

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
ОБ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ
РАБОТЫ

**НЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТРЕСС-ПРОТЕКТИВНЫХ
ЭФФЕКТОВ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ**

Программа подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре

по направлению подготовки кадров высшей квалификации

06.06.01 Биологические науки

Специальность 03.03.01 - физиология

Аспирант: Зенько Михаил Юрьевич

Научный руководитель: Рыбникова Елена Александровна, доктор
биологических наук

Работа выполнена в лаборатории Регуляции функций нейронов мозга ИФ
РАН

Заведующий лабораторией: Рыбникова Елена Александровна, доктор
биологических наук

Допустить к представлению научного доклада 23 октября 2019 г.



Санкт-Петербург

2019

Оглавление	
Актуальность темы исследования.....	3
Цель и задачи исследования	4
Научная новизна	5
Теоретическая и практическая значимость	5
Материалы и методы.....	6
Основные результаты	10
Заключение.....	21
Выводы.....	22
Апробация работы	23
Список публикаций по теме научно-квалификационной работы.....	24
Список литературы	26

Актуальность темы исследования

Эффективность существующего медикаментозного лечения постстрессорных расстройств, в том числе тревожно-депрессивных заболеваний и стрессогенных язв желудка, является достаточно низкой. Кроме того, как известно, лекарственные препараты могут оказывать побочное действие, а также вызывать аллергические реакции. Вместе с тем, частота и интенсивность стрессорных факторов в жизни современного человека и, как следствие, распространенность вызываемых стрессом заболеваний неуклонно растет [Souery et al., 1999; Ravindran et al., 2010], поэтому уточнение патогенетических механизмов этих патологий и разработка новых, прежде всего немедикаментозных способов их коррекции, представляет собой актуальную проблему для биомедицинских исследований. В этом отношении перспективным подходом может стать применение так называемых «кондиционирующих» воздействий (пре- и посткондиционирования), уже доказавших свою протективную эффективность в кардиологии и неврологии. Прекондиционированием называется применение превентивных воздействий с целью повышения резистентности организма к вредным факторам, тогда как посткондиционирование (ПостК) - это предъявление кондиционирующих воздействий особям, уже пережившим тяжелое повреждающее воздействие. В связи с этим именно ПостК может применяться как терапевтическое средство, что и обуславливает более высокий инновационный потенциал данного подхода.

Как показали исследования, одним из перспективных методов ПостК является разработанное в Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН гипоксическое ПостК с применением трехкратной умеренной гипобарической гипоксии [патент № 2437164, 20.12.2011; Рыбникова, Воробьев, Самойлов, 2012]. Ранее данный режим умеренной гипобарической гипоксии убедительно зарекомендовал себя как технология

прекондиционирования, вызывающего формирование гипоксической/ишемической толерантности мозга и организма в целом. При этом оказалось, что одновременно со специфической резистентностью к факторам гипоксической природы, организм приобретает устойчивость к психоэмоциальному и травматическому стрессу, то есть наблюдается явление кросс—толерантности, или «перекрестной адаптации» по Ф. З. Меерсону [Меерсон, 1981; Зенько, Рыбникова, 2019]. Применение повторяющейся умеренной гипоксии не для профилактики, а для коррекции уже формирующихся стресс-индуцированных патологий является следующим логическим шагом развития этой технологии. Действительно, недавно в экспериментах было показано, что применение умеренной гипоксии не до, а после стресса (режим ПостК) оказывает выраженный стресс-протективный эффект [Зенько и др., 2018], что открывает новые терапевтические перспективы для применения данного способа и дает надежду на решение такой актуальной проблемы как повышение эффективности лечения постстрессорных расстройств в клинике. Однако внедрение гипоксического ПостК в медицинскую практику невозможно без детальных сведений об эффективности, безопасности и эндогенных механизмах, реализующих терапевтическое действие гипоксического ПостК, применяемого после действия психоэмоциональных стрессоров. Данные сведения на современном этапе отсутствуют, что и обусловливает актуальность настоящего исследования.

Цель и задачи исследования

Целью работы являлось изучение протективных эффектов и механизмов гипоксического ПостК в моделях экспериментального посттравматического стрессового расстройства, постстрессорной депрессии и стрессогенного ульцерогенеза у крыс.

Были поставлены следующие основные задачи исследования:

1. Провести сравнительную оценку протективной эффективности гипоксического ПостК в моделях трех постстрессорных патологий у крыс;
2. Изучить роль глюкокортикоидных гормонов и гипоксия-индукционного фактора HIF-1 в реализации стресс-протективного действия гипоксического ПостК;
3. Исследовать изменения иммунореактивности к глюкокортикоидным рецепторам (ГР), нейрогормону кортиколиберину (КЛ) и его рецепторам, нейротрофину BDNF в гиппокампе и неокортексе крыс при развитии экспериментальных патологий и их коррекции гипоксическим ПостК.

Научная новизна

В работе проведен сравнительный анализ стресс-протективного действия ПостК эпизодами умеренной гипобарической гипоксии в экспериментальных моделях посттравматического стрессового расстройства, депрессии и ульцерогенного стресса у крыс. Впервые показано, что гипоксическое ПостК одинаково эффективно корректирует развитие экспериментального ПТСР и депрессии, но его применение нецелесообразно по отношению к ульцерогенному стрессу.

Впервые установлено, что глюкокортикоидные гормоны, но не гипоксия-индукционный фактор HIF-1, играют ключевую роль в реализации стресс-протективного действия гипоксического ПостК. Выявлены также характерные модификации экспрессии КЛ, BDNF и ГР, вызываемые ПостК одновременно с коррекцией нарушений, индуцируемых психоэмоциональными стрессами.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные в работе сведения существенно расширяют современные знания о перекрестных эффектах адаптации к гипоксии и стрессам различной природы. В отличие от традиционных представлений о ключевой роли гипоксия-специфических механизмов в реализации эффектов любых форм

гипоксии, в работе показано, что стресс-протективное действие умеренной гипоксии связано не со специфическими гипоксическими механизмами, а с вовлечением главной гормональной системы стрессорного ответа – гипоталамо-гипофизарно-адренокортиkalной. Практическая значимость работы и ее актуальность состоит в раскрытии перспективности гипоксического посткондиционирования как способа немедикаментозной терапии распространенных психических заболеваний (депрессии, посттравматического стрессового расстройства). Кроме того, идентификация эндогенных механизмов, за счет активации которых гипоксическое ПостК подавляет развитие экспериментальных постстрессорных расстройств, открывает новые направления развития фармакологических терапевтических подходов. Установленная роль глюкокортикоидных гормонов позволяет разработать рекомендации по применению уже имеющихся стероидных препаратов в других целях, а именно – для коррекции тревожно-депрессивных расстройств.

Материалы и методы

Работа была выполнена на взрослых самцах лабораторных крыс *Rattus norvegicus* линии Wistar с массой тела 200-250 г из Биоколлекции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном чередовании суточной освещенности и с постоянным доступом к воде и пище.

Для индукции экспериментального аналога посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) у крыс была использована модель «травматический стресс – умеренный рестресс» [Liberzon, Krstov, Young, 1997]. Патогенным стрессом являются двухчасовая иммобилизации крыс в пеналах, 20-минутное вынужденное плавание, и ингаляция диэтилового эфира до состояния наркоза. Рестресс, триггер для развития ПТСР, является одной из составляющих травматического стресса и состоит из

тридцатиминутной иммобилизации, которая производится через 7 суток после травматического стресса.

В качестве экспериментальной модели эндогенной депрессии была использована классическая парадигма «выученной беспомощности» (ВБ) [Seligman, Beagley, 1975]. Для индукции экспериментального аналога депрессии у крыс неизбежаемый стресс создавался путем электрокожной стимуляции (1 мА, 1 Гц) в замкнутом пространстве установки с токопроводящим полом, с временным интервалом случайной длительности от 1 до 15 сек, 60 стимуляций (1 час). Воздействие неконтролируемого, аверсивного стрессора приводит к последующему развитию стойкого депрессивноподобного состояния, отмечаемого как на поведенческом, так и на гормональном/нейроэндокринном уровнях.

Модель экспериментального ульцерогенеза представляла собой 3-часовую иммобилизацию крыс в пеналах на холоде (10°C) [Filaretova, Bagaeva, Morozova, 2012]. Предварительно, за 24 часа, животных лишили доступа к пище, но не воде. После декапитации крыс производили количественную оценку повреждения слизистой оболочки желудка путем подсчета средней площади эрозий в группе, с использованием компьютерной программы ImageJ.

С целью коррекции патологий различных моделей применяли гипоксическое пре- и посткондиционирование (ПрeК/ПостК) по схеме, разработанной в нашей лаборатории [Рыбникова, Воробьев, Самойлов, 2012], путем трехкратной экспозицией умеренной гипобарической гипоксии (360 мм рт. ст., 2 ч) в барокамере проточного типа с 24-часовым интервалом. Конечное давление в 360 мм рт. ст. соответствует 5 километрам над уровнем моря.

Для изучения тревожности животных был применен поведенческий тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) [Pellow и др., 1985]. Это приподнятый на 1 метр над полом лабиринт с двумя открытыми (потенциально опасными) и двумя закрытыми (защищенными) рукавами.

Крыса помещается в центре пересечения рукавов, в течение 5 минут регистрируются выбор рукавов, время, проведённое в них, а также центральном участке, двигательная активность и исследовательское поведение (стойки, груминг, замирания). Тревожное поведение животного характеризуется предпочтением закрытых рукавов открытым [Pellow и др., 1985; Walf, Frye, 2007]

Тест «Открытое поле» (ОП), являющийся классическим методом исследования поведения грызунов в новых (стрессогенных) условиях [Hall, 1936], использовали для оценки уровня локомоторной активности и ориентировочно-исследовательского поведения крыс. Регистрировали время латентного периода, количество пересеченных квадратов различных зон установки, время груминга, вертикальных стоек, иммобилизации, акты дефекации. Тестирование проводили в установке площадью 1 м² квадратной формы, разбитой на 36 квадратов. Испытуемое животное помещали в центр открытого поля и в течение 5 минут фиксировали его активность.

Для получения гистологических препаратов крыс декапитировали, мозг извлекали, выделяли сегменты, включающие области гиппокампа с прилежащим фронтально- pariетальным неокортексом и префронтальный неокортекс. Выделенные образцы ткани мозга крыс фиксировали в течение 24 часов при 4 °C в фиксаторе FineFIX (Milestone, Italy), далее образцы проходили стандартные процедуры обезвоживания и заливки парафиновой средой HISTOMIX Extra (BioVitrum, Россия) в термостате при +56 °C в парафиновые блоки. При помощи микротома (Reichert, Austria) изготавливали серии чередующихся срезов мозга во фронтальной плоскости толщиной 7 мкм на уровне -2.80 мм от брегмы для изучения областей гиппокампа и фронтально- pariетального неокортекса и +3.00 мм от брегмы для префронтального неокортекса [Paxinos, Watson, 2005].

Для проведения имmunогистохимического анализа производили депарафинизацию и регидратацию срезов препаратов мозга, демаскировку антигенов в цитратном буфере. После блокировки неспецифического

связывания препараты в течение ночи инкубировали с первичными поликлональными кроличьими антителами к изучаемым белкам во влажной камере при температуре +4 °C (ГР, КЛ, КЛ-Р1 и КЛ-Р1/2, BDNF, Santa Cruz, 1:100). После инкубации на стекла наносили вторичные биотинилированные антитела и раствор avidin-biotinового комплекса, из набора для детекции фирмы Vector Laboratories Inc. (UK, PK-4001, avidin-biotinовая система детекции). Для визуализации реакции связывания антитела с антигеном использовался диаминобензидиновый набор (Peroxidase Substrate Kit DAB: SK-4100, Vector Laboratories, UK). Полученные препараты заключали под покровную среду ImmunoHistoMount (Santa Cruz Biotechnology, USA).

Количественный анализ иммунореактивности нейронов проводили с использованием системы анализа микроизображений, состоящей из светового микроскопа Olympus CX31RBSF (Optical systems, Germany), цифровой камеры ProgResCT1 (Jenoptik, Germany) и компьютера с программным обеспечением ВидеоТест Морфология 5.2 (ООО ВидеоТест, Санкт-Петербург). Был произведен подсчет числа имmunопозитивных клеток на участке размером 350x400 мкм, при этом определялась величина интегральной оптической плотности каждой из них. На основании оценки оптической плотности имmunопозитивные клетки разделяли на 2 класса: интенсивно-окрашенные имmunопозитивные клетки и общее количество имmunопозитивных клеток.

Для проведения иммуноферментного анализа уровня глюокортикоидных гормонов плазмы крови собранную кровь центрифугировали в течение 10 минут при 2000g и отобранный плазму хранили при температуре –20°C до момента анализа. Определение уровня кортикостерона в плазме крови производили при помощи набора для иммуноферментного анализа «Кортикостерон крыса/мышь» (K210R, Хема). В лунки планшета вносили калибровочные пробы, образцы и конъюгат с пероксидазной меткой. В качестве субстрата использовали тетраметилбензидин, интенсивность окраски, пропорциональную

концентрации кортикостерона в образцах, определяли при длине волны 450 нм.

Для оценки вклада выброса глюокортикоидных гормонов в стресс-протективное действие гипоксического ПостК и в развитии экспериментальных расстройств был применен ингибитор их синтеза – метирапон (30 мг/кг, внутрибрюшинно, sc-200597; Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA). Метирапон блокирует работу фермента 11- β -гидроксилазы, гидроксилирующего 11-дезоксикортизол и 11-дезоксикортикостерон с образованием кортизола и кортикостерона соответственно.

Так как гипоксическое ПостК помимо неспецифического стрессорного ответа также должно индуцировать специфические гипоксические реакции, такие как стабилизация гипоксия-индукционного фактора HIF1 α , то для оценки его возможного вклада в стресс-протективный эффект гипоксического ПостК применен ингибитор трансляции HIF1 топотекан (1 мг/кг, внутрибрюшинно, SKF-104864A; Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA). Топотекан вводили внутрибрюшинно за 30 минут перед посадкой животных в барокамеру.

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью пакетов анализа данных Statistica 10 (Stat-Soft Inc., USA) и Microsoft Excel'2013. Различия между выборками считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Результаты по экспериментальным группам представлены в виде среднего арифметического \pm SEM (standard error of the mean) и выражены в процентах от контрольных значений (принятых за 100 %).

Основные результаты

Эффективность применения гипоксического ПостК в экспериментальных моделях ПТСР, депрессии и ульцерогенеза: поведенческие тесты и глюокортикоидные гормоны плазмы крови

В поведенческом teste «Приподнятый крестообразный лабиринт», проводимом на 4 день после рестресса для верификации развития

тревожного состояния, был выявлен достоверный анксиогенный эффект в группе ПТСР: животные данной группы проводили достоверно меньше времени в открытых рукавах установки, по сравнению с контрольными животными ($p=0.023$, критерий Манна-Уитни, Рис. 1).

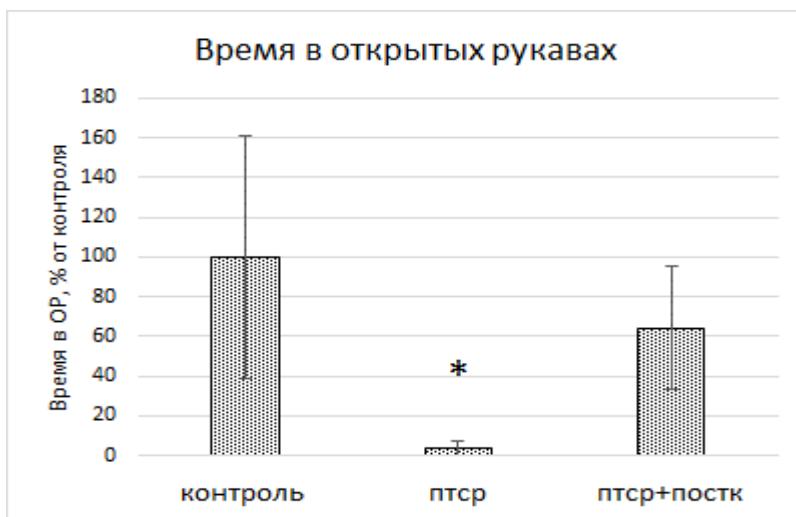


Рис. 1. Результаты ПКЛ: время, проведенное в открытых рукавах установки крысами различных групп (в каждой группе $n=6$), показывающие анксиолитический эффект. *, достоверное отличие от контроля, $p \leq 0.05$. критерий Манна-Уитни.

При этом в группе гипоксического ПостК, примененного совместно с моделью ПТСР, данный показатель не отличался от контроля, что свидетельствует о выраженном анксиолитическом действии гипобарического ПостК. Развитие экспериментального ПТСР сопровождалось достоверным снижением базального уровня кортикостерона в плазме крови крыс. Подобный феномен, но относительно базального уровня кортизола, наблюдается в клинической практике у пациентов с ПТСР, что дополнительно подтверждает валидность применения данной стрессорной модели.

Неизбежаемый стресс в модели ВБ приводил к развитию у крыс отсроченного стойкого депрессивноподобного состояния, симптомы которого были выявлены в «открытом поле» на 5-ые или 10-ые сутки после аверсивного стресса (Рис. 2). В частности, наблюдалось достоверное снижение горизонтальной двигательной активности животных и на 5, и на 10

сутки. Животные, подвергавшиеся ПостК после стрессорного воздействия, по данному показателю не отличались от контрольных животных, что свидетельствует о стресс-протективном эффекте гипоксического ПостК для модели депрессии. Помимо этого, развитие выученной беспомощности сопровождалось повышением базального уровня кортикостерона плазмы крови крыс и на 5, и на 10 день. Подобный феномен гиперкортизолемии характерен для пациентов с депрессией.

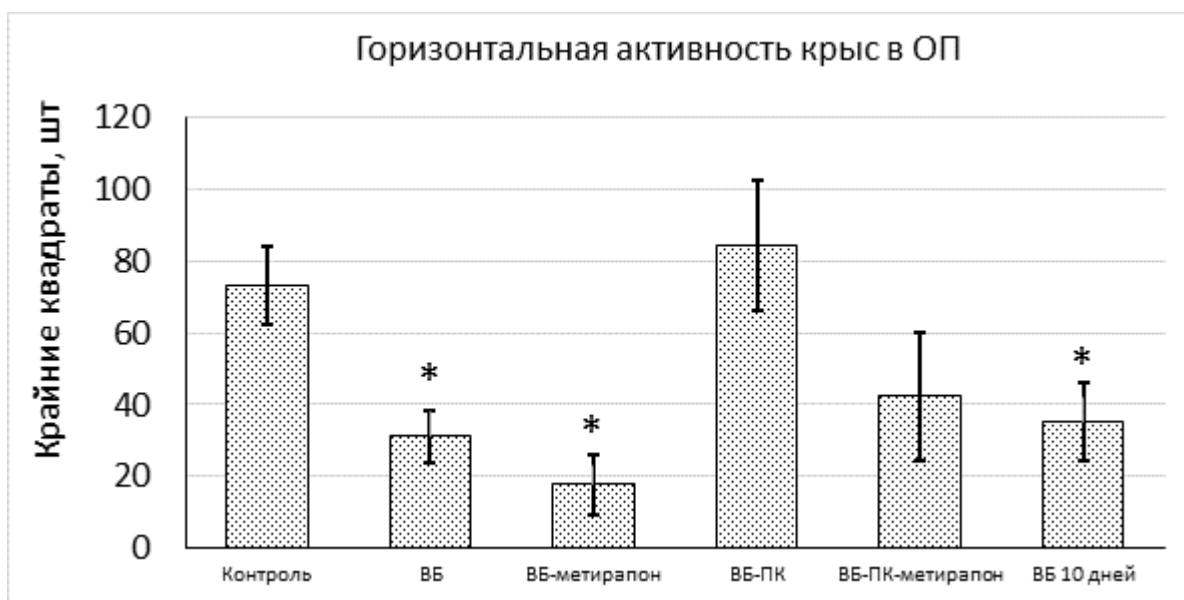


Рис. 2. Количество пройденных периферических квадратов крысами разных экспериментальных групп (все n=6) в тесте «Открытое поле», в % от значений в контрольной группе. ВБ – выученная беспомощность, * - достоверное отличие от контрольной группы; $p \leq 0.05$, критерий Манна-Уитни.

Третьей моделью, в которой исследовали эффект гипоксии, была модель острого ульцерогенного стресса, представляющая собой 3 часовую иммобилизацию на холоде с предварительным суточным голоданием животных. Данное стрессорное воздействие приводило к возникновению у животных эрозий слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Воздействие гипобарической гипоксией осуществляли в режиме ПрЕК и ПостК. Применение гипобарической гипоксии в режиме прекондиционирования достоверно снижало площадь эрозий слизистой

желудка у крыс данной модели. Возможные поведенческие реакции регистрировали методами ОП и ПКЛ.

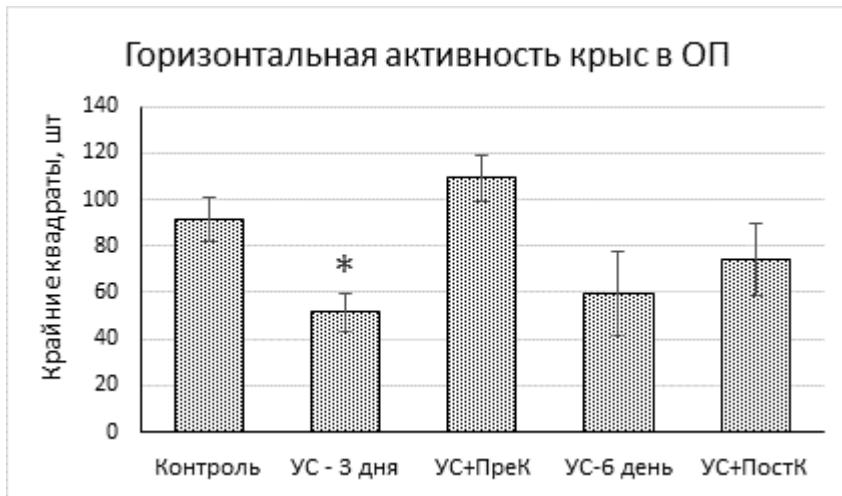


Рис. 3. Количество пройденных периферических квадратов крысами разных экспериментальных групп (все $n=6$) в тесте «Открытое поле». УС – ульцерогенный стресс, * - достоверное отличие от контрольной группы; $p \leq 0.05$, критерий Манна-Уитни.

Сравнение горизонтальной активности животных показало достоверное отличие от контроля только в ранние сроки после стрессорного воздействия – 3 суток (Рис. 3). В то время как на 6 день эти нарушения уже не проявлялись. Поведение животных группы гипоксического ПрeK после ульцерогенного стресса впервые показывает его эффективность в данной модели, в то время как для ПостK сделать какие-либо выводы затруднительно, так как сама процедура ПостK требует трех дней, а на отдаленных сроках нарушения поведения у животных не наблюдаются. Данный факт, очевидно, свидетельствует о том, что постстрессорная патология в данной ульцерогенной модели является кратковременной, и в течение нескольких суток наблюдается ее естественная компенсация.

В тесте приподнятый крестообразный лабиринт, изменения наблюдались только на уровне тенденций (Рис. 4).

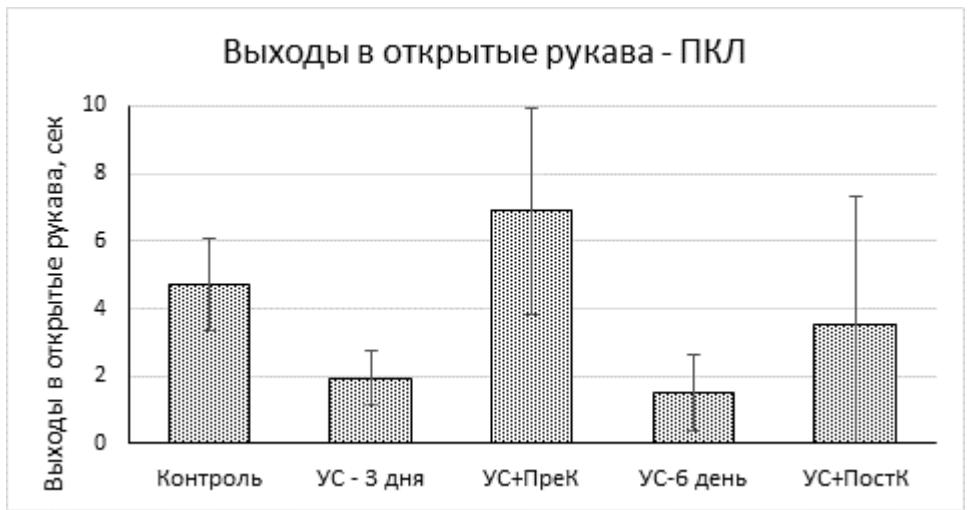


Рис. 4. Время выходов в открытые рукава установки крыс разных экспериментальных групп (все n=6) в тесте Приподнятый крестообразный лабиринт.

Исследование уровня базального кортикостерона крови крыс ульцерогенной модели показало достоверное изменение его уровня в группе ульцерогенного стресса на 3 день после холодовой иммобилизации, к 5 дню этот показатель не отличается от контроля (Рис. 5).

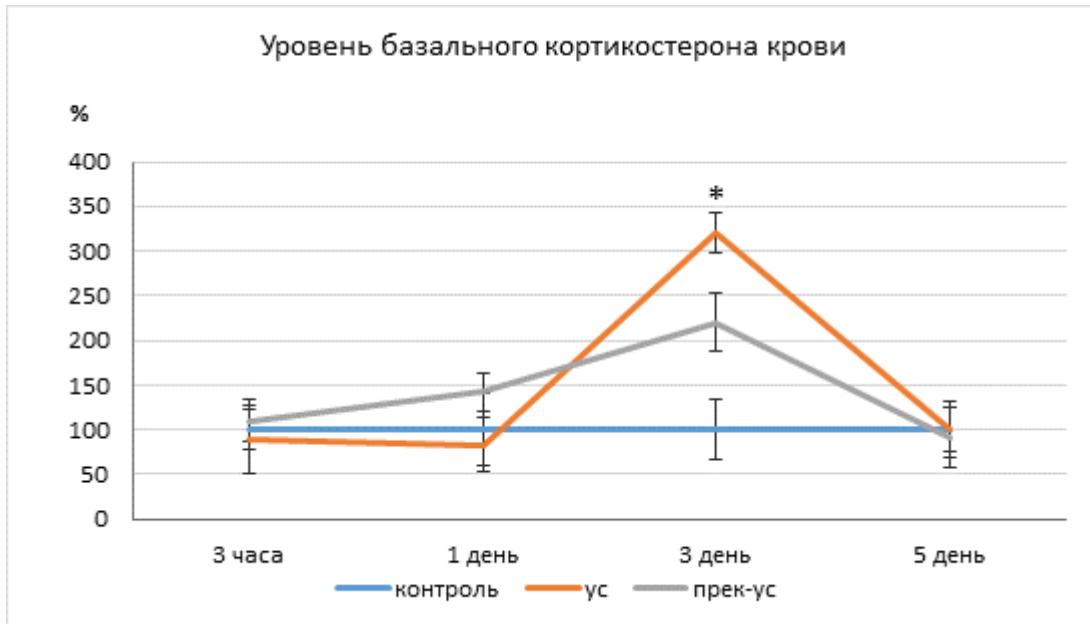


Рис. 5. Базальный уровень кортикостерона в крови крыс разных групп (все n=6). *, p=0,02, группы ульцерогенеза и контроля, критерий Манна-Уитни.

Изучение динамики уровня кортикостерона плазмы крови в ответ на процедурный стресс забора крови из хвоста показало достоверное отличие стресс-реактивности от контроля в группе ульцерогенного стресса, что,

вероятно, свидетельствует об изменении реактивности гипоталамо-гипофизарно-адренокортиkalной системы в данном случае.

Иммуногистохимический анализ

Глюкокортикоидные рецепторы

Количественный иммуногистохимический анализ срезов мозга животных групп ульцерогенного стресса и ПостК не выявил достоверных отличий имmunoreактивности к ГР на 7 сутки после стрессорного воздействия, ни в гиппокампе, ни в неокортексе.

В модели ПТСР на 4 сутки уровень имmunoreактивности к ГР в данных структурах также не изменялся. В модели депрессии «выученная беспомощность» показано, что в дорзальном гиппокампе (область CA1), количество интенсивно-иммунопозитивных клеток к ГР на 5 сутки достоверно снижается, в то время как после ПостК этот показатель наоборот возрастал (Рис. 6, 7).

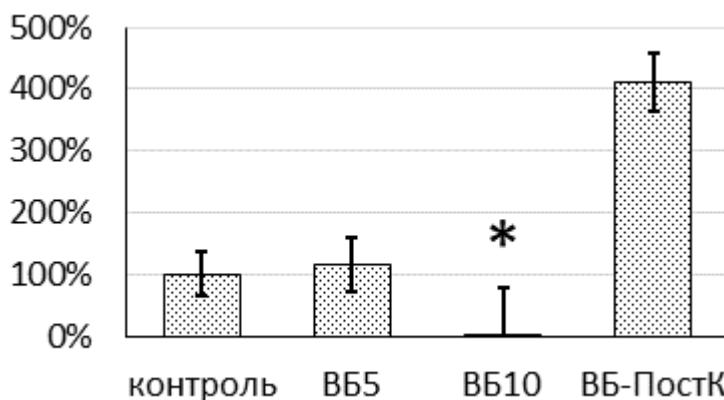


Рис. 6. Количество клеток, интенсивно-иммунопозитивных к глюкокортикоидным рецепторам, в области CA1 гиппокампа крыс разных экспериментальных групп (все n=6), в % от значений в контрольной группы. * - достоверное отличие от контрольной группы; p ≤ 0.05, критерий Манна-Уитни.

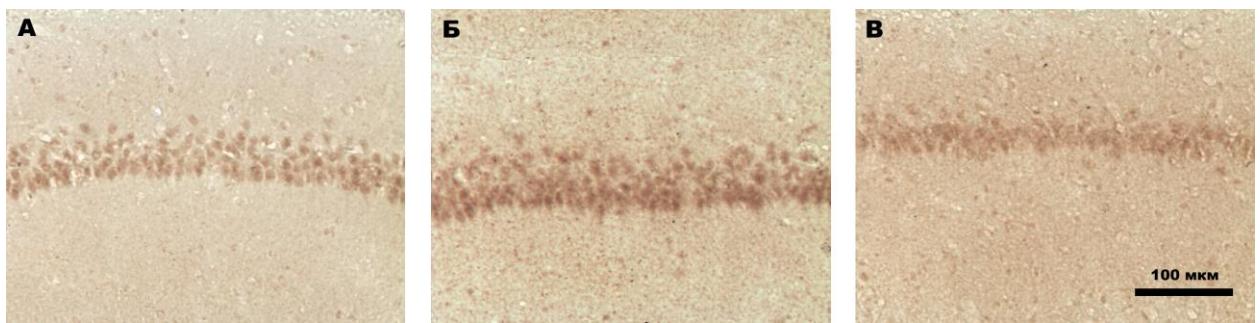


Рис. 7. Микрофотографии (x40) зоны СА1 гиппокампа (А-В) крыс, иллюстрирующие изменения иммунореактивности к глюокортикоидным рецепторам. А – контроль; Б – ВБ-ПостК; В – группа ВБ 10 дней. Калибровочный маркер – 100 мкм. Иммуногистохимический метод.

Данные изменения, по-видимому, могут составлять важный механизм ПостК, способствуя компенсации ослабленной отрицательной обратной связи в гипоталамо-гипофизо-адренокортиkalной оси, наблюдалась и у пациентов с депрессиями, и у животных в моделях депрессии.

Кортиколиберин и кортиколибериновые рецепторы (КЛ и КЛ-P1/2)

В модели ульцерогенного стресса в изучаемые сроки не зарегистрировано изменений экспрессии КЛ и его рецептора: в зоне СА1 гиппокампа и 5 слое фронто- pariетального неокортекса достоверных изменений общего количества клеток, иммунопозитивных к КЛ и КЛ-P1, не наблюдалось.

При развитии ПТСР на 4 день после рестиесса было отмечено достоверное снижение иммунопозитивности к КЛ во всех исследованных отделах мозга. ПостК частично или полностью, но всегда достоверно, корректировало изменения уровня иммунореактивного КЛ (Рис. 8, 9).

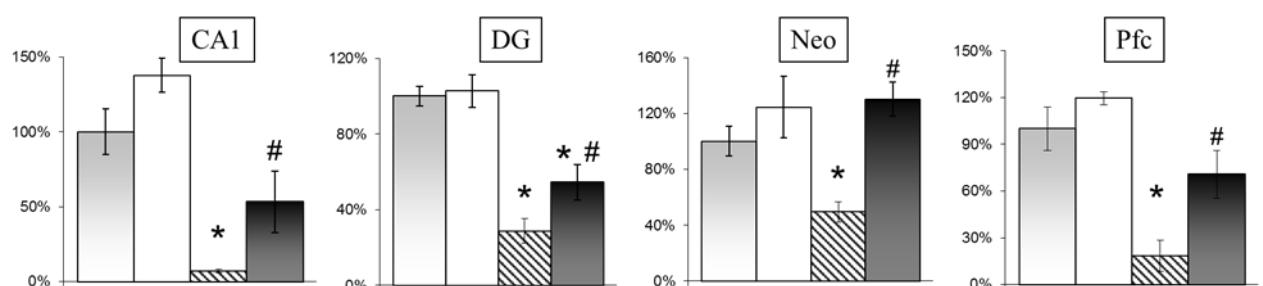


Рис. 8. Количество клеток, иммунопозитивных к КЛ, в поле СА1 и зубчатой извилине (DG) гиппокампа, фронто- pariетальном Neo5 и префронтальном неокортексе крыс разных

экспериментальных групп, в % от значений в контрольной группе. Серые столбцы – контрольная группа, 100% (n=6); белые – группа контроль-Р (n=6); штрихованные – группа ПТСР (n=6); черные - группа ПТСР-ПостК (n=6). *, достоверное отличие от контрольной группы; #, достоверное отличие группы ПТСР-ПостК от ПТСР, $p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни.

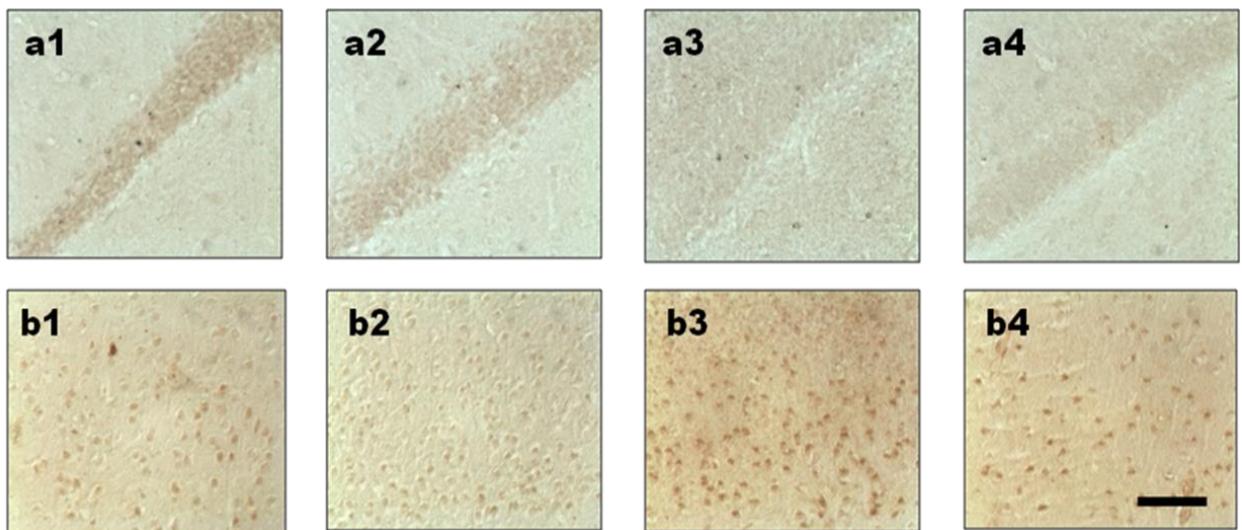


Рис. 9. Микрофотографии (x40) зубчатой извилины (a1-a4) и префронтального неокортекса (b1-b4) крыс, иллюстрирующие изменения иммунореактивности к КЛ (a1-a4) и КЛ-Р1/2 (b1-b4). Под номером «1» – контроль; «2» – контроль-Р; «3» – ПТСР; «4» – ПТСР-ПостК. Калибровочный маркер – 100 мкм. Иммуногистохимический метод.

Вместе с тем выявлено повышение экспрессии КЛ-Р1/2 при развитии ПТСР (Рис. 8, 9), что, вероятно, отражает попытку компенсации снижения тонуса экстрагипotalамической КЛ-ergicической системы через up-регуляцию его рецепторов в изучаемых структурах.

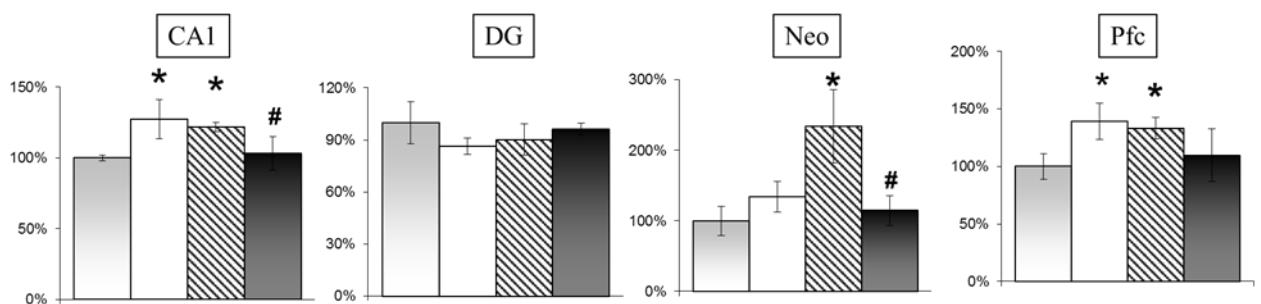


Рис. 9. Общее количество клеток, иммунопозитивных к КЛ-Р1/2, в области CA1, зубчатой извилине и префронтальном неокортексе, а также количество интенсивных иммунопозитивных клеток фронтально- pariетального неокортекса крыс разных экспериментальных групп (все n=6), в % от значений в контрольной группе. Обозначения как ранее.

Экспрессия КЛ в вентральном гиппокампе животных группы «выученной беспомощности» была достоверно сниженной, а гипоксическое ПостК компенсировало это снижение лишь частично. Во фронтопариетальном неокортексе и зубчатой извилине достоверных изменений иммунореактивности к КЛ-Р1 отмечено не было.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о вовлечении экстрагиппоталамической КЛ-ergicической системы в патогенез ПТСР и депрессии и в реализацию терапевтического эффекта гипоксического ПостК. ПостК стимулировало экспрессию экстрагиппоталамического КЛ, дефицит которого обнаруживается при ПТСР и ВБ, и корректировало уровень экспрессии его рецепторов.

BDNF

Экспериментальное ПТСР характеризовалось достоверным снижением иммунореактивности к BDNF в гиппокампе и фронтопариетальном, но не префронтальном, неокортексе. Гипоксическое ПостК регион-зависимо, полностью или частично нивелировало дефицит BDNF (Рис. 10, 11).

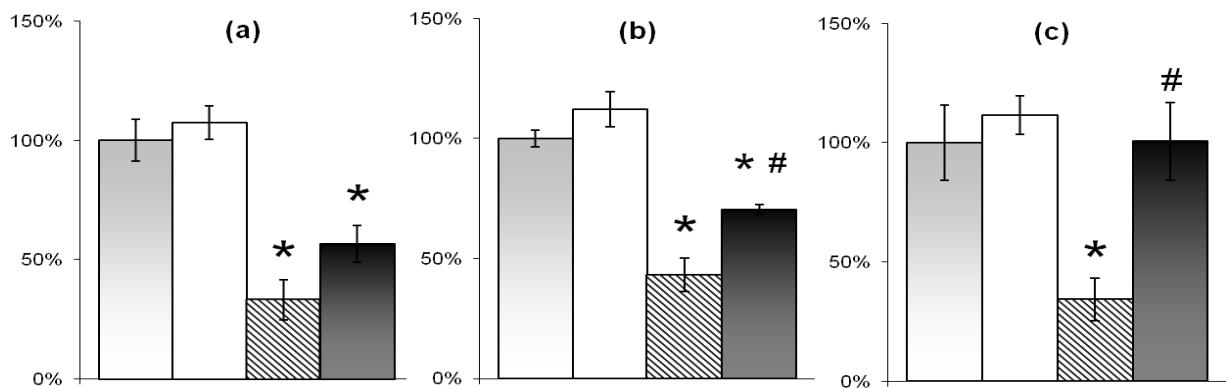


Рис. 10. Количество клеток, иммунопозитивных к BDNF, в различных структурах мозга крыс разных экспериментальных групп (все n=6), в % от значений в контрольной группе. а - CA1, б – зубчатая извилина, с – фронтопариетальный неокортекс, усредненные значения 2 и 5 слоев. Обозначения как ранее.

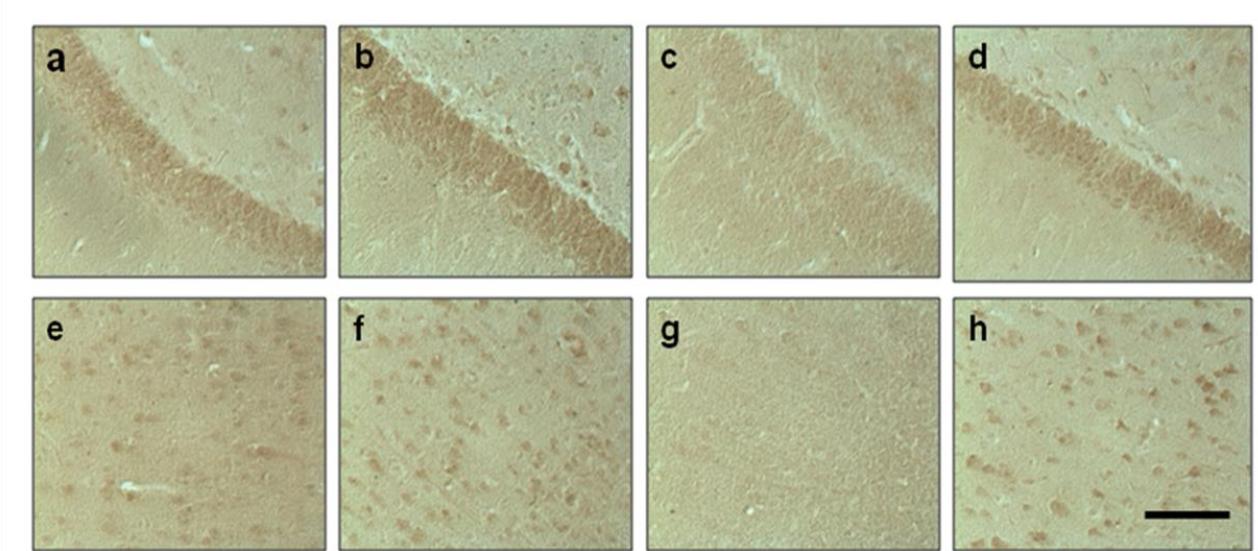


Рис. 11. Микрофотографии (x40) зубчатой извилины (а-д) и V слоя неокортекса (е-г) крыс, иллюстрирующие изменения иммунореактивности к BDNF в группах ПТСР и ПТСР-ПостК. а, е – контроль; б, ф – контроль-Р; с, г – ПТСР; д, г – ПТСР-ПостК. Калибровочный маркер – 100 мкм. Иммуногистохимический метод.

Роль глюкокортикоидных гормонов в развитии выученной беспомощности и ПТСР: эффекты метирапона

Для исследования патогенетической роли выброса глюкокортикоидных гормонов в ответ на травматический стресс был применен метирапон, ингибитор их синтеза, который вводили внутрибрюшинно за 30 минут перед травматическим стрессом моделей ПТСР и ВБ. В модели депрессии метирапон при введении перед стрессорным воздействием не оказывал достоверного эффекта на горизонтальную активность крыс, по количеству пройденных крайних квадратов крысы этой группы не отличаются от группы ВБ.

В группе ПТСР-метирапон, где, метирапон, вводили за 30 минут до травматического стресса, поведение животных в teste приподнятый крестообразный лабиринт не отличалось от поведения контрольных животных (Рис. 2, 12), что, по-видимому, свидетельствует о ключевой роли

стрессорного выброса глюкокортикоидных гормонов в механизмах в патогенезе ПТСР.

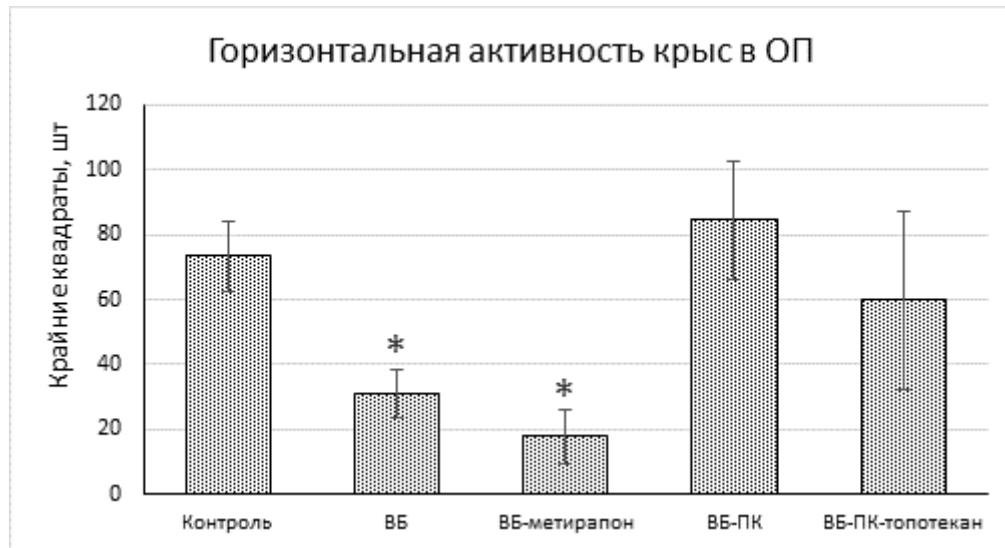


Рис. 12. Количество пройденных периферических квадратов крысами разных экспериментальных групп (все n=6) в тесте Открытое поле. * - достоверное отличие от контрольной группы; p ≤ 0.05, критерий Манна-Уитни.

Эти данные, и данные по уровню кортикостерона, приведенные ранее, по-видимому, свидетельствуют о двойственной роли глюкокортикоидов в развитии и коррекции постстрессорных патологий и необходимости дальнейших исследований по данному вопросу.

Роль глюкокортикоидных гормонов в стресс-протективном эффекте ПостК: эффекты метирапона

Стресс-протективный эффект ПостК в модели ПТСР не проявлялся на фоне блокады синтеза кортикостероидов метирапоном, вводимым перед каждым сеансом ПостК, что выражалось в достоверно сниженном времени проведенном крысами в открытых рукавах в teste ПКЛ (Рис. 13).

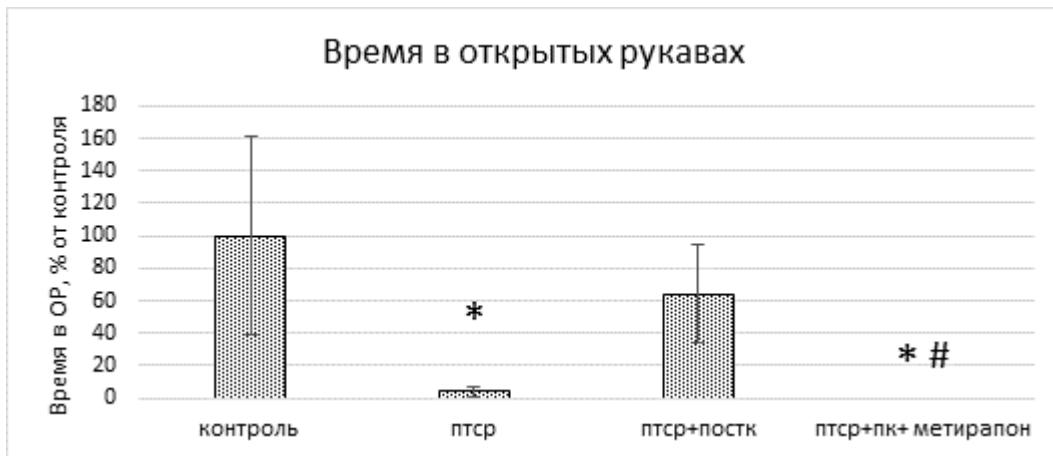


Рис. 13. Результаты ПКЛ: время, проведенное в открытых рукавах установки крысами различных групп; показывающие анксиолитический эффект ПостК и его отсутствие при применении метирапона (в каждой группе $n=6$). *, достоверное отличие от контроля, $p \leq 0,01$. One-way ANOVA (post hoc Fisher test).

В модели ВБ стресс-протективный эффект ПостК на фоне введения метирапона перед ПостК также не отмечался, что выражалось в достоверно сниженной горизонтальной активности животных этой группы, как и группы ВБ. Полученные данные однозначно свидетельствуют о вовлечении глюокортикоидных гормонов в реализацию стресс-протективного действия ПостК в различных моделях стрессорных расстройств.

HIF1 α и гипоксическое ПостК: введение топотекана

По горизонтальной активности в «открытом поле» не было выявлено достоверных отличий группы ПостК-топотекан от групп ПостК и контроля (Рис. 12). Схожая картина наблюдалась и для времени иммобилизации животных. Это может говорить о том что, по-видимому, гипоксия-индуцируемый фактор HIF1 α не является стресс-протективным мессенджером гипоксического ПостК, в отличие от глюокортикоидных гормонов.

Заключение

В ходе выполнения настоящей работы, посвященной изучению стресс-протективных эффектов и механизмов гипоксического ПостК в моделях постстрессорных патологий, была показана эффективность его применения

для коррекции модельных ПТСР и депрессии. Было установлено, что глюкокортикоидные гормоны, но не гипоксия-индуцибельный фактор, играют ключевую роль в стресс-протективном эффекте гипоксического ПостК. Выявлены модификации экспрессии КЛ, BDNF и ГР, сопровождающие вызываемую ПостК коррекцию нарушений, индуцируемых психоэмоциональным, но не ульцерогенным, стрессом.

Выводы

1. Гипоксическое ПостК оказывало выраженный протективный эффект в моделях экспериментального ПТСР и депрессии у крыс.
2. Метирапон, ингибитор синтеза глюкокортикоидов, нивелировал развитие ПТСР и анксиолитический эффект гипоксического ПостК. Ингибитор HIF-1 не влиял на проявление стресс-протективного действия ПостК. Таким образом, глюкокортикоидные гормоны, но не HIF1, очевидно, играют важную роль в реализации стресс-протективного эффекта гипоксического ПостК, а также в индукции экспериментального ПТСР, но не депрессии.
3. Развитие патологических состояний в моделях ПТСР и депрессии сопровождалось модификацией функции ГГАС и экспрессии ее экстрагипotalамических регуляторов – кортиколиберина и его рецепторов в гиппокампе и неокортексе крыс обеих моделей, дефицитом BDNF - в модели ПТСР, и редукцией содержания глюкокортикоидных рецепторов - в модели депрессии.
4. Применение гипоксического ПостК способствовало компенсации дефицита кортиколиберина и BDNF в модели ПТСР, а также повышению содержания кортиколиберина и глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе в модели депрессии.
5. Формирующаяся в модели ульцерогенного стресса патология являлась кратковременной, поэтому применение ПостК нецелесообразно. Превентивное воздействие умеренной гипоксией в режиме

прекондиционирования предотвращало формирование патологии. Не выявлено изменений экспрессии кортиколиберина, его рецепторов и глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и неокортексе крыс на 7-й день после ульцерогенного стресса и ПостК ульцерогенного стресса.

Апробация работы

Результаты данной работы были представлены и обсуждены на Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем», посвященная 90-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, 2015); XX Школе-Конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (Москва, 2016); XV всероссийском совещании с международным участием и VIII школе по эволюционной физиологии, посвященных памяти академика Л.А. Орбели и 60-летию ИЭФБ РАН (Санкт-Петербург, 2016); XX Международной пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2016); XXIV Международной пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2017); Санкт-Петербургском научном форуме, посвященном 100-летию Физиологического общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2017); Всероссийском симпозиуме с международным участием «Стресс: физиологические эффекты, патологические последствия и способы их предотвращения» (Памяти А.А. Филаретова), (Санкт-Петербург, 2017); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018». (Москва, 2018); XXI международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2018); Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Современные

асpekты интегративной физиологии» (Санкт-Петербург, 2018); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019». (Москва, 2019); XXII международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2019); Международной конференции «Летняя школа по стрессу» (Санкт-Петербург, 2019); Международной конференции «Актуальные проблемы нейробиологии», Сателлитном симпозиуме: «От нейрона к мозгу» и X Всероссийской школе молодых учёных памяти академика РАН Е.Е.Никольского (Казань, 2019); Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 170-летию со дня рождения И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2019); заседаниях Отдела физиологии и патологии высшей нервной деятельности ИФ РАН (2015-2019).

Список публикаций по теме научно-квалификационной работы

По теме ВКР опубликовано 24 работы, из них 8 статей в рецензируемых журналах (6 в списке ВАК) и 16 тезисов конференций.

В журналах, рекомендованных ВАК

1. Зенько М. Ю., Рыбникова Е. А., Глушченко Т. С. Экспрессия нейротрофина BDNF в гиппокампе и неокортексе у крыс при формировании постстрессового тревожного состояния и его коррекции гипоксическим посткондиционированием //Морфология. – 2014. – Т. 146. – №. 5. – С. 14-18. [Переведена: Zen'ko M. Y., Rybnikova E. A., Glushchenko T. S. Expression of the neurotrophin BDNF in the hippocampus and neocortex in rats during formation of a poststress anxiety state and its correction by hypoxic postconditioning //Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2015. – Т. 45. – №. 8. – С. 869-872]
2. Баранова К. А., Зенько М. Ю. Анксиолитический эффект дистанционного ишемического пре- и посткондиционирования в

- модели посттравматического стрессового расстройства// Журнал ВНД имени И.П.Павлова. – 2018. – Т. 68. – №. 5. – С. 663-672.
3. Зенько М. Ю., Рыбникова Е. А. Перекрестная адаптация: от Ф.З. Меерсона до наших дней. Часть 1. Адаптация, перекрестная адаптация и перекрестная сенсибилизация// Успехи физиологических наук. – 2019. –Т. 50. –№ 4 (в печати).
 4. Рыбникова Е.А., Зенько М.Ю., Барышева В.С., Ветровой О.В., Акклиматизация к среднегорью маскирует симптомы экспериментального посттравматического стрессового расстройства, но не корректирует его патогенетические механизмы// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. –№ 12 (в печати).
 5. Баранова К. А., Зенько М. Ю. Использование дистантного ишемического пре- и посткондиционирования для коррекции проявлений экспериментальной депрессии// Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119. – №. 6. – С. 72-80.
 6. Зенько М. Ю. и др. Патогенетическая роль стрессорного выброса глюокортикоидных гормонов в генезе посттравматического стрессового расстройства (экспериментальное исследование) //Доклады Академии наук. –Наука, 2018. – Т. 479. – №. 3. – С. 348-350. [Переведена: Zenko M. Y., Baranova K. A., Rybnikova E. A. Pathogenetic role of the stress-induced release of glucocorticoid hormones in the development of post-traumatic stress disorder: an experimental study //Doklady Biological Sciences. – Pleiades Publishing, 2018. – Т. 479. – №. 1. – С. 51-53]
- В прочих изданиях*
7. Зенько М. Ю., Рыбникова Е. А., Фармакологическое прекондиционирование// Интегративная физиология. – 2019. (в печати)
 8. Vetrovoy O., Zenko M. Y., et al. Neuroprotective effect of hypobaric hypoxic postconditioning is accompanied by dna protection and lipid

peroxidation changes in rat hippocampus //Neuroscience letters. – 2017. – Т. 639. – С.49-52.

Список литературы

1. Гуляева Н. В., Фундаментальные и трансляционные аспекты стресс-реактивности вентрального гиппокампа: функционально-биохимические механизмы измененной нейропластичности // Нейрохимия. –2015. –Т.32 – №2. – С. 101–111.
2. Зенько М. Ю. и др. Патогенетическая роль стрессорного выброса глюкокортикоидных гормонов в генезе посттравматического стрессового расстройства (экспериментальное исследование) // Доклады Академии наук. –Наука, 2018. – Т. 479. – №. 3. – С. 348-350.
3. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. М.: Наука. –1981. – 278 с.
4. Рыбникова, Е. А.; Воробьев, М. Г.; Самойлов М.О. Гипоксическое посткондиционирование корректирует нарушения поведения крыс в модели посттравматического стрессового расстройства // Журнал Высшей Нервной Деятельности им. И. П. Павлова. – 2012. – Т. 62. – № 3. – С. 364–71.
5. Рыбникова, Е. А.; Самойлов М.О. Способ реабилитации после гипоксии, вызывающей нарушения функций мозга в моделях на лабораторных животных // Патент России № 2437164. 2011.
6. Filaretova L., Bagaeva T., Morozova O. Stress and the Stomach: Corticotropin-releasing factor may protect the gastric mucosa in stress through involvement of glucocorticoids // Cell. Mol. Neurobiol. – 2012. – Т. 32. – № 5. – С. 829–836.
7. Hall C.S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. // J. Comp. Psychol. – 1936. – Т. 22. – № 3. С. 345–352.

8. Liberzon I., Krstov M., Young E.A. Stress-restress: Effects on ACTH and fast feedback // Psychoneuroendocrinology. – 1997. – T. 22. – № 6. – C. 443–453.
9. Paxinos G., Watson C., The rat brain stereotaxic coordinates / San Diego:Elsevier Academic Press. – 2005. – C. 210
- 10.Pellow S. и др. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat // J. Neurosci. Methods. – 1985. – T. 14. – № 3. – C. 149–167.
- 11.Ravindran L. N. et al. Pharmacotherapy of post-traumatic stress disorder //Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment // Springer Berlin Heidelberg. – 2010. – C. 505-525.
- 12.Seligman M.E., Beagley G. Learned helplessness in the rat. // J. Comp. Physiol. Psychol. – 1975. – T. 88. – № 2. – C. 534–541.
- 13.Souery D. et al. Treatment resistant depression: methodological overview and operational criteria // European Neuropsychopharmacology. – 1999. – T. 9. – №. 1-2. – C. 83-91.
- 14.Walf A.A., Frye C.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety related behavior in rodents // Nat. Protoc. – 2007. – T. 2. – № 2. – C. 322–328.