

БАРАНОВА
КСЕНИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В МОЗГЕ КРЫС
ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНЫХ СОСТОЯНИЙ
И РЕАЛИЗАЦИИ АНТИДЕПРЕССИВНЫХ ЭФФЕКТОВ
ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ**

Специальность 03.03.01 – физиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2013

Работа выполнена в лаборатории регуляции функций нейронов мозга
ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук
Рыбникова Елена Александровна
в.н.с. лаборатории нейроэндокринологии

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Журавин Игорь Александрович
ФГБУН Институт эволюционной физиологии и
биохимии им. И.М. Сеченова РАН
зав. лабораторией сравнительной физиологии и
патологии центральной нервной системы

доктор медицинских наук, профессор
Клименко Виктор Матвеевич
ФГБУ НИИ экспериментальной медицины СЗО
РАМН
зав. лабораторией нейробиологии интегративных
функций мозга

Ведущая организация: ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и
нейрофизиологии РАН, Москва

Защита диссертации состоится « 3 » июня 2013 г. в 11 часов на заседании Диссертационного
совета по защите докторских и кандидатских диссертаций (Д 002.020.01) при ФГБУН
Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им. И.П. Павлова
РАН.

Автореферат разослан « » _____ 2013 г.

Учёный секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук

Н.Э. Ордян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ Одной из фундаментальных проблем нейробиологии и медицины является исследование адаптивных и патологических реакций нейронов мозга на влияния внешней среды, особенно при действии повреждающих факторов. Выяснение молекулярно-клеточных механизмов таких реакций необходимо для разработки новых эффективных способов повышения резистентности мозга к повреждающим воздействиям.

Резко возросшее в последние десятилетия количество жертв чрезвычайных ситуаций, боевых и противоправных действий, серьёзных конфликтов в обществе и микросоциуме привело к увеличению распространённости тревожно-депрессивных расстройств, представляющих собой большую группу заболеваний, включающую различные формы депрессий и другие постстрессовые патологии. Согласно данным ВОЗ, эта группа заболеваний занимает первое место в мире среди психических расстройств. Но, несмотря на широкую распространённость, и высокий интерес исследователей к этой проблеме, механизмы патогенеза постстрессовых тревожно-депрессивных состояний остаются во многом непознанными и, как следствие, относительно неэффективной оказывается современная фармакотерапия таких расстройств. Литературные данные свидетельствуют о том, что развитие тревожно-депрессивных состояний сопровождается нарушениями молекулярно-клеточных и гормон-зависимых механизмов регуляции адаптивных функций организма. Весьма вероятно, что в основе патогенеза данных расстройств лежит дисрегуляция активации транскрипционных факторов, приводящая к нарушениям индукции контролируемых ими ранних генов и, далее, продуктов поздних генов, в частности кодирующих медиаторы, нейрогормоны, гормоны и их рецепторы (Vaidya, Duman, 2001; Gourley et al., 2008). Изучение механизмов патогенеза этих состояний и разработка новых технологий лечения невозможны без преклинических исследований, проводимых в экспериментальных моделях на лабораторных животных.

В настоящее время эффективным способом повышения резистентности мозга к повреждающим воздействиям является применение гипоксического прекодиционирования – предъявление умеренных экстремальных воздействий, направленное на мобилизацию эндогенных эволюционно приобретенных генетически-детерминированных защитных механизмов (Самойлов, 1999; Самойлов и др., 2004; 2012; Самойлов, Рыбникова, 2012). Наиболее распространенный вид прекодиционирования – гипоксическое/ишемическое было впервые использовано на сердце в 1986 году (Murry et al., 1986). На современном этапе в значительной мере раскрыты механизмы кардиопротективных эффектов ишемического прекодиционирования миокарда, что способствовало внедрению данного способа в медицинскую практику (Rezkalla, Kloner, 2007; Ратманова, 2008). Эндогенные механизмы толерантности мозга, индуцируемые ишемическим и, в особенности, гипоксическим

прекондиционированием (ГП), исследованы в меньшей степени. Показано вовлечение внутриклеточных сигнальных каскадов, глутаматных рецепторов, антиапоптотических белков и пептидных антиоксидантов в механизмы повышения резистентности нейронов мозга к гипоксии, индуцируемого ишемическим/гипоксическим прекодиционированием (Самойлов и др., 2001-2012; Rybnikova et al., 2002-2012; Semenov et al., 2002; Sharp et al., 2004; Строев, Самойлов, 2004; Obrenovitch, 2008). Установлено, что ключевая роль в индукции нейропротективных процессов при применении ГП принадлежит кооперативной активации транскрипционных факторов (Самойлов, Рыбникова, 2012).

Недавно было обнаружено, что ГП повышает устойчивость мозга и организма в целом не только к повреждающим воздействиям гипоксической природы, но и психоэмоциональным стрессам, предотвращая формирование постстрессовых тревожно-депрессивных расстройств (Рыбникова и др., 2006; 2007; 2008; Rybnikova et al., 2007). Однако, несмотря на описанное мощное антидепрессивное и анксиолитическое действие ГП, внедрение этого метода в медицинскую практику в качестве способа профилактики и коррекции постстрессовых патологий невозможно без достаточных сведений о механизмах его действия, среди которых очевидно важнейшую роль играют модификации активности генома (Рыбникова, 2010). Требуется последовательное и комплексное изучение геном-зависимых механизмов антидепрессивных эффектов ГП на различных уровнях, начиная от активности транскрипционных факторов и до экспрессии регулируемых ими генов и их продуктов. В этом отношении ГП представляет собой не только перспективный с практической точки зрения немедикаментозный способ, но и удобную экспериментальную модель для фундаментальных исследований эндогенных нейропротективных процессов и механизмов их индукции.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей экспрессии активационных, индуцибельных и лиганд-зависимых транскрипционных факторов в образованиях мозга, вовлекаемых в патогенез постстрессовых расстройств, при формировании экспериментальных тревожно-депрессивных состояний и их коррекции гипоксическим прекодиционированием у крыс. Основные задачи исследования:

1. Изучить экспрессию активационных транскрипционных факторов pCREB и NF-κB(p65) в гиппокампе, неокортексе, гипоталамусе крыс при развитии депрессивноподобного состояния «выученной беспомощности» (модель эндогенной депрессии) и тревожного состояния (модель посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) «стресс-рестресс»).

2. Выявить особенности постстрессовой активации CREB и NF-κB(p65) у прекодиционированных умеренной гипобарической гипоксией животных, у которых тревожно-депрессивные состояния не формируются.

3. Оценить динамику экспрессии индуцибельных транскрипционных факторов c-Fos, HIF-1α и NGFI-A в гиппокампе, неокортексе, гипоталамусе крыс в ответ на воздействие

патогенным стрессом в моделях депрессии и ПТСР. Провести сравнительное исследование паттернов индукции этих факторов у непрекондиционированных и прекондиционированных животных.

4. Охарактеризовать участие лиганд-зависимых транскрипционных факторов – глюкокортикоидных (GR) и минералокортикоидных (MR) рецепторов гиппокампа, неокортекса и гипоталамуса крыс в механизмах развития модельной депрессии и ПТСР, а также их коррекции гипоксическим прекондиционированием.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. Пространственный паттерн нарушений экспрессии транскрипционных факторов в мозге специфичен для различных форм тревожно-депрессивной патологии у крыс. При формировании депрессивноподобного состояния, наиболее выраженные модификации экспрессии исследуемых транскрипционных факторов наблюдаются в гиппокампе, в то время как при развитии тревожного расстройства-аналога ПТСР наибольшие изменения локализуются в неокортексе и паравентрикулярном ядре гипоталамуса.

2. Недостаточная активация факторов CREB и NF-κB(p65), отсроченная сверхэкспрессия c-Fos и HIF-1α и снижение уровня GR в исследованных образованиях мозга в условиях патогенного стресса является общим компонентом развития постстрессовых тревожно-депрессивных расстройств.

3. Механизмы антидепрессивного и анксиолитического эффектов гипоксического прекондиционирования в моделях тревожно-депрессивных расстройств включают активацию CREB и NF-κB (p65), повышение уровня GR, нивелирование отсроченной сверхэкспрессии c-Fos и HIF-1α и усиление стресс-индуцированной экспрессии NGFI-A в исследованных образованиях мозга.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ. В работе впервые установлено наличие общих и специфических молекулярно-клеточных механизмов эндогенной депрессии и реактивного тревожно-депрессивного состояния (ПТСР). В экспериментальных моделях «выученная беспомощность» и «стресс-рестресс» впервые выявлены как аналогичные, так и индивидуальные для каждой патологии нарушения экспрессии транскрипционных факторов CREB, NF-κB, c-Fos, NGFI-A, HIF-1α, GR и MR. Показано, что к общим закономерностям при депрессии и ПТСР относится недостаточная активация CREB и NF-κB, отсроченная сверхэкспрессия факторов c-Fos и HIF-1α и редукция содержания GR в ответ на стрессорные воздействия.

Впервые получены данные о различном вкладе гипоталамуса, неокортекса и гиппокампа в генез постстрессовых тревожных и депрессивных состояний. Показано преимущественное вовлечение модификаций активности транскрипционных факторов дорзального гиппокампа в формирование депрессивноподобного состояния у крыс в модели «выученная беспомощность»,

в то время как в модели ПТСР наиболее выраженные изменения выявлены во II слое неокортекса и паравентрикулярном ядре гипоталамуса.

Впервые проведен сравнительный анализ стероид-рецептор-опосредованных механизмов формирования различных постстрессовых состояний, продемонстрировавший наличие особенностей в нарушениях стероид-рецептирующих функций отделов мозга крыс при индукции модельной депрессии и ПТСР. При развитии депрессивноподобного состояния у животных обнаружено значительное и устойчивое снижение содержания глюкокортикоидных рецепторов во всех исследованных областях мозга. При индукции экспериментального ПТСР у крыс не выявлено существенных изменений рецепторного пула на экстрагипоталамическом уровне, однако в паравентрикулярном ядре гипоталамуса происходило снижение уровня GR.

Впервые в значительной мере раскрыты нейрональные молекулярные механизмы, лежащие в основе антидепрессивного и анксиолитического эффектов ГП у крыс. Установлено, что индуцируемые ГП протективные процессы в моделях тревожно-депрессивных расстройств связаны с вовлечением транскрипционных факторов различных семейств. В частности, прекондиционирующее воздействие способствует активации транскрипционных факторов CREB и NF- κ B, и нивелирует патологическую отсроченную экспрессию индуцибельных факторов c-Fos и HIF-1 α вслед за патогенным стрессом. Кроме того, прекондиционирование предотвращает нарушения гормон-зависимых механизмов регуляции адаптивных функций организма путем стимуляции экспрессии GR в гиппокампе в ответ на тяжелый психоэмоциональный стресс, и в паравентрикулярном ядре гипоталамуса - в ответ на травматический стресс, а также модификации соотношения GR и MR.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ Работа посвящена исследованию фундаментальной проблемы нейробиологии, связанной с расшифровкой молекулярных механизмов адаптивных и патологических реакций нейронов мозга. Полученные результаты расширяют современные представления о роли транскрипционных факторов в патогенезе эндогенного и реактивного постстрессового тревожно-депрессивного расстройства. Важное теоретическое значение для понимания механизмов патогенеза тревожно-депрессивных состояний имеет основной вывод работы, сформулированный на основании полученных экспериментальных сведений и постулирующий наличие как общих, так и специфических для разных форм тревожно-депрессивных расстройств нарушений экспрессии транскрипционных факторов, а следовательно, и механизмов формирования этих патологий.

Большая теоретическая значимость проведенного исследования также заключается в том, что удалось выявить особенности механизмов регуляции активности генома нервных клеток, посредством которых реализуется антидепрессивное и анксиолитическое действие ГП. Эти

сведения вносят существенный вклад в понимание нейрональных механизмов повышения адаптивных возможностей организма в условиях интенсивных стрессорных воздействий.

Практическая значимость работы определяется насущной необходимостью разработки эффективных способов профилактики и лечения стресс-индуцируемых патологий. Установленные в проведенном исследовании факты в значительной мере раскрывают механизмы антидепрессивного и анксиолитического действия ГП, что может способствовать внедрению этой новой эффективной немедикаментозной технологии в медицинскую практику с целью профилактики и лечения постстрессовых депрессивных и тревожных расстройств. С учетом выявленных в данной работе особенностей индуцируемых ГП эндогенных механизмов адаптации мозга и организма в целом к патогенным стрессам становится возможным в перспективе создание нового поколения фармакологических препаратов, оказывающих направленное действие не на общие, а на определенные выявленные нейрхимические механизмы патогенеза различных форм тревожно-депрессивных расстройств.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ Результаты работы были представлены и обсуждены на Межинститутской конференции молодых ученых «Механизмы регуляции и взаимодействия физиологических систем организма человека и животных в процессах приспособления к условиям среды», посвященной 100-летию академика В.Н. Черниговского (Санкт-Петербург, 2007); Всероссийской конференции с международным участием «Нейрхимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург, 2008); Российско-Польском рабочем симпозиуме «Гипоксическое, ишемическое прекондиционирование мозга», посвященном 50-летию юбилею сотрудничества Польской и Российской Академии Наук в рамках Дней Польской науки в России (Санкт-Петербург, 2008); Двенадцатой Всероссийской медико-биологической конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2009); Конференции молодых ученых «Механизмы адаптации физиологических систем организма к факторам среды», посвященной 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, 2010); I и II Всероссийских научных конференциях молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2010 и 2012); VII и VIII Международных междисциплинарных конгрессах «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, Украина, 2011 и 2012); XIV Международном совещании и VII школе по эволюционной физиологии, посвященным памяти академика Л.А. Орбели (Санкт-Петербург, 2011); Всероссийской молодежной конференции–школе «Нейробиология интегративных функций мозга», посвященной 120-летию создания Физиологического отдела под руководством И.П. Павлова в Императорском институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, 2011); III Конференции молодых ученых Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2012); Междисциплинарной конференции "Адаптационные стратегии живых

систем" (Новый Свет, Крым, Украина, 2012), а также на заседаниях Лаборатории регуляции функций нейронов мозга и Отдела физиологии и патологии высшей нервной деятельности Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (2007-2012).

СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения и выводов. Работа изложена на 172 страницах, иллюстрирована 44 рисунками и 4 таблицами. Список цитируемой литературы включает 439 источников. Основное содержание диссертации отражено в 19 публикациях (из них 7 научных статей в рецензируемых российских и зарубежных журналах и 12 тезисов).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 350 взрослых самцах крыс линии Вистар весом 200-250 г. Для выработки депрессивноподобного состояния в классической парадигме «выученной беспомощности» (ВБ) (Seligman, Beagley, 1975) крыс стимулировали асинхронными ударами электрическим током в замкнутом пространстве клетки в течение часа так, чтобы каждая крыса получила по 60 ударов током (1мА, 50 Гц) каждый длительностью 15 с. В результате у животных значительно редуцировалась двигательная и исследовательская активность в тесте «открытого поля», повышался уровень тревожности в приподнятом крестообразном лабиринте и уровень кортикостерона в крови, уменьшалось предпочтение сахарина (агедония), и происходило нарушение глюкокортикоидного торможения в дексаметазоновом тесте. Для индукции экспериментального аналога посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) у экспериментальных животных использовали модель «стресс – рестресс» (Liberzon et. al., 1997), которая включала тяжелый патогенный травматический стресс (2 часа иммобилизации, 20 минут вынужденного плавания, и, после 15-минутного перерыва, воздействие эфиром до потери сознания) и напоминающий рестресс (30-минутную иммобилизацию), являющийся триггером для развития тревожного патологического состояния. В результате у животных резко возрастал уровень тревожности в приподнятом крестообразном лабиринте, и наблюдались характерные для данного расстройства гормональные нарушения (повышение уровня кортикостерона в крови и включение «быстрой» глюкокортикоидной обратной связи).

С целью предотвращения формирования тревожно-депрессивных состояний у крыс использовали эффективный немедикаментозный способ - гипоксическое прекодиционирование (ГП) с применением сеансов умеренной гипобарической гипоксии (Рыбникова и др., 2010). ГП осуществляли в декомпрессионной барокамере проточного типа путем воздействия на крыс умеренной гипобарической гипоксией (давление - 360 мм рт. ст., содержание O₂ - 10%) трехкратно по 2 часа, с интервалом 24 часа. Через сутки после третьего сеанса гипоксии животные подвергались воздействию психоэмоционального или травматического стресса в

моделях депрессии и ПТСР. В этих условиях тревожно-депрессивные состояния у них не развивались.

Для Вестерн-блот анализа крыс контрольной и опытных групп декапитировали, выделяли участки ткани мозга из областей дорзального и вентрального гиппокампа, верхних и нижних слоёв неокортекса, паравентрикулярный гипоталамус и по отдельности гомогенизировали в лизирующем буфере для экстракции ядерных белков. Надосадочную жидкость отбирали после центрифугирования в течение 25 мин при 15000g. Концентрацию белка в экстрактах определяли спектрофотометрически по методу Брэдфорда-Лоури (Bradford, 1976), после чего экстракты нервной ткани, содержащие искомые транскрипционные факторы (ТФ), разделяли электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле (Laemmly, 1970), на трис-глициновом буфере (рН 8.3) в присутствии 0.1% SDS. Разделенные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану, используя, как и для фореа, аппарат Mini-PROTEAN Cell (Bio-Rad, USA), но в модификации для блоттинга. Мембраны последовательно инкубировали с поликлональными первичными антителами к ТФ pCREB, NF-κB(p65), NGFI-A, HIF-1α, c-Fos, глюко- и минералокортикоидным рецепторам (GR и MR) (разведение 1:500 - 1:1000) фирм Santa Cruz Biotechnology, USA; Abcam, UK; Calbiochem, Germany; Vector Laboratories, USA и вторичными (1:2000 - 1:10000), конъюгированными с пероксидазой хрена, антителами фирмы Dako, Germany. Визуализацию связавшихся антител на нитроцеллюлозе проводили хемилюминесцентным методом с использованием наборов ECL фирм MP, USA и Thermo, USA. Для детекции свечения экспонировали блот с рентгеновской пленкой Kodak, проявленные пленки сканировали, интенсивность окрашивания полос преципитации оценивали по оптической плотности.

Для получения гистологических препаратов животных декапитировали на 1-й, 5-й и 10-й дни после стрессирующей процедуры (ранний, промежуточный и отсроченный постстрессовый период, соответственно), извлекали мозг, выделяли области гиппокампа с прилежащим фронтопариетальным неокортексом и область гипоталамуса, фиксировали в молекулярном фиксаторе FineFix (Milestone, Italy) в течение 24-48 часов. Далее после стандартных процедур обезвоживания и заливки в парафиновую среду изготавливали срезы во фронтальной плоскости толщиной 7 мкм на уровне -2.80 мм от Bregma для изучения областей гиппокампа и неокортекса, и -1.80 мм от Bregma для областей гипоталамуса (Paxinos, Watson, 1986). Для морфологического анализа препараты окрашивали по методу Ниссля в водном 0.1% -растворе толуидинового синего. Для иммуногистохимической оценки содержания белков-ТФ в клетках различных областей мозга стрессированных (ВБ, ПТСР) и прекондиционированных перед стрессированием (ГПВБ, ГП ПТСР) крыс депарафинизированные срезы подвергали демаскировке в цитратном буфере, после чего инкубировали с первичными поликлональными антителами к NGFI-A, HIF-1α, pCREB, MR (Santa Cruz), к NF-κB(p65) и GR (Santa Cruz;

Calbiochem), к c-Fos (Abcam; Vector) в разведении 1:100 при +4°C в течение ночи. Далее срезы обрабатывали с использованием наборов для детекции фирмы Vector Labs, USA - авидин-биотиновой системы детекции Vectastain ABC Kit (включающей вторичные биотинилированные антитела, 1:200) и диаминобензидинового набора DAB Substrate Kit. Затем проводили количественную оценку содержания искомого белка на основании анализа иммунореактивности нейронов в гипоталамусе (крупноклеточное и мелкоклеточное паравентрикулярное ядро - кПВЯ, мПВЯ), неокортексе (II и V слои), дорзальном (область CA1) и вентральном (зубчатая извилина) гиппокампе крыс.

Используя световой микроскоп, цифровую камеру и компьютер с программным обеспечением ВидеоТест Мастер Морфология (ООО «Видео Тест», Санкт-Петербург), производили подсчет числа иммунопозитивных клеток на основании оценки оптической плотности, вычитая оптическую плотность фона при каждом измерении, и разделяли иммунопозитивные клетки на слабо- и интенсивно-иммунопозитивные. Данные обрабатывали, вычисляя среднюю арифметическую величину и стандартную ошибку среднего в исследуемых группах животных, сравнивали средние значения выборок. Статистическую обработку проводили средствами однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (Statistica 7.0, Statsoft Inc., USA), с достоверностью различий при $p < 0.05$. Все результаты и стандартные ошибки среднего выражены в процентах от среднего значения соответствующей контрольной группы, принятой за 100%. Результаты представлены в виде среднего арифметического значения, выраженного в процентах \pm стандартная ошибка среднего, выраженная в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологический анализ не выявил структурных повреждений или гибели нейронов ни в областях гиппокампа, ни в неокортексе через 1, 5 и 10 суток после предъявления стрессирующих воздействий.

Изменения активности ТФ CREB и NF- κ B(p65) в мозге крыс после стрессорного воздействия. Эффекты ГП. У особей, подвергшихся стрессированию, как в парадигме ВБ, так и в модели «стресс-рестресс», иммунореактивность к pCREB изменялась слабо, а уровни pCREB оставались сравнимыми с базальными показателями в контроле, либо редуцировались. ВБ стресс вызывал достоверное подавление активности CREB в зубчатой извилине гиппокампа (рис. 1.А), в неокортексе (рис. 1.Б) также выявлено снижение pCREB иммунореактивности у непрекондиционированных (неГП) крыс, особенно в отсроченный период (5-10 сутки). Индукция ПТСР сопровождается двукратным от контрольных показателей снижением интенсивность экспрессии pCREB на 5-10 сутки в V слое неокортекса (рис. 1.В). У прекондиционированных (ГП-) животных, у которых после стрессирования в парадигмах ВБ

или «стресс-рестресс» тревожно-депрессивные патологии не развивались, происходила мощная и устойчивая активация данного ТФ после стресса во всех исследованных образованиях мозга.

На предъявление стресса в парадигме ВБ крысы реагировали быстрым увеличением NF-κВ-иммунореактивности только в ядрах гипоталамуса (рис. 1.Д), активация имела двухволновый профиль – с максимумами на 1-е (до 1928%) и 10-е сутки. ГП выражено подавляло сверхактивацию NF-κВ в ответ на ВБ стресс, однако уровень иммунореактивного NF-κВ у ГП-животных оставался достоверно выше базального. В зубчатой извилине ГП-крыс, в отличие от неГП, ВБ индуцировала увеличение количества интенсивно иммунореактивных клеток уже на 1 сутки (в 3,5 раза), к 10 суткам количество иммунореактивных клеток возросло до 600% (рис. 1.Г). В ответ на непрекondиционированный травматический стресс экспрессия NF-κВ устойчиво редуцировалась в гиппокампе. ГП способствовало отчетливой ап-регуляции экспрессии данного фактора после рестресса в зубчатой извилине гиппокампа (240% -1 день, и 345% - 10 день относительно контроля, vs 33% и 70%, соответственно, у неГП животных) (рис.1.Е).

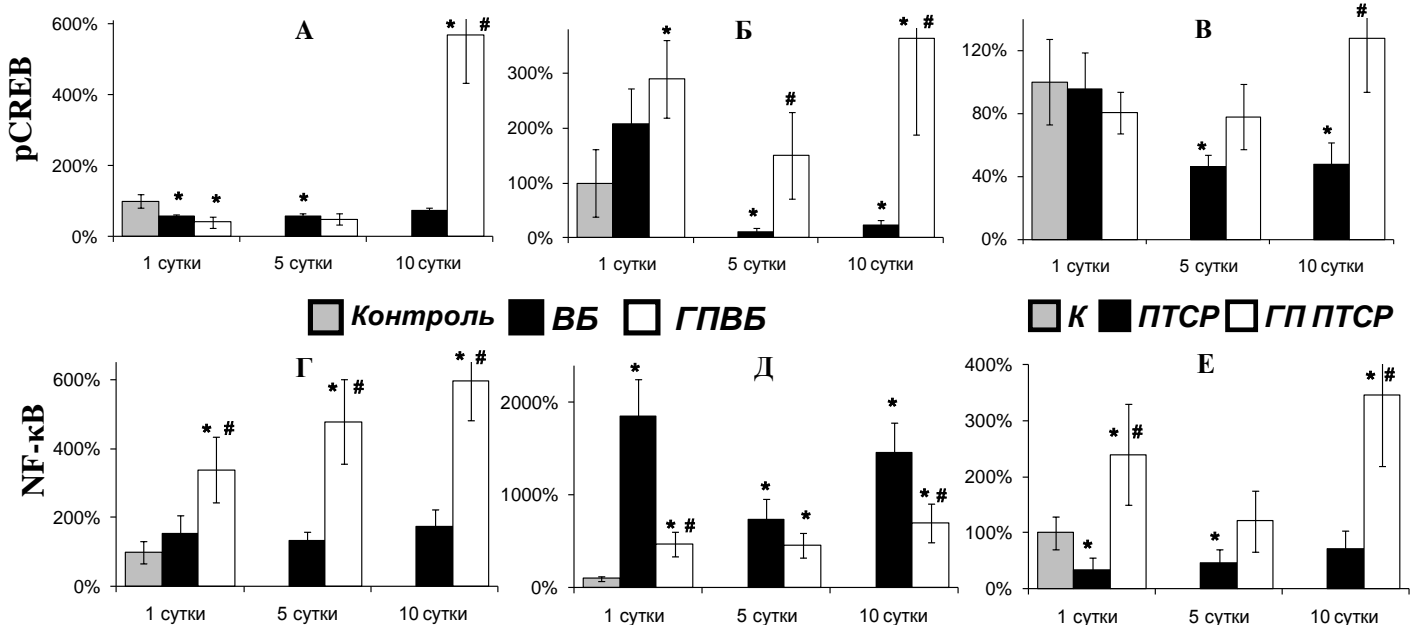


Рис. 1. Интенсивность экспрессии pCREB (А, Б, В) и NF-κB(p65) (Г, Д, Е) в мозге крыс в разные сроки после стрессирующего воздействия в парадигме ВБ (А, Б, Г, Д) и ПТСР (В, Е). А, Г и Е – зубчатая извилина гиппокампа; Б – II слой неокортекса; В – V слой неокортекса; Д – кПВЯ гипоталамуса. Здесь и далее: по оси абсцисс – дни после стресса; по оси ординат – количество интенсивно-иммунопозитивных клеток в % от значений контрольной группы. Серые столбики – контроль, 100% (n=8-12); черные столбики – непрекondиционированные крысы после стрессирования (n=6); белые столбики – прекondиционированные перед стрессированием животные (n=6). * - различия достоверны по отношению к контролю, # - достоверные различия относительно непрекondиционированной группы, $p \leq 0.05$.

В целом, базальные или сниженные уровни содержания активационных ТФ pCREB и NF-κВ при развитии патологий в рассмотренных моделях могут свидетельствовать о том, что недостаточная их активация может являться неспецифическим компонентом патогенеза как

депрессии, так и ПТСР. Ранее показано, что подавление активности этих ТФ на раннем сроке способствует повреждениям и гибели клеток мозга при действии тяжелой гипоксии и ишемии (Nagakura et al., 2002; Rybnikova et al., 2008). Отсроченное усиление экспрессии NF-κB, обнаруживаемое в гибнущих нейронах гиппокампа и в инфарктной области через 3 суток после повреждающих воздействий, связывают с нейродегенерацией (Schneider et al., 1999; Botchkina et al., 1999). Так как в случае тяжелых форм психоэмоционального стресса в рассмотренный период нами не было обнаружено гибели нейронов, то отсутствие значительных изменений в содержании NF-κB в этих условиях может являться подтверждением гипотезы о том, что участие этого ТФ в патологических реакциях в мозге связано в основном с процессами гибели нейронов, но не их функциональными нарушениями при ВВ и ПТСР.

Хорошо известна роль ТФ CREB и NF-κB в адаптивных реакциях нейронов мозга при повреждающих воздействиях. При ишемическом прекондиционировании показана мощная и поддерживаемая активация CREB, увеличение ДНК-связывающей активности и транслокации в ядро NF-κB, ингибирование их активации подавляет толерантность, индуцируемую прекондиционированием (Blondeau et al., 2001; Lee et al., 2004; Rybnikova et al., 2008). Интересно, что активация этих ТФ, аналогичная обнаруженной нами при ГП, неоднократно описана и в клинике у больных депрессией, прошедших курс успешной терапии антидепрессантами (Kato et al., 2006). Поэтому есть основания предполагать, что ап-регуляция CREB и NF-κB является неспецифическим антидепрессивным механизмом и обеспечивает коррекцию патогенетического процесса, как при использовании фармакологических препаратов, так и при действии немедикаментозных способов. Таким образом, устойчивая активация ТФ CREB и NF-κB может быть важным фактором формирования неспецифической долговременной толерантности мозга, что, вероятно, связано с активацией их про-адаптивных генов-мишеней. В частности, pCREB активирует гены пептидных антиоксидантов, MAPK/ERK, антиапоптотических белков, нейротрофических факторов, модифицирует экспрессию c-Fos, NGFI-A, GR в гиппокампе и неокортексе в ответ на повреждающие воздействия (Hata et al., 1998; Meller et al., 2005; Chiueh et al., 2005). Многие NF-κB-зависимые гены и их продукты (антиоксиданты, нейротрофины, цитокины, ингибиторы апоптоза, белки ранних генов) также являются нейропротективными. Увеличение его экспрессии опосредует действие эритропоэтина, NGF, IGF-1, предохраняет нейроны от апоптоза, индуцируемого оксидативным стрессом, эксайтотоксическими повреждениями, ишемией (Beg et al., 1995; Keller et al., 1998; Furukawa, Mattson, 1998; Mattson et al., 2000).

Экспрессия ранних генов в мозге крыс при развитии тревожно-депрессивных состояний: эффект ГП. Патогенный стресс в обеих парадигмах вызывал повышение уровня иммунореактивности к продуктам ранних генов - фактору c-Fos и индуцибельной субъединице NIF-1α в нейронах всех исследованных областей мозга крыс, причем в модели ПТСР этот

эффект был значительно более сильным чем в модели депрессивной патологии. При этом общее число с-Fos- и HIF-1 α -позитивных клеток изменялось относительно незначительно, однако интенсивность экспрессии возрастала достоверно и устойчиво, особенно в отсроченный период. Так в нейронах зубчатой извилины гиппокампа почти 5-кратное повышение экспрессии с-Fos выявлялось уже в ранний период (1 сутки) после ВБ или ПТСП стресса и сохранялось в течение 10 дней (рис. 2.А, Г). Пролонгированная сверхэкспрессия была отмечена и в неокортексе, однако в парадигме ВБ с меньшей, чем в гиппокампе амплитудой реакции (рис. 2.Б), а в парадигме ПТСП интенсивность экспрессии с-Fos более чем в 20 раз превышала контрольный уровень (рис. 2.Б, Д). Отсроченная оверэкспрессия с-Fos в ответ на стрессирование характерна и для гипоталамуса, в частности, в мПВЯ ВБ стресс приводил к росту числа интенсивно-иммунопозитивных клеток на 1400% от контроля на отдаленном сроке (рис. 2.В), а ПТСП стресс – на 2725% (рис. 2.Е). Аналогичная индукция отсроченной экспрессии в ответ на воздействие патогенного стресса выявлена для фактора HIF-1 α .

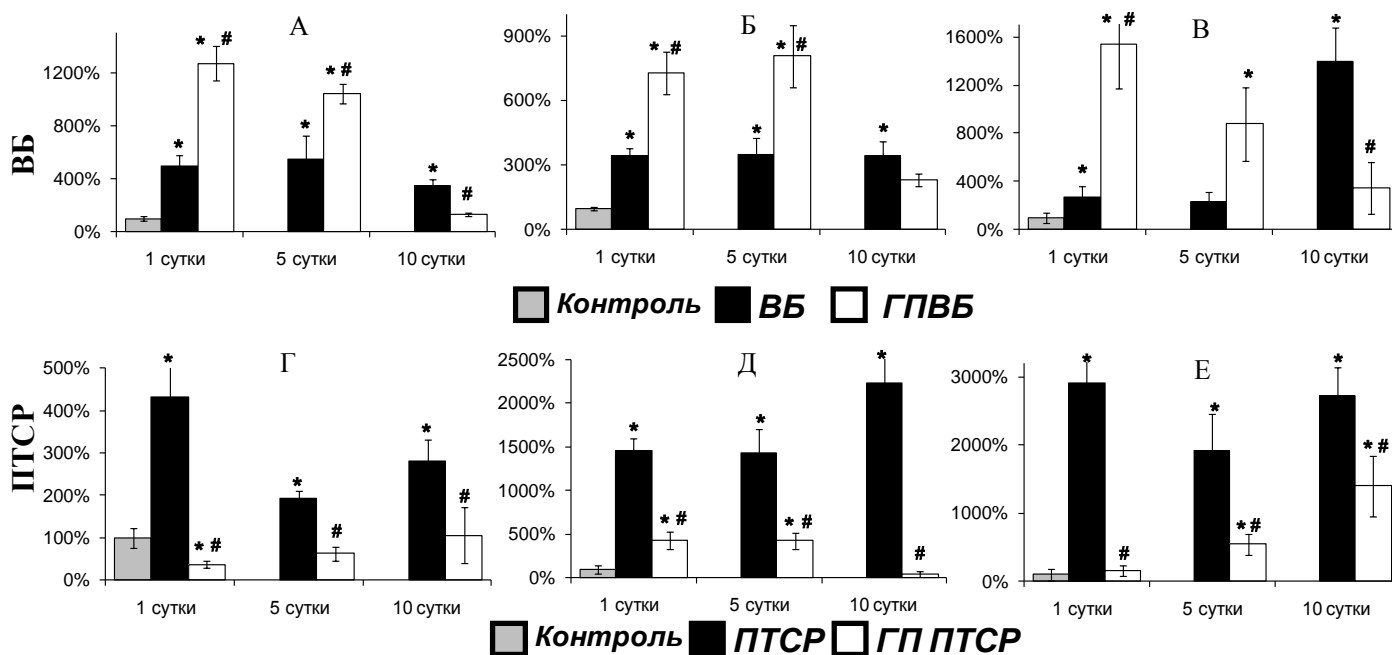


Рис. 2. Динамика экспрессии с-Fos в мозге не- и прекодицированных крыс на разных сроках после стрессующего воздействия в парадигме ВБ (А, Б, В) и ПТСП (Г, Д, Е). А, Г – зубчатая извилина гиппокампа; Б – V слой неокортекса; Д – II слой неокортекса; В, Е – мПВЯ гипоталамуса. Обозначения как на рис. 1.

Антидепрессивный эффект прекодицирования умеренной гипоксией сопровождался значительной модификацией паттерна экспрессии с-Fos и HIF-1 α в мозге крыс. ГП нивелировало или в значительной степени предотвращало патологическую отсроченную стресс-индуцированную оверэкспрессию этих факторов в исследованных образованиях мозга вслед за ВБ и ПТСП стрессом. Очевидно, это является общим для обеих патологий протективным механизмом, активируемым ГП. В ранние периоды (1-5 дней) в гиппокампе, неокортексе и гипоталамусе ГП-животных после неизбежной электростимуляции в парадигме ВБ

наблюдалось резкое увеличение амплитуды экспрессии данных ТФ (рис. 2.А, Б, В), а у прекондиционированных крыс подвергшихся ПТСР стрессу, наоборот, ранняя волна экспрессии факторов *c-Fos* (рис. 2.Г, Д, Е) и *HIF-1 α* полностью нивелировалась. Такая разнонаправленность ГП-индуцированных изменений может свидетельствовать о направленном воздействии ГП на ключевые звенья патогенеза, специфичные для каждой патологии. В модели ВБ (однократный интенсивный стресс) вызываемая ГП потенциация первой волны экспрессии ранних генов - компонент нормальной реакции на тяжелый стресс, активирующий про-адаптивные гены-мишени. В модели ПТСР травматический стресс приводит к формированию патологической сверхреактивности на слабый рестресс – происходит неадекватная слабому стрессору сверхэкспрессия ранних генов. У ГП-животных не возникало сверхреактивности на рестресс и, соответственно, предотвращалась сверхиндукция *c-Fos* и *HIF-1 α* , биологически нецелесообразная при действии слабого непатогенного стрессора.

Таким образом, в ходе развития тревожно-депрессивных состояний выявлено нарушение волновой динамики индукции *c-Fos* и *HIF-1 α* , заключавшееся в специфической отсроченной сверхэкспрессии этих ТФ, которую в литературе связывают с развитием патологических процессов (Woodburn et al., 1993; Syljuåsen et al., 1996; Rybnikova et al., 2007). Похожая картина обнаружена при исследовании повреждающего воздействия тяжелой гипоксией. Оно также приводило к отсроченной экспрессии *HIF-1 α* . Вместе с тем у ГП животных тяжелая гипоксия вызывала лишь умеренную активацию гена *hif-1 α* , которая быстро нивелировалась (Рыбникова, 2010). Очевидно, отсроченная экспрессия *HIF-1 α* связана с развитием патологических состояний (как постгипоксического, так и постстрессорного), а нивелирование этой отсроченной индукции является важным звеном нейропротективных механизмов, активируемых ГП.

При обоих патологических состояниях наибольшая амплитуда экспрессии фактора *c-Fos* зарегистрирована в отсроченный период в мПВЯ гипоталамуса – главном нейросекреторном центре регуляции активности гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС), в котором *c-Fos* регулирует продукцию нейrogормона кортиколиберина (КЛ) - ключевого активатора этой системы (Vale et al., 1981; Pace et al., 2009). Вероятно, отсроченная сверхэкспрессия *c-Fos* может быть ответственна за нарушения механизмов продукции КЛ, ингибирование GR (Pfahl, 1993; Heck et al., 1994) и связанный с этим дисбаланс ГГАС, характерный для ВБ и ПТСР. ГП, редуцируя отсроченную экспрессию *c-Fos*, предотвращает вызываемую этим фактором гиперпродукцию КЛ и последующую дисфункцию ГГАС. В проявление антидепрессивных эффектов ГП, связанных с регуляцией ГГАС, вносит вклад и *HIF-1 α* , для которого установлено участие в регуляции транскрипции GR (Leonard et al., 2005). Можно предположить, что резкое ГП-вызванное увеличение содержания *HIF-1 α* гиппокампе

(максимальное в зубчатой извилине) в ранние сроки после ВБ стресса, вызывает увеличение экспрессии GR и способствует нормализации обратной связи у ГП животных.

Среди ранних генов *NGFI-A* занимает особое место, поскольку его пролонгированная экспрессия ассоциируется преимущественно с адаптивными и нейропротективными реакциями, формированием долгосрочной памяти (Senba, Ueyama, 1997; Sharp et al., 2004; Katche et al., 2012). После неизбежного стресса в парадигме ВБ в гиппокампе крыс достоверно повышалось количество *NGFI-A*-иммунопозитивных клеток, интенсивность экспрессии была максимальна в 1 сутки после стресса (рис. 3.А, Б). В дорзальном гиппокампе крыс с ПТСП значимых изменений не выявлено (рис. 3.Г). Воздействие ГП в обеих экспериментальных моделях в основном существенно усиливает и пролонгирует (до 10 суток) постстрессорную экспрессию *NGFI-A* в гиппокампе (рис. 3.Б, Г), за исключением области СА1 у ГПВБ животных, где ГП предотвращало ап-регуляцию *NGFI-A* (рис. 3.А).

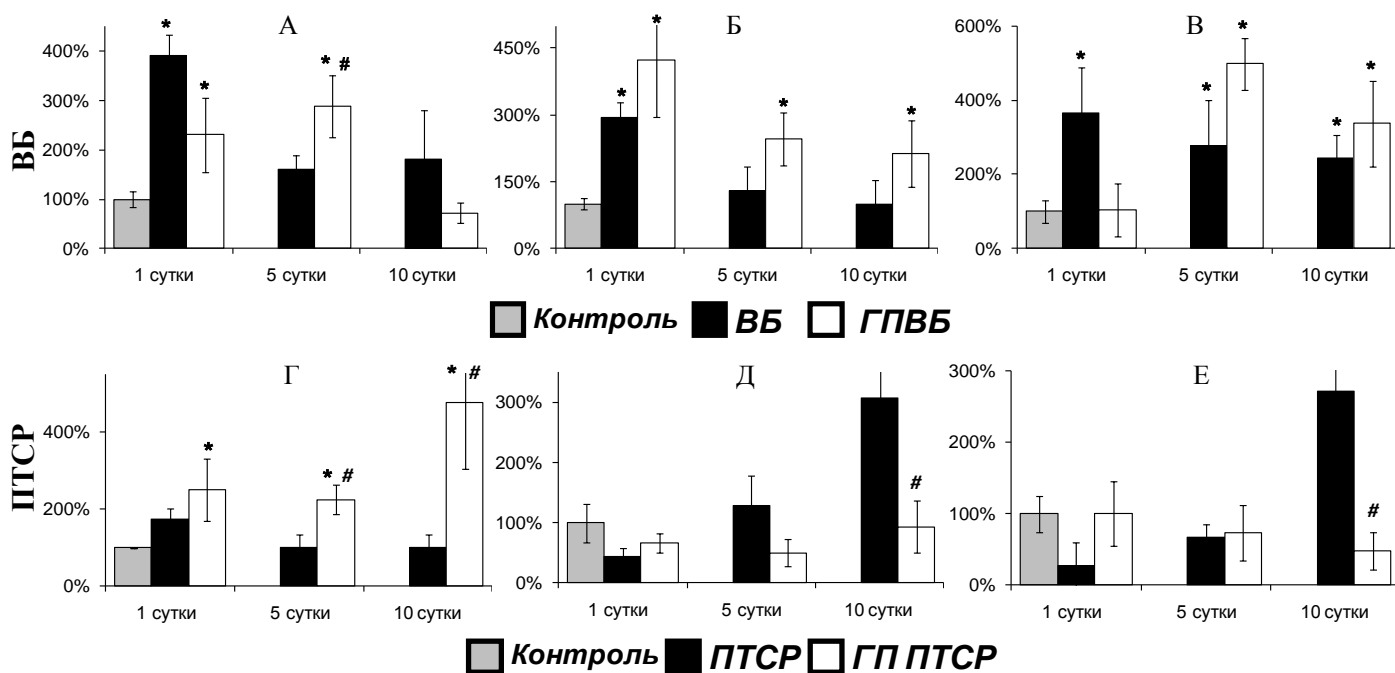


Рис. 3. Динамика экспрессии *NGFI-A* в мозге не- и прекондиционированных крыс на разных сроках после стрессорирующего воздействия в парадигме ВБ (А, Б, В) и ПТСП (Г, Д, Е). А, Г – СА1 гиппокампа; Б – зубчатая извилина гиппокампа; В, Д – кПВЯ гипоталамуса; Е – мПВЯ гипоталамуса. Обозначения как на рис. 1.

В обеих исследуемых областях гипоталамуса после ПТСП-стресса наблюдалось постепенное нарастание интенсивности экспрессии *NGFI-A* к 10 суткам, когда число интенсивно-иммунопозитивных нейронов в 3 раза превосходило таковое в контроле (рис. 3.Д, Е). После ВБ-стресса отмечено устойчивое повышение экспрессии (до 364%) лишь в кПВЯ гипоталамуса (рис. 3.В). В гипоталамусе ГП ПТСП крыс интенсивность экспрессии *NGFI-A* нормализовалась на всех сроках исследования (рис. 3.Д, Е), а у ГПВБ крыс лишь на ранних сроках (рис. 3.В). Умеренная экспрессия *NGFI-A* в неокортексе выявляется при формировании обоих тревожно-депрессивных состояний, что вероятно отражает неспецифическую индукцию

этого раннего гена в ответ на действие стрессора, так как не зависит от его интенсивности и модальности, и, кроме того, в данной структуре этот эффект не изменяется при применении ГП.

В то же время следует полагать, что степень индукции NGFI-A в гиппокампе соотносится со спецификой и интенсивностью стрессора, поскольку тяжелый ВБ-стресс отчетливо индуцировал NGFI-A, а более слабый рестресс в модели ПТСР к повышению экспрессии NGFI-A не приводил. Возможно, что в модели ВБ, основанной на применении электростимуляции, стойкая ап-регуляция NGFI-A в CA1 поле гиппокампа связана с обработкой болевых стимулов, поскольку имеются сведения, что в нейронах поля CA1 NGFI-A усиливает синаптическую потенциацию возбуждающих глутаматергических синапсов, играющих важную роль в хранении болевой информации (Wei et al., 2000). Это косвенно подтверждается и в наших исследованиях в модели ПТСР, где предъявляемый рестресс не является болевым раздражителем, и индукция NGFI-A в гиппокампе в этом случае не обнаруживается, а также в исследованиях воздействия повреждающей гипоксии, не являющейся болевым стимулом, и не вызывающей индукцию NGFI-A в CA1 (Рыбникова и др., 2004). С другой стороны, быстрое затухание постстрессорной экспрессии NGFI-A в зубчатой извилине в ходе развития ВБ также может носить дезадаптивный характер, способствуя недостаточности стероид-рецептирующей функции этой структуры, за счет дефицита GR - мишени NGFI-A. С этим предположением согласуется тот факт, что протективный эффект ГП в данной модели сопровождался стимуляцией устойчивой экспрессии NGFI-A в этой области мозга, активно вовлекающейся в глюкокортикоидную обратную связь.

Нейроэндокринные механизмы анксиолитического эффекта ГП в моделях ПТСР и ВБ: экспрессия кортикостероидных рецепторов. У контрольных животных выявлен достаточно высокий уровень иммунореактивности к GR во всех исследованных областях мозга. Воздействие ВБ стресса приводило к резкой и выраженной редукции GR-иммунореактивности в гиппокампе, неокортексе и гипоталамусе неГП крыс на всех сроках исследования (рис. 4.А, Б, В). Максимально значимое снижение интенсивности экспрессии GR после ВБ было отмечено в вентральном гиппокампе, где практически не выявлялось интенсивно-иммунопозитивных к GR нейронов (рис. 4.А). Предварительное воздействие ГП не только предотвращало редукцию GR в ответ на ВБ-стресс (рис. 4.Б, В), но и способствовало устойчивой постстрессовой сверхэкспрессии (до 807%) GR в образованиях мозга, вовлекаемых в нейроэндокринную регуляцию стрессорных реакций (рис. 4.А).

Патогенный «стресс-рестресс» оказывал подавляющий эффект на уровень GR-иммунореактивности лишь в ПВЯ гипоталамуса, при этом на 5 сутки после рестресса интенсивно-иммунопозитивных клеток не обнаруживалось ни в кПВЯ (рис. 4.Е), ни в мПВЯ. В отличие от ВБ, в модели ПТСР в гиппокампе не выявлено значимых отличий от контрольных значений по интенсивности экспрессии GR (рис. 4.Г). В то же время в неокортексе стрессированных крыс количество интенсивно-иммунопозитивных нейронов транзиторно

возрастало на промежуточных этапах (максимально на 79%), однако в отдаленный период достоверно не отличалось от исходных значений (рис. 4.В). ГП оказывало стимулирующий эффект на экспрессию GR в ответ на ПТСР-стресс. В частности, происходило умеренное возрастание числа интенсивно экспрессирующих GR нейронов в гиппокампе (рис. 4.Г), и резкий подъем интенсивности экспрессии GR в гипоталамусе ГП ПТСР животных на ранних сроках после рестресса (622%) с постепенным снижением до контрольного к отдаленным срокам (рис. 4.Е).

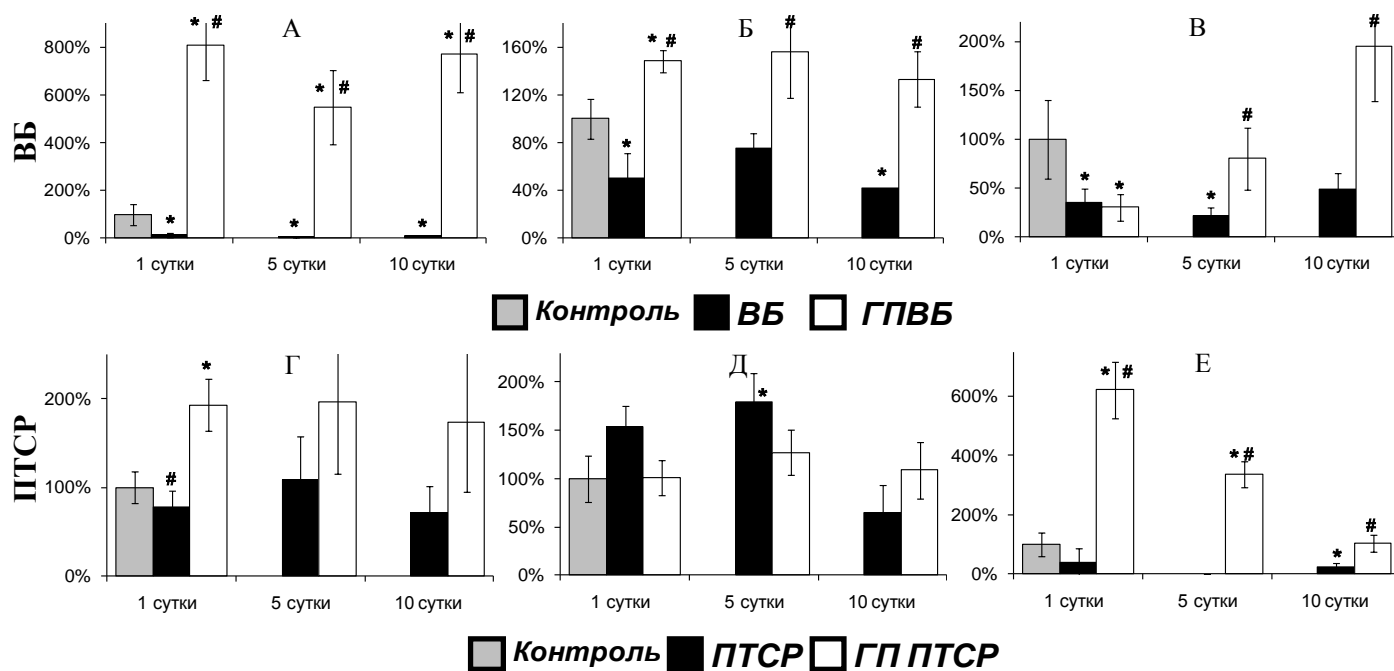


Рис. 4. Динамика экспрессии GR в мозге не- и прекондиционированных крыс на разных сроках после стрессующего воздействия в парадигме ВБ (А, Б, В) и ПТСР (Г, Д, Е). А, Г – зубчатая извилина гиппокампа; Б, Д – II слой неокортекса; В, Е – кПВЯ гипоталамуса. Обозначения как на рис. 1.

Относительно MR показано, что развитие тревожно-депрессивных патологий не сопровождается выраженными изменениями уровня MR в исследуемых структурах мозга. Для ВБ обнаружена тенденция к незначительному увеличению интенсивности экспрессии в ранний постстрессовый период, а для ПТСР напротив к постстрессорному снижению уровня MR в исследованных образованиях мозга. Применение ГП в обоих случаях дает противоположный паттерн – сопровождается падением содержания MR на 1 сутки после стрессирования у ГПВБ животных, и незначительной индукцией экспрессии MR у ГП ПТСР животных.

Известно, что в основе торможения ГГАС по принципу отрицательной обратной связи (ООС) лежит взаимодействие глюкокортикоидных гормонов крови с рецепторами гиппокампа и других структур, и нарушение этого торможения приводит к устойчивой гиперактивации ГГАС, что сопровождается развитием депрессивных расстройств (Tichomirowa et al., 2005). Выявленная в данной работе недостаточность рецепторного пула не только в гипоталамусе, где замыкается ультракороткая петля ООС, но и в вышележащих регуляторных отделах мозга свидетельствует о

нарушениях в работе всех уровней регуляции ГГАС (как короткой, так и длинной петлей ООС) и может являться одним из ключевых моментов патогенеза депрессий. Вероятно, с обнаруженным при ВБ значительным снижением GR в ГГАС-регулирующих структурах и связана гиперсекреция гормона кортизола и нарушения ООС ГГАС, характерные для данной патологии. Кортизол, в свою очередь, вызывает резкое снижение активности серотонинергической системы, редукцию 5HT₁ рецепторов, оказывает влияние на ферменты деградации моноаминов, возбуждает дофамин- и глутаматергическую системы. Показано влияние его высокого уровня на норадренергическую систему, при длительном воздействии он может вызывать нейродегенеративные процессы в гиппокампе, снижение адаптационных способностей нейронов (Reul et al., 1991; Dinan, 1994; Sapolsky, 2000). При формировании депрессивной патологии на фоне значительного снижения числа GR обнаружена тенденция к незначительному усилению экспрессии MR, в этом случае в условном соотношении GR/MR преобладающими оказываются MR. Дисбаланс в сторону MR особенно выражен в зубчатой извилине гиппокампа. Как известно, MR, помимо тонического ингибирования ГГАС, участвуют в первичных стрессорных реакциях (Haller et al., 2000; Karst, Joëls, 2003; Joëls et al., 2012).

У ГПВБ крыс обнаруживалось резкое и устойчивое повышение GR-иммунореактивности в гиппокампе (особенно в зубчатой извилине), и при этом наблюдалась ядерная локализация GR. Таким образом, ГП, вероятно, запускает синтез необходимых для включения ООС и связывания избыточного при ВБ гормона GR. Очевидно, что в данном случае GR является активным ТФ, регулирующим транскрипцию генов-мишеней, в том числе ТФ (HIF-1 α), нейрогомонов КЛ и вазопрессина, антиоксидантов (Kodama et al., 2003). GR также взаимодействует с ТФ HIF-1, NF- κ B и AP-1, регулируя их активность (Leonard et al., 2005; Derijk, de Kloet, 2008). Очевидно, что существенное усиление экспрессии GR в зубчатой извилине имеет принципиальное значение для нормализации функций ГГАС, нарушенных именно при данной патологии. Длительность выявленных изменений (сверхэкспрессия GR в зубчатой извилине), вероятно, связана с хорошо изученными медленными эффектами глюкокортикоидов – они сводятся к подавлению первичного стрессорного ответа, предотвращая его сверхактивацию (Munck et al., 1984). Важность выявленных модификаций содержания рецепторов вентрального гиппокампа для предотвращения эффектов ВБ косвенно подтверждается тем, что в дорзальном гиппокампе, напротив, изменения гораздо менее выражены и весьма сходны с таковыми при ГП ПТСР. Это в свою очередь, позволяет предположить, что в области CA1 ГП-индуцированное возрастание интенсивности экспрессии обоих типов (GR и MR) рецепторов в 1,5 – 2 раза и поддержание соотношения GR:MR на уровне 1:1 – является универсальным для ВБ и ПТСР протективным механизмом.

Специфической характеристикой ПТСР является сочетание повышенной стрессореактивности с включением быстрого глюкокортикоидного торможения ГГАС

(патологическая сенситизация ООС) (Yehuda, Antelman, 1993; Рыбникова и др., 2010). Обнаруженное при ПТСР снижение содержания GR в ПВЯ гипоталамуса, возможно, свидетельствует об ослаблении гипоталамической ультракороткой петли обратной связи. Можно предположить, что быстрая ООС реализуется за счет негеномного действия глюкокортикоидов, связанного с их взаимодействиями на уровне мембран (Stahn, Buttgerit, 2008). В последнем случае сенситизация этих механизмов, вероятно, достигается путем патологического увеличения пула мембранных GR.

ГП способствует повышению экспрессии GR в экстрагипоталамических структурах в модели ПТСР, однако, в меньшей степени, чем при ГПВБ. При этом не выявлено различий в содержании GR между дорзальным и вентральным гиппокампом. Очевидно, это свидетельствует о том, что роль гиппокампальных GR в специфической компенсации нейроэндокринной дисрегуляции ГГАС при данной патологии незначительная. Значительное усиление экспрессии GR после применения ГП выявлено лишь в ПВЯ гипоталамуса, причем как в мелко- так и в крупноклеточном ядре, что, возможно, связано с нормализацией ООС ГГАС, а также с другими аспектами геномного действия глюкокортикоидов.

В заключение следует отметить, что в рамках настоящей работы впервые проведено детальное изучение процессов, происходящих на первом регуляторном уровне геном-зависимых механизмов антидепрессивных и анксиолитических эффектов гипоксического прекондиционирования – уровне, связанном с активностью транскрипционных факторов, контролирующих функционирование генома нервных клеток. Проведенные исследования доказывают важную роль транскрипционных факторов в реализации антидепрессивного и анксиолитического действия гипоксического прекондиционирования, а полученные сведения вносят существенный вклад в понимание этих процессов. Наличие описанных выше общих и специфических особенностей активации CREB, NF- κ B (p65), c-Fos, HIF-1 α , NGFI-A, GR, и MR при развитии разных форм психопатологий и их коррекции прекондиционированием свидетельствуют о том, что в основе как патогенных, так и компенсаторных процессов лежат изменения активности генетического аппарата нейронов мозга, реализуемые специфическими факторами транскрипции.

ВЫВОДЫ

1. При формировании депрессивноподобного состояния в модели эндогенной депрессии и тревожного состояния в модели посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) у крыс обнаружены как схожие, так и специфические для каждого патологического состояния модификации экспрессии транскрипционных факторов CREB, NF- κ B(p65), c-Fos, NGFI-A, HIF-1 α , а также глюкокортикоидных рецепторов (GR) в гиппокампе, неокортексе и гипоталамусе.

2. При развитии депрессивноподобного состояния наблюдается снижение уровня фосфорилированного фактора CREB (pCREB) в зубчатой извилине гиппокампа и неокортексе. При индукции тревожного состояния иммунореактивность к pCREB снижена только в V слое неокортекса. Прекондиционирование умеренной гипобарической гипоксией стимулирует экспрессию pCREB в исследованных образованиях мозга в обеих экспериментальных моделях.

3. В модели эндогенной депрессии, но не ПТСР экспрессия транскрипционного фактора NF-κB(p65) устойчиво повышается в паравентрикулярном ядре гипоталамуса, в то время как в гиппокампе и неокортексе его активация не наблюдается при развитии обоих патологических состояний. Гипоксическое прекондиционирование оказывает стимулирующий эффект на экспрессию белка NF-κB(p65) в гиппокампе и неокортексе и подавляет его сверхэкспрессию в гипоталамусе.

4. В ответ на стрессорные воздействия в моделях депрессии и ПТСР наблюдается отсроченное возрастание экспрессии индуцибельных факторов c-Fos и HIF-1α во всех исследуемых областях мозга крыс. Прекондиционирование предотвращает отсроченное повышение уровней этих транскрипционных факторов, тогда как на ранних сроках после стресса модификации экспрессии c-Fos и HIF-1α зависят от модели стрессирования.

5. Умеренная стресс-индуцированная экспрессия NGFI-A в неокортексе и гипоталамусе выявляется при формировании обоих тревожно-депрессивных состояний. У животных с депрессивноподобным расстройством, в отличие от ПТСР, содержание NGFI-A повышается также в гиппокампе. Гипоксическое прекондиционирование в обеих экспериментальных моделях в различной степени усиливает стресс-индуцированную экспрессию NGFI-A в гиппокампе, частично или полностью предотвращает ее в гипоталамусе и не оказывает эффекта в неокортексе.

6. Стресс в модели депрессии вызывает выраженное и устойчивое снижение содержания глюкокортикоидных рецепторов во всех исследованных областях мозга крыс. Индукция экспериментального ПТСР снижает их уровень лишь в гипоталамусе. Гипоксическое прекондиционирование способствует нормализации уровня GR в неокортексе и гипоталамусе и повышает их экспрессию в гиппокампе в модели депрессии, в то время как в модели ПТСР выявлено усиление экспрессии GR в гиппокампе и в паравентрикулярном ядре гипоталамуса.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах

1. Rybnikova E., Gluschenko T., Tulkova E., Churilova A., Jaroshevich O., Baranova K., Samoilov M. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappa B in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia // J. Neurochem. - 2008. - V.106. - P.1450-1458.

2. Баранова К.А., Рыбникова Е.А., Миронова В.И., Самойлов М.О. Эффект гипоксического прекондиционирования на экспрессию транскрипционного фактора NGFI - А в мозге крыс после неизбежного стресса в модели «выученная беспомощность» // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - 2009. - Т.95, №4. - С.405-416. [Переведена: Baranova K.A., Rybnikova E.A., Mironova V.I., Samoilo M.O. Effects of Hypoxic Preconditioning on Expression of Transcription Factor NGFI-A in the Rat Brain after Unavoidable Stress in the “Learned Helplessness” Model // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2010. – V.40, №6. - P.693-700.]
3. Rybnikova E., Gluschenko T., Tulkova E., Baranova K., Samoilo M. Mild hypobaric hypoxia preconditioning up-regulates expression of transcription factors c-Fos and NGFI-A in rat neocortex and hippocampus // Neurosci. Res. - 2009. - V.65, №4. - P.360–366.
4. Баранова К.А., Миронова В.И., Рыбникова Е.А., Самойлов М.О. Особенности экспрессии транскрипционного фактора HIF-1 α в мозге крыс при формировании депрессивноподобного состояния и антидепрессивных эффектов гипоксического прекондиционирования // Нейрохимия. - 2010. – Т.27, №1. - С.40-46. [Переведена: Baranova K.A., Mironova V.I., Rybnikova E.A., Samoilo M.O. Characteristics of the Transcription Factor HIF-1 α Expression in the Rat Brain during the Development of a Depressive State and the Antidepressive Effects of Hypoxic Preconditioning // Neurochem. J. – 2010. – V.4, №1. - P.35–40.]
5. Баранова К.А., Рыбникова Е.А., Самойлов М.О. Участие транскрипционного фактора c-Fos в формировании протективного эффекта гипоксического прекондиционирования в модели посттравматического стрессового расстройства // Нейрохимия. - 2011. – Т.28, №4. – С.294-299. [Переведена: Baranova K.A., Rybnikova E.A., Samoilo M.O. Involvement of the Transcription Factor c-Fos in the Protective Effect of Hypoxic Preconditioning in a Model of Post-Traumatic Stress Disorder in Rats // Neurochem. J. – 2011. – V.5, №4. - P.257–262.]
6. Баранова К.А., Рыбникова Е.А., Самойлов М.О. Антидепрессивный эффект гипоксического прекондиционирования сопровождается модификацией экспрессии транскрипционного фактора c-fos в мозге крыс в ответ на неизбежный стресс // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 2011. – Т.152, №11. – С.495-498. [Переведена: Baranova K.A., Rybnikova E.A., Samoilo M.O. Antidepressant effect of hypoxic preconditioning is associated with modification of expression of transcription factor c-Fos in rat brain in response to unavoidable stress. // Bull. Exp. Biol. Med. – 2012. – M.152, №5. – P.564-567.]
7. Баранова К.А. Общие и специфические механизмы патогенеза тревожных и депрессивных расстройств в моделях на животных: роль транскрипционных факторов // Медицинский академический журнал. - 2012. - Т.12, №3. - С.35-37.

Тезисы докладов

8. Баранова К.А., Рыбникова Е.А., Миронова В.И. Гипоксическое прекондиционирование модифицирует экспрессию HIF-1 α в мозге крыс после неизбежного стресса // Материалы межинститутской конференции молодых ученых «Механизмы регуляции и взаимодействия физиологических систем организма человека и животных в процессах приспособления к условиям среды», посв. 100-летию акад. В.Н. Черниговского. - Санкт-Петербург, 2007. - С.14.
9. Баранова К.А., Миронова В.И., Рыбникова Е.А. Роль ранних генов в антидепрессивных эффектах гипоксического прекондиционирования у крыс // Материалы

конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» - Санкт-Петербург, 2008. - С.15.

10. Баранова К.А., Миронова В.И., Рыбникова Е.А. Исследование вовлечения ранних генов NGFI-A и c-Fos в антидепрессивные эффекты гипоксического прекондиционирования у крыс // Материалы Российско-Польского рабочего симпозиума «Гипоксическое, ишемическое прекондиционирование мозга». - Санкт-Петербург, 2008. - С.110-114.

11. Баранова К.А., Миронова В.И., Рыбникова Е.А. Гипоксическое прекондиционирование модифицирует экспрессию транскрипционных факторов в мозге крыс в ответ на неизбегаемый стресс // Материалы двенадцатой всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина». - Санкт-Петербург, 2009. - С.37.

12. Баранова К.А. Вовлечение индуцибельных транскрипционных факторов в формирование депрессивных патологий и антидепрессант-подобных эффектов гипоксического прекондиционирования // Материалы конференции молодых ученых «Механизмы адаптации физиологических систем организма к факторам среды», посвя 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. - Санкт-Петербург, 2010. - С.9-10.

13. Баранова К.А. Транскрипционный фактор CREB участвует в формировании постстрессовых патологий и антидепрессант-подобных эффектов гипоксического прекондиционирования // Материалы всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия». - Санкт-Петербург, 2010. - Медицинский академический журнал. - 2010. - Т.10, №5. - С.6.

14. Баранова К.А. Участие транскрипционных факторов в антидепрессивных эффектах гипоксического прекондиционирования // Материалы седьмого международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». - Судак, Крым, Украина, 2011. - С.80-81.

15. Баранова К.А., Рыбникова Е.А. Кортикостероидные рецепторы мозга вовлекаются в формирование постстрессовых патологий и протективных эффектов гипоксического прекондиционирования // Материалы XIV международного совещания по эволюционной физиологии, посв. памяти акад. Л.А. Орбели. - Санкт-Петербург, 2011. - С.25.

16. Баранова К.А. Экспрессия транскрипционных факторов в мозге крыс при развитии и предотвращении тревожно-депрессивных состояний // Материалы всероссийской молодежной конференции – школы «Нейробиология интегративных функций мозга», посв. 120-летию создания Физиологического отдела под руководством И.П. Павлова в Императорском институте экспериментальной медицины. - Санкт-Петербург, 2011. - Медицинский академический журнал. - 2011. - Т.11, Спецвыпуск. – С.11-12.

17. Баранова К.А. Транскрипционные факторы p-CREB, c-Fos и HIF-1 в мозге крыс участвуют в формировании тревожно-депрессивных состояний, а также в их предотвращении с помощью гипоксического прекондиционирования // Материалы конференции молодых ученых Института цитологии РАН. - Санкт-Петербург, 2012. - Цитология. - 2012. - Т.54, №4. - С.335-336.

18. Баранова К.А. Исследование роли активационных, индуцибельных и лиганд-зависимых транскрипционных факторов мозга в развитии и предотвращении тревожно-

депрессивных состояний // Материалы VIII международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». – Судак, Крым, Украина, 2012. – С.75-76.

19. Баранова К.А. Гипоксическое прекондиционирование предотвращает тревожно-депрессивное состояние в модели на крысах: роль транскрипционных факторов мозга // Материалы междисциплинарной конференции «Адаптационные стратегии живых систем». - Новый Свет, Крым, Украина, 2012. - С.9-10.