ulega sensytyzacji na morfinę niż pozostałe części mózgu [4, 9].

Powszechnie wiadomo, że alkohol wywiera działanie amnestyczne. Przypuszcza się, że może wynikać to z jego supresyjnego działania na hipokamper [26]. W modelu warunkowania awersyjnego do kontekstu, po podaniu alkoholu obserwowano zmniejszenie aktywacji neuronalnej mierzonej poziomem białka c-Fos w rejonie CA₃ hipokampa, co może mieć bezpośredni związek z hamowaniem procesu uczenia przez tę substancję [26, 27]. Natomiast wzrost indukcji białka c-Fos był widoczny w ciele migdałowatym, jądrze prążka krańcowego i okołokomorowych jądrach podwzgórza (są to struktury odpowiedzialne za procesy emocjonalne) [27]. Wykazano także, że po podaniu niewielkich dawek alkoholu mogą występować różnice osobnicze aktywacji neuronalnej w obrębie jądra środkowego ciała migdałowatego [26]. Zwierzęta, u których zaobserwowano podwyższoną ekspresję c-fos w ciele migdałowatym charakteryzowała zwiększona aktywność ruchowa. Odwrotnie, słabszej aktywności ruchowej odpowiadała mniejsza ilość białka c-Fos w tym obszarze [26].

TRANSMISJA BÓLU

W latach osiemdziesiątych Hunt [13] zaobserwował wzrost ekspresji c-fos w neuronach syntetyzujących proenkefalinę i preprodynorfynę po zadziałaniu bodźców bólowych [13]. Zwiększona ekspresja c-fos opisana przez Hunta potwierdziła lokalizację szlaków bólowych identyfikowanych metodami elek-

trofizjologicznymi [13]. Zauważono np., że istota szara okołowodociągowa (PAG) pełni ważną funkcję w transmisji bólu [10]. Po zastosowaniu bodźców bólowych, których zwierzę nie było w stanie uniknąć (zarówno głębokich jak i powierzchownych) nie wystąpiła żadna widoczna reakcja behawioralna, natomiast bodźce możliwe do uniknięcia prowokowały ucieczkę [18]. Wykazano, że bodźce bólowe niemożliwe do uniknięcia powodowały wzrost aktywacji w brzuszno-bocznej części PAG, z kolei powierzchowny ból skórny (możliwy do uniknięcia) aktywował jedynie część boczną PAG [18].

Technika oznaczania białka c-Fos okazała się również pomocna w badaniach potencjalnych leków przeciwmigrenowych. Mitsikostas i Sanchez [21] zestawili wyniki badań nad receptorami pośredniczącymi w wywoływaniu ekspresji c-fos w jądrze ogoniastym nerwu trójdzielnego (Sp5C), w zwierzęcym modelu transmisji bólu czaszkowego. Wykazano, że receptory serotonergiczne (5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{2B}), receptory dla neurokininy NK-1, GABA, NMDA, AMPA i receptory metabotropowe dla glutaminianu (III klasy mGluR) modulują ekspresję c-fos w Sp5C indukowaną przez aktywację układu naczyniowego unerwionego przez nerw trójdzielny. Leki o udokumentowanym działaniu przeciwmigrenowym, mające specyficzny profil receptorowy, takie jak tryptany (agoniści receptorów serotonergicznych 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{1F}) oraz alkaloidy sporyszu (agoniści receptorów serotonergicznych 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{1F}) hamowały ekspresję c-fos w Sp5C [21].

LEK

Wystąpienie reakcji lękowej związanej z bezpośrednim zagrożeniem (strach) jest jednym z mechanizmów obronnych organizmu. U szczurów, które były eksponowane na bodźce lękowe takie jak zapach drapieżnika (kot), zaobserwowano podwyższony poziom białka c-Fos w brzuszno-środkowej

części podwzgórza, jądrze przedsuteczkowatym i substancji szarej okołowodociągowej, co potwierdza teorię, że rejony te są zaangażowane w reakcje obronne [6]. Lęk, w odróżnieniu od strachu może być skutkiem zaburzeń w ośrodkowej regulacji emocji i zaliczany jest do objawów patologicznych. Jak wykazały badania z użyciem techniki mapowania białka c-Fos, dla prawidłowych reakcji emocjonalnych istotne jest utrzymanie odpowiedniego progu pobudliwości neuronów w obszarze ciała migdałowe-podwzgórza, ciała migdałowe-śródmózgowie [11]. Uważa się, że ważną rolę w tym procesie odgrywa kinaza tyrozynowa Fyn, która wpływa na prawidłowe funkcjonowanie zarówno receptorów NMDA (fosforyluje podjednostkę NR2) jak i układu GABAergicznego [11]. Koncepcję tę potwierdzają wyniki analizy immunocytochemicznej. Po podaniu N-metylo-D-asparagianu – agonisty receptora NMDA (dawka podprogowa dla wywoływania drgawek) u zwierząt pozbawionych genu kinazy tyrozynowej Fyn, występuje zwiększona aktywacja dróg nerwowych z ciała migdałowego do podwzgórza i śródmózgowia (głównego szlaku odpowiadającego za ekspresję emocji), czego wyrazem jest wzrost pobudliwości na bodźce lękowe zmutowanych zwierząt [11].

Ciekawych informacji dostarczają wyniki eksperymentów przeprowadzonych na szczurach Wistar i Lister (kapturowe), u których wykazano różnice w reakcji na bodziec awersyjny (drażnienie ultradźwiękami) [24]. Szczury Lister reagowały ucieczką natychmiast po zastosowaniu bodźca. U zwierząt tych zaobserwowano podwyższony poziom białka c-Fos w rejonie grzbietowym dogłowej i ogonowej części PAG. Natomiast u szczurów szczerpu Wistar występowała reakcja zniechęcenia, a poziom białka c-Fos był wysoki w rejonie brzusznej PAG. Uważa się, że dalsze badania w tym zakresie mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia podłoża neuroanatomicznego wielu zaburzeń lękowych, w tym reakcji paniki i stuporu emocjonalnego [24].

Istnieje wiele dowodów wskazujących na udział czynników stresowych w generowaniu chorób psychosomatycznych u ludzi [2]. W doświadczalnym modelu lęku przewlekłego badano zmiany behawioralne i indukcję białka c-Fos u zwierząt, które stymulowano awersyjnie bodźcami elektrycznymi, a następnie oceniano ich reakcje na ostry bodziec elektryczny (14 dni później) [2]. W grupie zwierząt poddanych działaniu bodźców elektrycznych stwierdzono podwyższoną ekspresję białka c-Fos w wielu strukturach korowych i podkorowych mózgu: bezziamiste pole wyspy, środkowa część kory przedczołowej, jądro półleżące, jądro podstawno-boczne prążka krańcowego, jądro podstawno-boczne ciała migdałowego, pole CA1 hipokampa, okołokomorowe jądra podwzgórza, miejsce sinawe, jądro pasma samotnego. Wyniki te potwierdzają hipotezę o sensytyzacji obszarów mózgu zaangażowanych w kontrolę reakcji lękowych (kora przedczołowa, ciało migdałowe) i sprawujących kontrolę nad układem autonomicznym (j. pasma samotnego, jądra podwzgórza). Wynikiem tego jest nadmierna reakcja na nowy bodziec stresowy [2]. Dzięki badaniu ekspresji białka c-Fos zaobserwowano, że istnieją pewne wspólne obszary ośrodkowego układu nerwowego aktywowane różnymi bodźcami lękowymi. Niezależnie od stosowanego modelu lęku: w teście uniesionego labiryntu krzyżowego, lęku uwarunkowanego, stymulacji awersyjnej, stosowaniu substancji wywołujących napady lęku panicznego (np. odwrotni agoniści receptora benzodiazepinowego, kofeina) dochodziło do aktywacji PAG, j. miejsca sinawego (LC) i związanego z nimi obszaru tyłomózgowia [31].

W badaniu reakcji na stres wywoływany unieruchomieniem (model reakcji lękowej) stwierdzono, że wielokrotne podawanie fluoksetyny – jednego z przedstawicieli SSRI (selektywnych inhibitorów wychwyty zwrotnego serotoniny) prowadzi do wzrostu ilości białka c-Fos w brzuszno-bocznej i środkowej części BNST (jądro leżące prążka krańcowego – początek nerwu błędnego), jądrze bocznym przegrody, grzbietowych jądrach szwu (neurony

serotoninerгіczne) i miejscu sinawym (neuro-ny noradrenergiczne) [20]. Natomiast w grupie zwierząt, które nie były poddane bodźcowi stresowemu (unieruchomienie) chroniczne podawanie fluoksetyny indukowało białko c-Fos w j. przyśrodkowym ciała migdałowatego, brzuszno-bocznej i grzbietowo-bocznej części BNST, j. grzbietowym i środkowym przegrody, grzbietowo-bocznej i grzbietowo-środkowej część PAG i grzbietowych jądrach szwu. Wyniki te potwierdzają wpływ SSRI na układ serotoninerгіczny i noradrenergiczny, a także ich selektywne oddziaływanie na obwody neuronalne regulujące odpowiedź organizmu na stres [20, 29].

UCZENIE I PAMIĘĆ

Proces uczenia wymaga wystąpienia określonej reakcji na bodziec i utrwalenia jej w postaci śladu pamięciowego w mechanizmie zależnym od transkrypcji genów i syntezy białek (m.in. białka c-Fos). Podstawową rolę w ekspresji genu c-fos związanej z uczeniem, przypisuje się receptorom dla kwasu glutaminowego (głównego neuroprzekaźnika pobudzającego w ośrodkowym układzie nerwowym), szczególnie receptorom NMDA i AMPA. Są one bezpośrednio związane z procesami depolaryzacji błon komórkowych i wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} [16, 17]. Uważa się, że dla wytworzenia trwałego śladu pamięciowego ważna jest integracja informacji sensorycznych i motywacyjnych. W modelu lęku uwarunkowanego obserwuje się podwyższoną ekspresję c-fos w wielu obszarach przodomózgowia (zakręt obręczy, hipokamp), we wzgórzu, podwzgórzu, j. migdałowatym. Wyniki badań przeprowadzonych przy użyciu techniki mapowania białka c-Fos wskazują ponadto, że na różnych etapach procesu uczenia dochodzi do aktywacji neuronalnej poszczególnych jąder w układzie limbicznym [3, 7, 17]. Ponadto potwierdzają one udział ciała migdałowatego (jądro środkowe), struktury, która bezpośrednio komunikuje się z obszarami sensorycznymi kory, wzgórzem,

podwzgórzem oraz j. pasma samotnego w pniu mózgu [3, 7]. W fazie nabywania umiejętności (uczenia) obserwuje się wyraźny wzrost aktywności neuronalnej w jądrze podstawobocznym ciała migdałowatego, który zanika w trakcie wykonywania wyuczonego zadania [3, 7]. We wczesnym stadium kojarzenia bodźców, ciało migdałowate wydaje się być strukturą dominującą względem hipokampa oraz odgrywać istotną rolę w procesie ich wartościowania [3, 7]. Wyniki wielu prac dotyczących ekspresji genu c-fos wskazują, że ekspresja tego genu i indukcja białka zapoczątkowuje reorganizację sieci neuronalnej i tworzenie specyficznych połączeń, co prowadzi do zmian odpowiedzialnych za proces zapamiętywania. Badania dowodzą, że obszary mózgu odpowiedzialne za procesy pamięciowe są również związane z uzależnieniami [25].

PODSUMOWANIE

Indukcja białka c-Fos zachodząca w odpowiedzi na nowy bodziec odzwierciedla pobudzenie neuronu oraz postsynaptyczne zmiany w o.u.n. Immunocytochemiczna metoda mapowania białka c-Fos niewątpliwie przyczyniła się do istotnych odkryć w psychofarmakologii i psychiatrii. Mimo pewnych ograniczeń stanowi ona cenne narzędzie w badaniu funkcjonowania o.u.n. zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych. Badanie ekspresji genu c-fos i określenie poziomu jego białka (podobnie jak badanie ekspresji wielu innych genów wczesnej odpowiedzi komórkowej) znalazło zastosowanie w ocenie szlaków neurofizjologicznych odpowiadających za reakcje emocjonalne, zaburzenia psychiczne i przewodzenie bólu. Mapowanie białka c-Fos okazało się również pomocne w poszukiwaniu struktur mózgowia i rdzenia kręgowego zaangażowanych w mechanizmy działania różnych leków oraz substancji uzależniających, ułatwiając lokalizację struktur odpowiedzialnych za efekt terapeutyczny, bądź za działania niepożądane.

PIŚMIENNICTWO

1. Andersen SL, Le Blanc CJ, Lyss PJ. Maturational increases in c-fos expression in the ascending dopamine systems. *Synapse* 2001; 41: 345–50.
2. Bruijnzeel AW, Stam R, Compan JC, Croiset G, Akkermans LMA, Oliver B, Wiegant VM. Long-term sensitization of Fos-responsivity in the rat central nervous system after a single stressful experience. *Brain Res* 1999; 819: 15–22.
3. Chowdury GM, Fujioka T, Nakamura S. Induction and adaptation of Fos expression in the rat brain by two types of acute restraint stress. *Brain Res Bull* 2000; 52: 171–82.
4. D'este L, Scontrini A, Cassini A, Pontieri P, Renda T. Heroin sensitization as mapped by c-Fos immunoreactivity in the rat striatum. *Brain Res* 2002; 933: 144–9.
5. Deutch AY, Duman RS. The effects of anti-psychotic drugs on Fos protein expression in the prefrontal cortex: cellular localization and pharmacological characterization. *Neuroscience* 1996; 70: 377–89.
6. Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience* 1996; 104: 1085–97.
7. Gall CM, Hess US, Lynch G. Mapping brain networks engaged by, and changed by, learning. *Neurobiol Learn Memory* 1998; 70: 14–36.
8. Greenberg ME, Ziff EB. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 1984; 311: 433–8.
9. Harlan RE, Garcia MM. Drugs of abuse and immediate-early genes in the forebrain. *Mol Neurobiol* 1998; 16: 221–67.
10. Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull* 1998; 45: 1–8.
11. Hattori K, Yagi T, Maekawa M, Sato T, Yuasa S. N-methyl-D-aspartate-induced c-Fos expression is enhanced in the forebrain structures related to emotion in Fyn-deficient mice. *Brain Res* 2001; 905: 188–98.
12. Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Rev* 1998; 28: 370–490.
13. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 1987; 326: 632–4.
14. Hussain N, Flumerfelt BA, Rajakumar N. Muscarinic, adenosine A(2) and histamine H(3) receptor modulation of haloperidol-induced c-fos expression in the striatum and nucleus accumbens. *Neuroscience* 2002; 112: 427–38.
15. Jaworski J, Biedermann IW, Lapinska J, Szklarczyk A, Figiel I, Konopka D, Nowicka D, Filipkowski RK, Kowalczyk A, Kaczmarek L. Neuronal excitation-driven and AP-1-dependent activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 gene expression in rodent hippocampus. *J Biol Chem* 1999; 274: 28106–12.
16. Kaczmarek L. Molecular biology of vertebrate learning: is c-fos a new beginning? *J Neurosci Res* 1993; 1 (34): 377–81.
17. Kaczmarek L. C-fos in learning: beyond the mapping of neuronal activity. W: Kaczmarek L, Robertson HJ, red. *Handbook of chemical neuroanatomy. Immediate early genes and inducible transcription factors in mapping of the central nervous system function and dysfunction.* Elsevier Science BV 2002; V 19: 189–215.
18. Keay KA, Clement IC, Depaulis A, Bandler R. Different representations of inescapable noxious stimuli in the periaqueductal gray and upper cervical spinal cord of freely moving rats. *Neurosci Lett* 2001; 313: 17–20.
19. Lasoń W. Ekspresja genów jako wyraz interakcji ligand-receptor. W: Nowak JZ, Zawilska JB, red. *Receptory – struktura, charakterystyka, funkcja.* Warszawa: PWN; 1997: 358–69.
20. Lino de Oliveira C, Sales AJ, Del Bel EA, Silveira MC, Guimarães FS. Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. *Brain Res Bull* 2001; 55: 747–54.
21. Mitsikostas DD, Sanchez del Rio M. Receptor systems mediating c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis in animal models of migraine. *Brain Res Rev* 2001; 5: 20–35.
22. Morreli M, Pinna A, Ruiu S, Del Zompo M. Induction of Fos-like-immunoreactivity in the central extended amygdala by antidepressant drugs. *Synapse* 1999; 31: 1–4.
23. Murphy CA, Felton J. Interactions between environmental stimulation and antipsychotic drug effects on forebrain c-fos activation. *Neuroscience* 2001; 104: 717–30.

24. Neophytou SI, Graham M, Williams J, Aspley S, Marsden CA, Beckett SR. Strain differences to the effects of aversive frequency ultrasound on behaviour and brain topography of c-fos expression in the rat. *Brain Res* 2000; 854: 158–64.
25. Nestler EJ. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol Learn Mem* 2002; 78: 637–47.
26. Ryabinin A. Role of hippocampus in alcohol-induced memory impairment: implications from behavioral and immediate early gene studies. *Psychopharmacology* 1998; 139: 34–43.
27. Ryabinin AE, Wang YM, Freeman P, Risinger FO. Selective effects of alcohol drinking on restraint-induced expression of immediate early genes in mouse brain. *Alcoholism Clinical Exp Res* 1999; 23: 1272–80.
28. Robertson GS, Fibiger HC. Neuroleptics increase c-fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine. *Neuroscience* 1992; 46: 315–28.
29. Torres G, Horowitz J, Laflamme N, Rivest S. Fluoxetine induces the transcription of genes encoding c-fos, corticotropin-releasing factor and its type 1 receptor in rat brain. *Neuroscience* 1998; 87: 463–77.
30. Schulman H, Hyman E. Intracellular signalling. W: Zigmond MJ, Bloom FE, Ladnis SC, Roberts JL, Squire LR, red. *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Academic Press USA; 1999: 269–316.
31. Singewald N, Sharp T. Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. *Neuroscience* 2000; 98: 759–70.
32. Ziólkowska B, Przewłocki R. Methods used in inducible transcription factor studies: focus on mRNA. W: Kaczmarek L, Robertson HJ, red. *Handbook of chemical neuroanatomy. Immediate early genes and inducible transcription factors in mapping of the central nervous system function and dysfunction*. Elsevier Science BV; V 19, 2002: 1–38.

*Adres: Dr Ewa Taracha, Zakład Neurochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii,
ul. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa, tel. (22) 3213319, fax: 3213471, e-mail: taracha@ipin.edu.pl*