

© М. Ю. Зенько, Е. А. Рыбникова, Т. С. Глущенко, 2014
УДК 612.273.2:616.831-008.615:599.323.4

М. Ю. Зенько¹, Е. А. Рыбникова² и Т. С. Глущенко¹

ЭКСПРЕССИЯ НЕЙРОТРОФИНА BDNF В ГИППОКАМПЕ И НЕОКОРТЕКСЕ У КРЫС ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ПОСТСТРЕССОВОГО ТРЕВОЖНОГО СОСТОЯНИЯ И ЕГО КОРРЕКЦИИ ГИПОКСИЧЕСКИМ ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЕМ

¹ Лаборатория регуляции функций нейронов мозга (зав. — проф. М. О. Самойлов); ² лаборатория нейроэндокринологии (зав. — д-р биол. наук Н. Э. Ордян), Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Методом количественной иммуногистохимии исследованы изменения экспрессии нейротрофина BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) в гиппокампе и неокортексе 24 крыс-самцов линии Вистар при развитии у них постстрессорного тревожного состояния в экспериментальной модели посттравматического стрессового расстройства и его коррекции гипоксическим посткондиционированием (ПостК). Для индукции тревожного состояния применяли воздействие комбинированным психоэмоциональным стрессом (иммобилизационный стресс, вынужденное плавание, эфирный стресс и через 7 сут — повторная иммобилизация — рестресс). Коррекцию тревожного состояния у крыс проводили путем применения гипоксического ПостК — воздействия тремя сеансами умеренной гипобарической гипоксии (360 мм рт. ст., 2 ч). Установлено, что формирование тревожного состояния сопровождается значительной редуцией содержания иммунореактивного BDNF в дорсальном (CA1) и вентральном (зубчатая извилина) гиппокампе и неокортексе, а гипоксическое ПостК приводит к частичному (гиппокамп) или полному (неокортекс) восстановлению экспрессии BDNF. Результаты свидетельствуют о том, что нейротрофические факторы, в частности BDNF, очевидно, играют важную роль в патогенезе тревожно-депрессивных расстройств и реализации проадаптивного и нейропротективного действия гипоксического ПостК.

Ключевые слова: гиппокамп, неокортекс, посттравматическое стрессовое расстройство, BDNF, гипоксическое посткондиционирование

Нейротрофин BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) играет важную роль в росте, развитии и функционировании нейронов мозга, их выживаемости, нейрональной пластичности [8]. Кроме того, BDNF вовлекается в регуляцию таких важнейших процессов, как обучение, память, реакция на стресс [9, 11]. Имеются также сведения о возможной роли BDNF в развитии и лечении патологических состояний тревожно-депрессивного характера [3], однако этот вопрос исследован недостаточно. В связи с нарастающей распространенностью тревожно-депрессивных расстройств и достаточной эффективностью фармакотерапии имеющимися антидепрессантами очевидна необходимость уточнения патогенетических механизмов этих заболеваний и разработки новых, в том числе немедикаментозных способов, их коррекции. Одним из таких новых эффективных способов является гипоксическое посткондиционирование (ПостК) [1], обладающее мощным анксиолитическим свойством и корректирующее формирование тревожного состояния. Молекулярные механизмы гипоксического ПостК

до настоящего времени практически не изучены, и их исследование также актуально. В связи с этим изучение возможного участия нейротрофина BDNF как в формировании тревожных патологических состояний, так и в их коррекции гипоксическим ПостК и являлось целью настоящей работы.

Материал и методы. Методом количественной иммуногистохимии были исследованы изменения экспрессии BDNF в гиппокампе и неокортексе крыс при развитии тревожного состояния в модели посттравматического стрессового расстройства (ПТСР), а также после применения ПостК гипобарической (высотной) гипоксией, оказывающего анксиолитическое действие. Работа выполнена на 24 самцах крыс линии Вистар с массой тела 200–230 г. При проведении экспериментов были соблюдены требования, сформулированные в приказе Министерства высшего образования СССР № 724 (1984) «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», а также директивах Совета Европейского Сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Для индукции тревожного состояния у крыс использовали экспериментальную модель ПТСР «стресс — рестресс» [6]. Животных подвергали иммобилизационному стрессу (120 мин), вынужденному плаванию (20 мин) и после

Сведения об авторах:

Зенько Михаил Юрьевич (e-mail: zenkomichail@mail.ru), *Глущенко Татьяна Сергеевна* (e-mail: anoxia@pavlov.infran.ru), лаборатория регуляции функций нейронов мозга; *Рыбникова Елена Александровна* (e-mail: rybnikova1@rambler.ru), лаборатория нейроэндокринологии, Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

15 мин перерыва воздействию эфиром до обездвиженности. Через 7 сут животных подвергали рестрессу (30 мин иммобилизации), что приводило к формированию у них тревожного состояния. С целью коррекции последнего применяли гипоксическое ПостК по оригинальной схеме, ранее доказавшей свою эффективность [1]. ПостК осуществляли путем 3-кратной экспозиции умеренной гипобарической гипоксии (360 мм рт. ст., 2 ч) в барокамере проточного типа с 24-часовым интервалом, в первые 3 сут после рестресса. Крысы были разделены на следующие группы (в каждой группе по 6 животных): ПТСР — животные, подвергнутые «стрессу — рестрессу»; ПТСР—ПостК — животные, подвергнутые «стрессу — рестрессу» с последующей коррекцией патологии гипоксическим ПостК; контроль — интактные животные; контроль-Р — крысы, подвергнутые только рестрессу. Поскольку рестресс является слабым непатогенным стрессом у животных, не переживших травматический стресс, то группа контроль-Р включена в исследование в качестве образца адаптивного (а не патологического, как у группы ПТСР) ответа на рестресс. Животных декапитировали через 4 сут после рестресса. Мозг быстро извлекали, выделяли сегмент, включающий области гиппокампа с прилежащим париетальным неокортексом. Образцы фиксировали молекулярным фиксатором FineFIX (Milestone, Италия). Далее препараты подвергали стандартным процедурам промывки, обезжизивания, проведения через порции ксилола и заливали в парафин. Затем при помощи микротомы изготавливали серии срезов мозга во фронтальной плоскости толщиной 7 мкм. В полученных срезах методом количественной иммуногистохимии были исследованы изменения экспрессии BDNF в неокортексе, дорсальном (CA1) и вентральном (зубчатая извилина) гиппокампе. Для этого после процедур депарафинирования, регидратации и температурной демаскировки антигена срезы в течение ночи при 4 °С инкубировали с первичными поликлональными кроличьими антителами к BDNF (Santa Cruz, США, разведение — 1:100), после чего использовали авидин-биотиновую систему детекции (Vector Laboratories, Inc, Великобритания) и визуализацию диаминобензидином. Количественный анализ иммунореактивности нейронов проводили с использованием системы анализа микроизображений, состоящей из светового микроскопа Olympus CX31RBSF (Optical systems, Германия), цифровой камеры ProgResCT1 (Jenoptik, Германия) и компьютера с программным обеспечением ВидеоТест Морфология 5.2 (ВидеоТест, Россия). Подсчитывали число иммунореактивных клеток в поле CA1 гиппокампа и зубчатой извилины (на участке длиной 400 мкм) и в неокортексе (на участке размером 350×400 мкм) на уровне –2,80 мм от брегмы. Оценку статистической значимости полученных данных проводили по U-критерию Манна—Уитни (Statistica7.0, Stat-Soft Inc.). Различия между выборками считали значимыми при $P \leq 0,05$. Все результаты по экспериментальным группам представлены в виде среднего арифметического \pm SEM (standard error of the mean).

Результаты исследования. Воздействие патогенным стрессом (группа ПТСР) приводило к значительному снижению иммунореактивности, что проявлялось отчетливым уменьшением интенсивности иммуногистохимической реакции в гиппокампе и неокортексе (рис. 1, в, ж) по сравнению с аналогичными областями у контрольных крыс (см. рис. 1, а, д).

Количественный анализ показал, что как в вентральном (зубчатая извилина — рис. 2, а), так и в дорсальном (CA1 — см. рис. 2, б) гиппокампе, а также неокортексе (см. рис. 2, в) число BDNF-иммунопозитивных клеток в группе ПТСР значительно снизилось на 60–70%. В группе слабострессированных животных (контроль-Р) значимых отличий от контроля не выявлено ни при качественной оценке (см. рис. 1, б, е), ни при количественном анализе (см. рис. 2). В группе ПТСР—ПостК (ПостК после «стресса—рестресса») отмечено увеличение количества BDNF-иммунопозитивных клеток (см. рис. 1, г, з), значительно отличающееся от показателей в группе ПТСР в зубчатой извилине и неокортексе, причем в неокортексе количество этих клеток достигает контрольных показателей (см. рис. 2).

Обсуждение полученных данных. ПТСР — это одно из наиболее распространенных тревожно-депрессивных заболеваний. Оно характеризуется резким повышением тревожности и полным расстройством адаптации. Насколько известно в настоящее время, важную роль в патогенезе данного заболевания играют нарушения экспрессии различных генов и их продуктов в нейронах мозга, одним из которых и является нейротрофин BDNF. У пациентов с ПТСР было описано снижение экспрессии мРНК BDNF в гиппокампе [5, 11]. С этим согласуются полученные в нашей работе данные о снижении содержания белка BDNF в гиппокампе и неокортексе при формировании модельного аналога ПТСР у крыс. В отличие от остальных нейротрофинов, для BDNF показано значительное влияние на синаптическую передачу, участие в формировании долговременной потенциации, а также установлена зависимость его экспрессии и секреции от нейрональной активности [7]. Связывание BDNF с рецептором (TrkB^{FL}) приводит к активации сигнального пути фосфолипазы $\text{C}\gamma$, PI-3-киназного и Akt-киназного путей, MEK-МАРК (митоген-активирующаяся протеинкиназа) сигнального пути [12]. МАРК-опосредованное фосфорилирование везикулярного белка синапсина регулирует пресинаптический выброс глутамата и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) [2]. Таким образом, уменьшение содержания BDNF, наблюдаемое при ПТСР, может приводить к снижению выброса этих двух медиаторов. В случае с тормозным медиатором, ГАМК, это может приводить к снижению активности рецепторов ГАМК-А и, следовательно, повышению тревожности, характерной для ПТСР и других расстройств этой группы [10]. Кроме того, известно, что у пациентов с ПТСР развивается атрофия гиппокампа, предположительно,

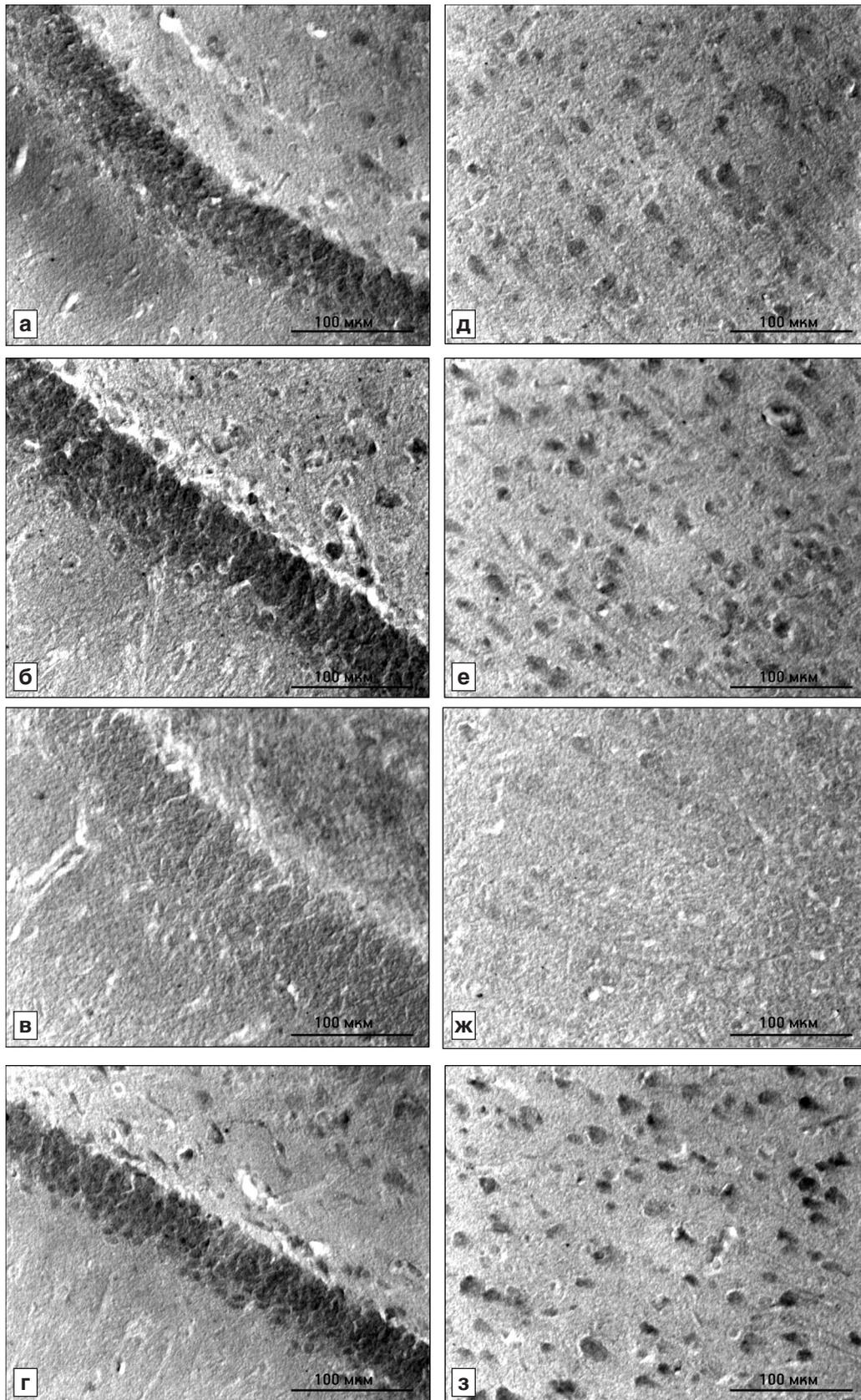


Рис. 1. Зубчатая извилина (а–г) и неокортекс (д–з) у крыс после моделирования посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) и ПТСР и применения посткондиционирования (ПостК) гипербарической гипоксией.
 а, д — контроль (интактные животные); б, е — контроль-Р (крысы, подвергнутые только рестрессу); в, ж — ПТСР; г, з — ПТСР и ПостК. Иммуногистохимическая реакция на нейротрофин BDNF

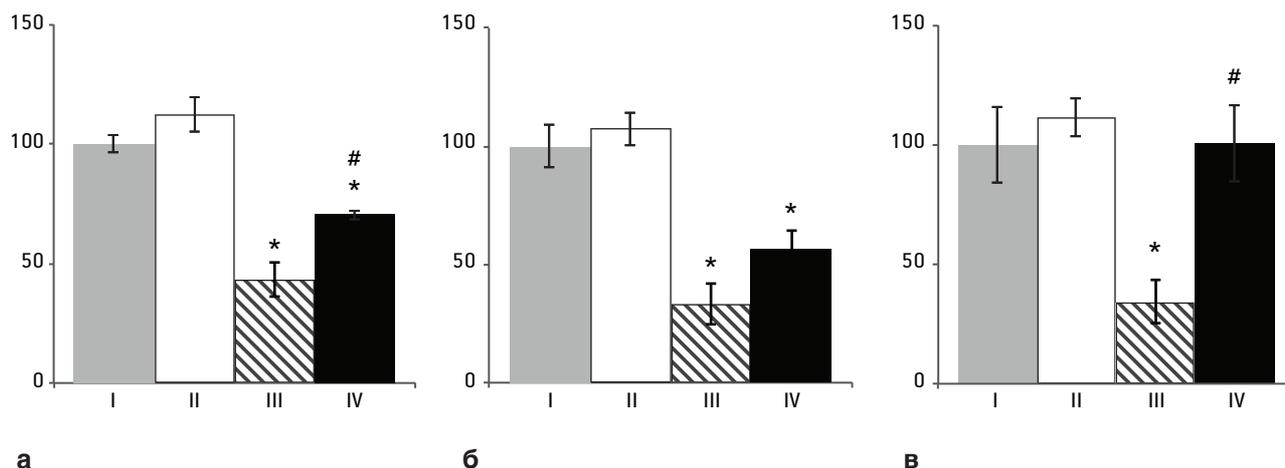


Рис. 2. Доля BDNF-иммунопозитивных клеток у крыс в зубчатой извилине (а), СА1 (б) гиппокампа и неокортексе (в).

По оси абсцисс: группы крыс — I — интактные животные (контрольная группа); II — контрольная группа P — крысы, подвергнутые только рестрессу; III — после моделирования посттравматического стрессового расстройства (ПТСР); IV — ПТСР и применение посткондиционирования (ПостК) гипербарической гипоксией; по оси ординат — доля клеток (%) по сравнению с контролем, принятым за 100. * Значимые отличия от показателей в контрольной группе; # значимые различия ПТСР—ПостК от ПТСР при $P \leq 0,05$

вследствие токсического действия глюкокортикоидов, высокое содержание которых достигается в условиях патогенного стресса [13]. Это может быть обусловлено и пониженным содержанием BDNF, следствием чего является снижение резистентности нейронов гиппокампа к повреждающим факторам и их потенциала нейропластичности [4]. Результаты настоящей работы позволяют предполагать, что снижение экспрессии BDNF в гиппокампе и неокортексе является важным патогенетическим механизмом ПТСР, о чем свидетельствуют данные, полученные нами на ПостК-животных. Установлено, что протективный эффект ПостК в модели ПТСР сопровождается стимуляцией экспрессии BDNF, приводящей либо к частичному (гиппокамп), либо к полному (неокортекс) восстановлению содержания данного нейротрофина, значительно редуцированного при ПТСР. Вероятно, это способствует стимуляции процессов нейропластичности в данных уязвимых образованиях мозга, а также нормализует нарушенный выброс медиаторов, что компенсирует негативные последствия патогенного стресса. Таким образом, в настоящей работе в экспериментальных моделях на крысах установлено, что редукция содержания BDNF в гиппокампе и неокортексе сопровождается формированием постстрессорной тревожной патологии, а терапевтический и анксиолитический эффект гипоксического ПостК связан со стимуляцией экспрессии данного нейротрофического фактора в уязвимых структурах мозга.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-00532.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рыбникова Е. А., Воробьев М. Г. и Самойлов М. О. Гипоксическое посткондиционирование корректирует нарушения поведения крыс в модели посттравматического стрессового расстройства. Журн. высш. нервн. деят., 2012, т. 62, № 3, с. 364–371.
2. Blum R. and Konnerth A. Neurotrophin-Mediated Rapid Signaling in the Central Nervous System: Mechanisms and Functions. Physiology, 2005, v. 20, p. 70–78.
3. Bremner J., Randall P., Scott T. et al. MRI-based measurement of hippocampal volume in combat-related posttraumatic stress disorder. Am. J. Psychiatry, 1995, v. 152, p. 973–981.
4. D'Sa C., and Duman R. Antidepressants and neuroplasticity. Bipolar Disord., 2002, v. 4, p. 183–194.
5. Kozlovsky N., Matar M., Kaplan Z. et al. Long-term down-regulation of BDNF mRNA in rat hippocampal CA1 subregion correlates with PTSD-like behavioural stress response. Int. J. Neuropsychopharm., 2007, v. 10, p. 741–758.
6. Liberzon I., Krstov M. and Young E. A. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. Psychoneuroendocrinology, 1997, v. 22, № 6, p. 443–453.
7. Martinowich K. and Lu B. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. Neuropsychopharmacology, 2008, v. 33, p. 73–83.
8. Mattson M. P. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. Ann. NY Acad. Sci., 2008, v. 1144, p. 97–112.
9. Mu J. S., Li W. P., Yao Z. B. and Zhou X. F. Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. Brain Res., 1999, v. 835, p. 259–265.
10. Nemeroff C. B. The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. Psychopharmacol. Bull., 2003, v. 37, № 4, p. 133–146.
11. Rasmusson A. M., Shi L. and Duman R. Downregulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues

- previously associated with footshock. *Neuropsychopharmacology*, 2002, v. 27, № 2, p. 133–142.
12. Rose C.R., Blum R., Kafitz K.W. et al. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *BioEssays*, 2004, v. 26, p. 1185–1194.
13. Yehuda R. Hypothalamic-pituitary-adrenal alterations in PTSD: are they relevant to understanding cortisol alterations in cancer? *Brain Behav. Immun.*, 2003, v. 1, p. 73–83.

Поступила в редакцию 28.02.2014

**EXPRESSION OF BDNF NEUROTROPHIN
IN THE HIPPOCAMPUS AND NEOCORTEX
OF RATS DURING THE DEVELOPMENT
OF POST-STRESS ANXIETY
AND ITS CORRECTION BY HYPOXIC
POSTCONDITIONING**

M.Yu.Zen'ko, Ye.A.Rybnikova and T.S.Glushchenko

Using quantitative immunohistochemistry, changes in the expression of the BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) were studied in the hippocampus and neocortex of 24 male Wistar rats during the development of post-stress-related anxiety state in

the experimental model of posttraumatic stress disorder, and its correction by hypoxic postconditioning (PC). For the induction of anxiety state, combined severe psychoemotional stress was applied (immobilization, forced swimming, ether stress followed 7 days later by repeated immobilization — restress). Correction of the anxiety state was achieved by application of hypoxic PC, which included three sessions of mild hypobaric hypoxia (360 mm Hg, 2 h, daily). The formation of the anxiety pathology was accompanied by a significant reduction in the expression of immunoreactive BDNF in dorsal (CA1) and ventral (dentate gyrus) hippocampus and neocortex, while hypoxic PC resulted in partial (hippocampus) or complete (neocortex) restoration of BDNF expression. The results indicate that the neurotrophic factors, and BDNF in particular, seem to play an important role in the pathogenesis of the anxiety-depressive disorders as well as in mechanisms of proadaptive and neuroprotective effects of hypoxic PC.

Key words: *hippocampus, neocortex, post-traumatic stress disorder, BDNF, hypoxic postconditioning*

Laboratory of Regulation of Brain Neuron Functions;
Laboratory of Neuroendocrinology, RAS I.P.Pavlov Institute of
Physiology, St. Petersburg