

## ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ BDNF, GDNF И NT-3 В ТЕМЕННОЙ КОРЕ КРЫСЫ ПРИ ПОСТОЯННОЙ ОККЛЮЗИИ СРЕДНЕЙ МОЗГОВОЙ АРТЕРИИ

© 2022 г. С. Г. Калиниченко<sup>1</sup>, \*, А. В. Коробцов<sup>1</sup>, Н. Ю. Матвеева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии Тихоокеанского государственного медицинского университета  
Министерства здравоохранения РФ, Владивосток, 690002 Россия

\*E-mail: sgkalinichenko@gmail.com

Поступила в редакцию 17.10.2021 г.

После доработки 05.11.2021 г.

Принята к публикации 08.11.2021 г.

Исследовали иммунолокализацию нейротрофического фактора мозга (BDNF), нейротрофина-3 (NT-3) и глиального нейротрофического фактора (GDNF) в теменной коре крыс на модели фокального инсульта, вызванного постоянной окклюзией средней мозговой артерии. Пространственная плотность маркированных клеток постоянно варьирует по слоям коры и на разных сроках ишемического процесса, демонстрируя в ядре инсульта и пенумбре противоположные топографические тренды. Для всех исследованных нейротрофинов характерна значительная редукция иммунореактивных клеток в IV–VI слоях коры в первые и третьи сутки ишемии. В супрагранулярных слоях их количество остается относительно стабильным, либо слегка снижается по сравнению с контролем. На 8-е сут ишемии в ядре инсульта нейротрофины в нейронах почти не выявляются, а в пенумбре возникает индукция иммунореактивности. В пенумбре NT-3-иммунореактивные нейроны превалируют в слоях II–III, BDNF выявляется в нейронах слоев II–III и V, а основную популяцию GDNF-иммунореактивных клеток составляют астроциты. Топография нейротрофинов в контралатеральном полушарии повторяет паттерн их локализации в области пенумбры. Неоднородная стратификация нейротрофинов и их избирательная реакция на ишемическое повреждение определяют их различным участием в поддержании цитопротективных и нейродеструктивных эффектов.

**Ключевые слова:** нейротрофический фактор мозга BDNF, нейротрофин-3 NT-3, глиальный нейротрофический фактор GDNF, селективная нейропротекция, окклюзия средней мозговой артерии, инсульт

DOI: 10.31857/S0041377122010047

Характер и темпы ишемического повреждения в значительной степени лимитируются уровнем трофического обеспечения нейронов, а естественной защитной реакцией мозга в первые минуты ишемии является изменение экспрессии нейротрофинов (НТ), нейроростовых факторов и их рецепторов (Beker et al., 2020). Сумма влияний НТ обеспечивает выживание, пролиферацию и дифференцировку клеток, регулирует синаптическую трансмиссию и экзоцитоз медиаторов, выработку белков постсинаптических уплотнений и ключевых энзимов медиаторного обмена, а также напрямую управляют активностью ионных каналов (Miranda et al., 2019).

В спектр нейропротективных влияний при остром инсульте включаются глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротрофический фактор мозга (BDNF) и нейротрофин-3 (NT-3) (Митрошина и др., 2019; Pöyhönen et al., 2019; Liu et al., 2020). Их эффекты связаны с активацией сигнального ме-

ханизма, сцепленного с определенным типом Trk-рецептора. Молекулы NT-3 имеют сродство к рецепторам TrkC, рецептор TrkB связывается с BDNF, а GDNF реагирует с рецептором GFR $\alpha$ 1 экстраклеточного домена тирозинкиназы (Попова и др., 2017; Sasi et al., 2017; Ibanez, Andressoo, 2017). Избирательное действие НТ на нейроны различной медиаторной организации реализуется комплексом вторичных мессенджеров, один из которых опосредуется фосфолипазой C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), другой – митоген-активируемой протеинкиназой (МАРК), а третий – через экспрессию фосфоинозитид 3-киназы/протеинкиназы B (PI3K/Akt) (Bothwell, 2014; Bronfman et al., 2014).

При экспериментальной ишемии экзогенное подведение НТ сокращает размер инфарктной зоны на 35–50% (Boyce, Mendell, 2014; Liu, Chopp, 2016; Jiang et al., 2017), снижает глутаматергическую эксцитотоксичность, оказывая про- или антиапоптотическое действие (Калиниченко и др., 2020). Хотя повышение экспрессии НТ коррелирует с регрессом неврологического дефицита, их протективные эффекты неоднородны, зависят от типологии и нейрохими-

**Принятые сокращения:** НТ – нейротрофины; GDNF – глиальный нейротрофический фактор; BDNF – нейротрофический фактор мозга; NT-3 – нейротрофин-3.

ческого профиля поврежденных клеток (Sims et al., 2020). Для нейронов новой коры эти исследования не находят однозначного решения и на различных патогенетических моделях инсульта дают разноречивые результаты. Неизвестна также стратификация НТ в фокусе инсульта и ишемической пенумбре, что затрудняет интерпретацию данных о мишенях их избирательной активности.

Цель настоящей работы состояла в исследовании топографического и количественного представительства нейронов, экспрессирующих BDNF, NT-3 и GDNF в неокортексе крыс при фокальном ишемическом инсульте, вызванном постоянной окклюзией средней мозговой артерии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Экспериментальные животные и моделирование инсульта.** Работа выполнена на материале от 27 беспородных крыс-самцов весом 200–250 г. Условия содержания животных, а также экспериментальные условия соответствовали директиве 2010/63/EU Европейского союза 2010 г., определяющей правила научных экспериментов с животными. Все экспериментальные процедуры были одобрены междисциплинарным комитетом по этике ФГБОУ ТГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 6 марта 2013 г.).

Операция проводилась в асептических условиях под ингаляционным наркозом севофлураном. Фокальный ишемический инсульт моделировали с помощью метода постоянной филаментной окклюзии средней мозговой артерии (Koizumi et al., 1986; Sommer, 2017). По достижении глубокого наркоза, крысу фиксировали на манипуляционном столике с подогревом в положении на спине. После обработки операционного поля антисептиком на передней стороне шеи по средней линии производили разрез кожи длиной 1.5 см, выделяли левую общую сонную артерию (ОСА) и ее бифуркацию на внутреннюю (ВСА) и наружную (НСА) сонные артерии. Затем выполняли перевязку ОСА и НСА. Крылонебную артерию, как коллатераль ВСА, и коллатерали НСА – затылочную и верхнюю щитовидную артерии – коагулировали. Через прокол ОСА в ее просвет вводили окклюдер (полиамидную нить (филамент)), который надежно заполнял весь поперечник сосуда. Окклюдер проводили интравазально в собственно ВСА на глубину около 1.5–2.0 см. Нить оставляли в просвете артерии и фиксировали перевязкой ВСА. После чего рану ушивали. Время операции составляло 40–60 мин. Описанные манипуляции полностью исключают ретроградный и коллатеральный кровоток в ВСА, дают возможность контролировать зону распространения инсульта в бассейне средней мозговой артерии (Коробцов, Калининченко, 2017). Животных выводили из эксперимента через 1, 3, 8, и 21 сут после операции. На каждом сроке исследовали по 6 крыс. Контролем служили интактные животные ( $n = 3$ ). Для анестезии использовали внутривенное введение

3%-ного раствора тиопентала натрия, после чего животных декапитировали.

Анатомические координаты области инфаркта мозга в первые сутки после моделируемого инсульта определяли с помощью окрашивания в растворе 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ). Мозг оперированного животного помещали в холодный физиологический раствор на 10 мин при 4°C, затем разрезали фронтально на сегменты толщиной 1–2 мм. Затем материал погружали в 2%-ный раствор ТТХ и выдерживали 30 мин в темноте при 37°C. После установления фокуса инсульта на окрашенных ТТХ фрагментах остальную ткань мозга обрабатывали для иммуногистохимии.

**Иммуногистохимия.** Материал фиксировали в 4%-ном параформальдегиде на фосфатном буфере в течение 4 ч, после чего промывали 0.1 М Na-фосфатным буфером (pH 7.2) с многократной сменой раствора, заливали в парафин по общепринятой методике. Затем срезы толщиной 15 мкм монтировали на предметные стекла, депарафинировали и инкубировали с первичными антителами. Для этой цели использовали следующие антитела (Abcam, Великобритания): мышинные моноклональные против BDNF (ab205067) в разведении 5 мкг/мл, кроличьи поликлональные против GDNF (ab18956) в разведении 5 мкг/мл, кроличьи поликлональные против NT-3 (ab216491) в разведении 1 : 200. Первичные антитела разводили в 10 мл фосфатного буфера, содержащего 10% Тритона X-100 и 200 мг бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. Промывали 0.1 М Na-фосфатным буфером, затем в течение 1 ч инкубировали в растворе биотинилированных вторичных антител против иммуноглобулина мыши и кролика соответственно первичным антителам (Biotinylated Goat anti-Mouse IgG (ab64255, Abcam, UK,) и Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody, Biotin, (№ 31820; Invitrogen, США)) в разведении согласно протоколу фирмы производителя, а затем в растворе авидин-пероксидазного комплекса (Abcam, Великобритания). После этого срезы выдерживали 4 мин в растворе диаминобензидина (DAB Substrate Kit; Abcam, Великобритания), затем трижды промывали фосфатным буфером, обезвоживали и заключали в бальзам. В качестве контроля из среды исключали первичные антитела, окрашивание клеток отсутствовало. Часть срезов окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля.

Препараты изучали в световом микроскопе AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали при помощи цифровой камеры AxioCam ICc3. Морфометрическую обработку полученных фотографий проводили при помощи пакета программ AxioVision 4.8.1. Относительную плотность иммуноокрашенных клеток вычисляли на участках коры площадью 0.5 мм<sup>2</sup>. При подсчете учитывали только сохранные клетки, содержащие ядро, с учетом поправки на тол-

щину среза и диаметр ядра по Аберкромби. Включение этой поправки в расчеты позволяет исключить повторный подсчет на серийных срезах одной и той же клетки в результате ее фрагментации. Достоверность межгрупповых различий определяли методом рангового дисперсионного анализа с попарными двусторонними *post hoc* тестами Манна–Уитни. Достоверными признавали различия при  $P \leq 0.05$  с поправкой Бонферрони на множественную проверку нулевых гипотез.

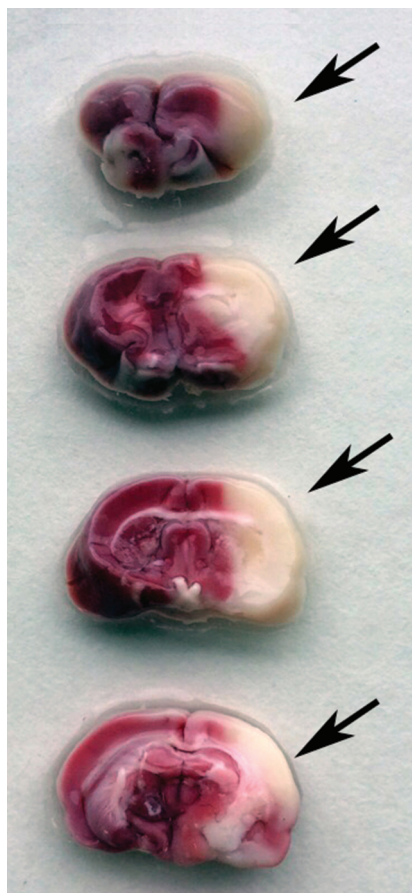
В отдельных случаях определяли долю позитивно окрашенных нейронов. Для этого с помощью окуляр-морфометрической сетки подсчитывали абсолютное количество иммуореактивных клеток на участках коры площадью  $0.29 \text{ мм}^2$  в 20–25 полях зрения и высчитывали их долю от среднего числа клеток, окрашенных в сходных областях по методу Ниссля. Данные обрабатывали методом вариационной статистики с определением *t*-критерия достоверности по Стьюденту ( $P < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Метод филаментной окклюзии позволяет при сравнительно малой инвазивности блокировать кровоток на значительном протяжении сосуда. При обработке мозга с помощью ТТХ зона ишемического инсульта проявляется в левом полушарии со стороны окклюзии как неокрашенный участок фронтально-париетальной коры (3.5–4 мм кпереди от брегмы) и внутренней капсулы величиной  $0.3 \times 0.5 \times 0.8 \text{ см}$  (рис. 1). На 8-е и 14-е сут отмечается значительная вариабельность конфигурации и размеров зоны инсульта. В этом периоде ишемическое ядро всегда локализуется в неокортексе, а структуры внутренней капсулы могут не показывать существенных изменений. На 21-е сут участок ишемического повреждения, как правило, не имеет четких границ, распространяется на часть височной доли и полностью охватывает внутреннюю капсулу с признаками спонгиоза белого вещества. Окружающая его ткань мозга деформируется за счет набухания и отека, внутри ядра инсульта и около него формируются множественные кисты.

Ядро ишемии вначале формируется в слоях II–VI, а затем распространяется на всю корковую пластинку от пиальной поверхности до подкоркового белого вещества. Фокус инсульта по периферии окружает пенумбра – зона жизнеспособных клеток шириной до 800 мкм. При иммуногистохимическом окрашивании на BDNF, GDNF и NT-3 выявляются пирамидные и непирамидные нейроны и глиальные клетки. Локализация нейротрофинов дифференцирована по слоям коры, зависит от экспозиции ишемии и удаленности от ядра инсульта (рис. 2).

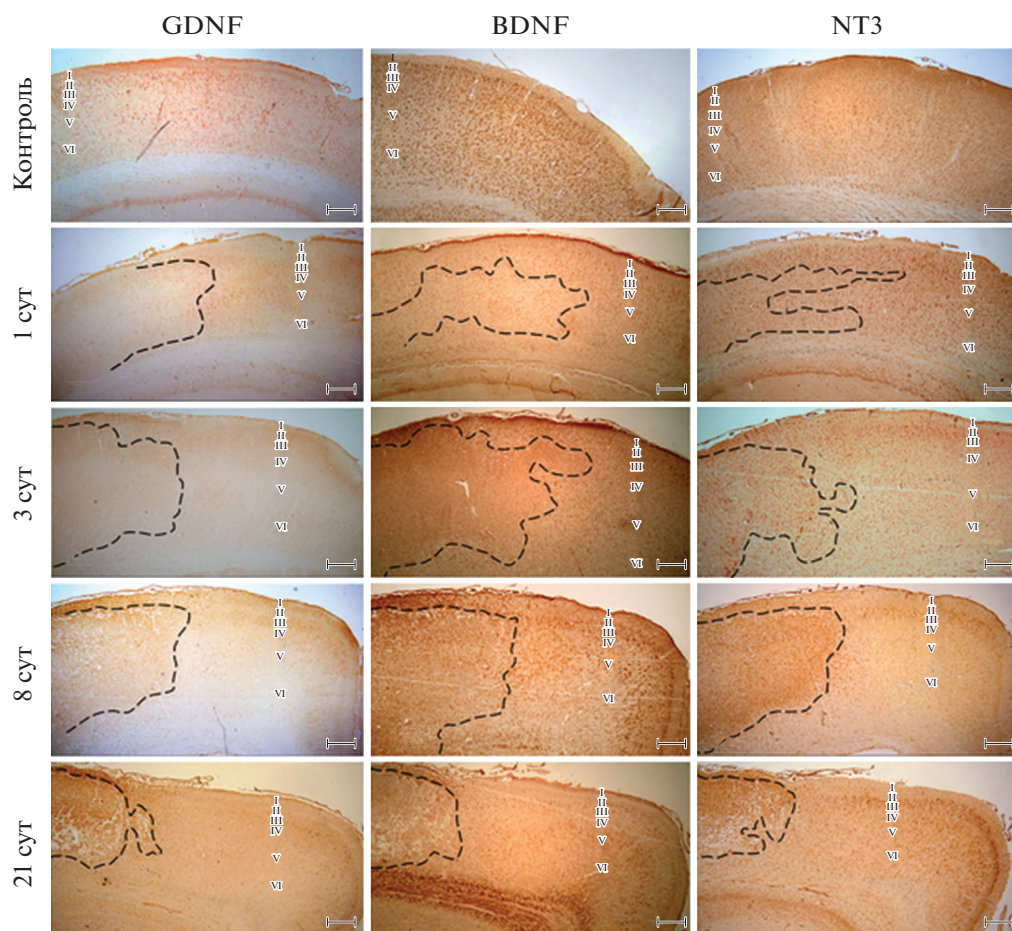
У контрольных животных BDNF-иммуореактивные нейроны обнаруживаются во всех слоях коры, имеют интенсивно окрашенный перикарион и первичные сегменты дендритов (рис. 2). Экспрессия



**Рис. 1.** Топографические границы фокуса ишемического инсульта (стрелки) в левом полушарии мозга крысы через 1 сут после окклюзии средней мозговой артерии. Коронарные срезы головного мозга, окрашенные ТТХ (раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида).

BDNF преобладает в пирамидных клетках, количество которых в контроле составляет  $81.3 \pm 1.1\%$ . В слое I с большим постоянством выявляются веретеновидные нейроны, имеющие морфологию типичных клеток Кахалы–Ретциуса. В глубоких слоях коры субпопуляция BDNF-позитивных интернейронов включает полиморфные и биполярные клетки. Динамика плотности BDNF-реактивных клеток у экспериментальных крыс в разных слоях коры значительно отличается от контрольной группы (рис. 3a). В 1-е сут ишемии в ядре инсульта маркируются пирамидные и непирамидные клетки слоев II и V с высокой степенью иммуореактивности и небольшие скопления бледно окрашенных нейронов в слоях I и VI. Здесь также выявляются редкие диффузно расположенные астроцитоподобные клетки.

На 3-и сут ишемии ядро инсульта становится полностью организованным. Большинство клеток здесь дистрофически изменено, они увеличены в размерах, перикарионы без четких контуров. В нейропиле наблюдаются признаки перивазального и перинеуронального отека. Границы слоев стерты,

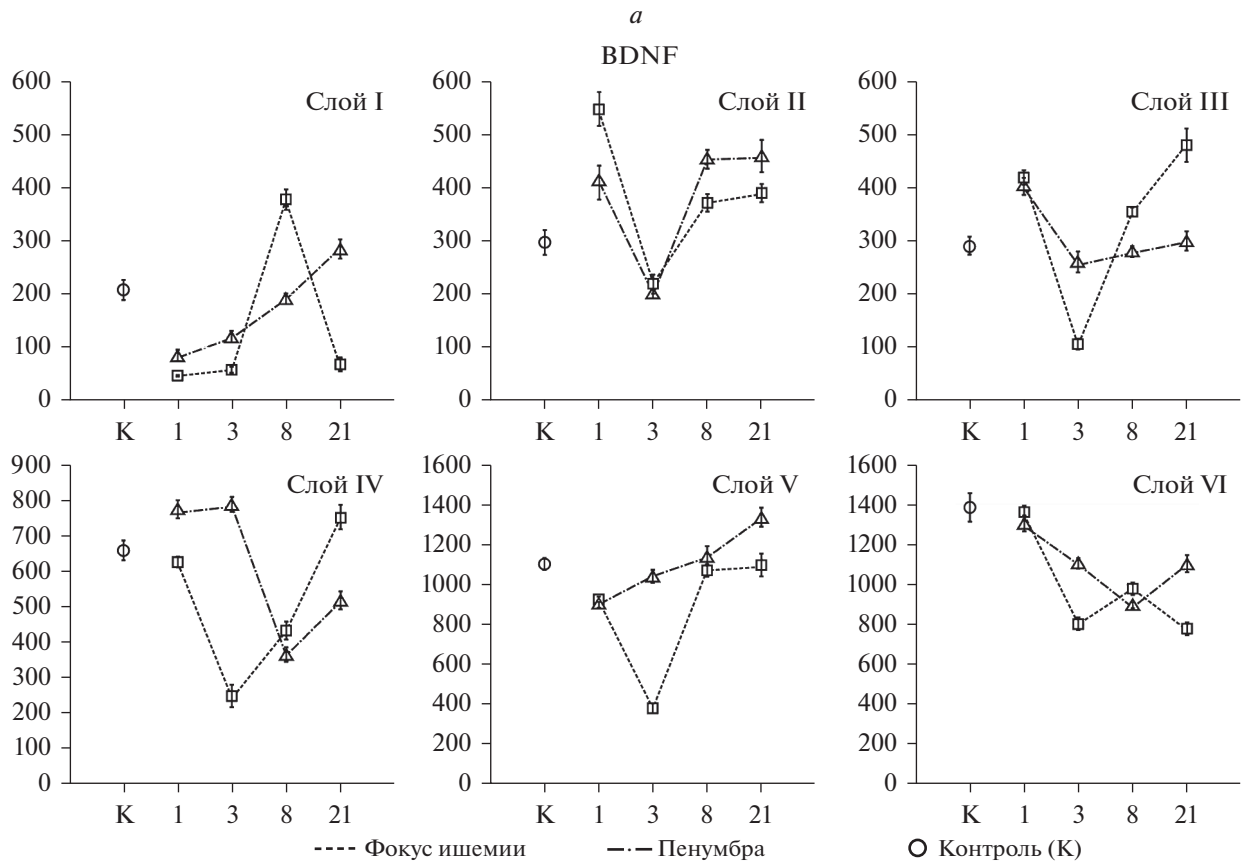
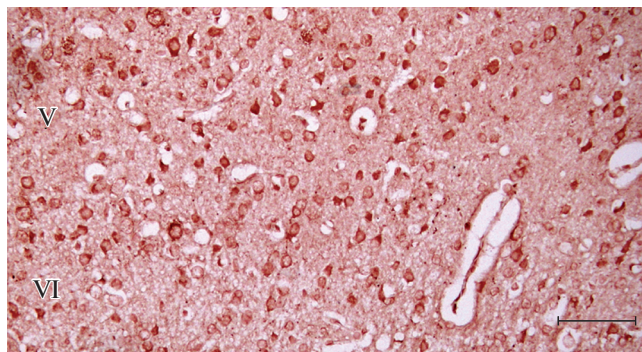


**Рис. 2.** Распределение BDNF-, GDNF- и NT-3-иммунореактивных клеток в теменной коре крыс в фокусе инсульта (выделен штриховой линией) и ишемической пенумбре. Масштабная линейка: 250 мкм.

четко определяются только слои I и II, в которых на BDNF окрашивается лишь  $9.8 \pm 2.1\%$  клеток от их общего количества в контроле. В остальных слоях встречаются редкие пирамидные клетки и астроциты с умеренной и слабой иммунореактивностью. На 8-е сут после операции в слое V выявляются единичные BDNF-позитивные клетки, а на 21-е сут в ядре ишемии нейроны и глиальные клетки не маркируются.

В зоне пенумбры BDNF-иммунореактивные клетки преобладают в слоях II, III и V. Их количество редуцируется в 1-е и 3-е сут ишемии, а, начиная с 8-х сут, постепенно увеличивается (рис. 3б). Количество таких клеток возрастает примерно на  $3.2 \pm 1.1\%$  на каждые 100–150 мкм латерально от границы ядра инсульта. При сравнении плотности маркированных клеток во II слое коры в ядре и пенумбре ни в одном из исследованных периодов ишемии достоверных различий не обнаружено. Однако в слоях V и VI на 3-и и 21-е сут после окклюзии плотность BDNF-иммунореактивных клеток в пенумбре достоверно превышает их количество в фокусе ишемии (рис. 3а).

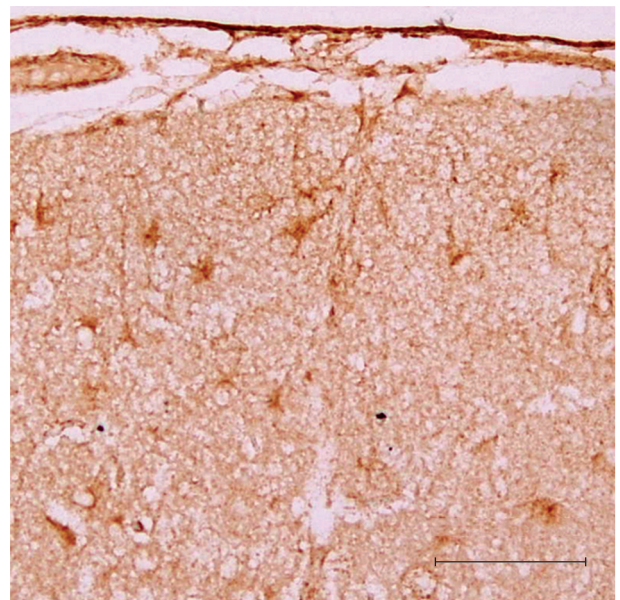
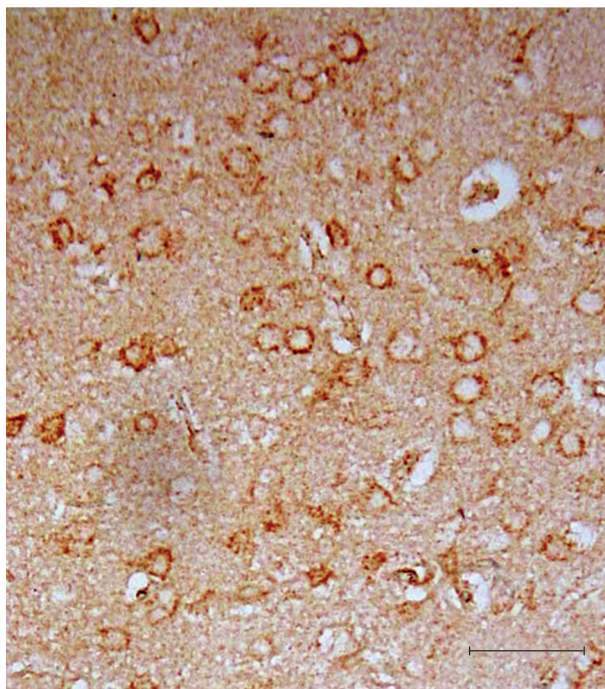
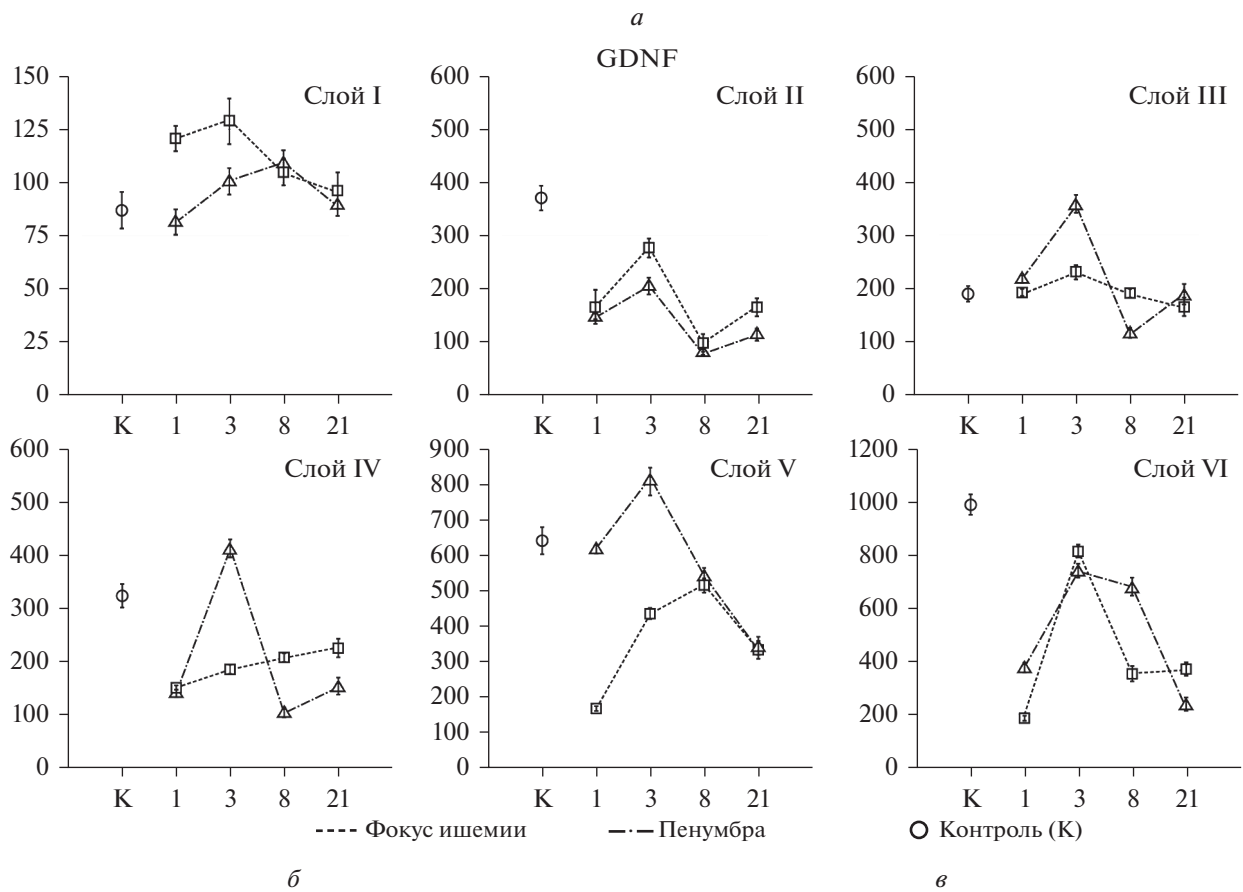
Высокую степень неоднородности демонстрирует топография иммунореактивного GDNF (рис. 4). У контрольных животных маркер локализуется в нейронах всех слоев коры, составляющих  $52 \pm 4.5\%$  от общего количества клеток. Относительное количество окрашенных нейронов в ядре инсульта неизменно снижается. В первые сутки после окклюзии СМА их выявляется  $29 \pm 2.1\%$ , на 8-е –  $13.8 \pm 0.6\%$ , а на 21-е –  $3.1 \pm 0.2\%$ . При этом в первые 3 сут плотность клеток в ядре ишемии значительно возрастает в слоях I и II и снижается в глубоких слоях коры (рис. 4а, б). Основную порцию GDNF-иммунореактивности в ядре и пенумбре на 8-е и 21-е сут эксперимента формируют глиальные клетки (рис. 4в). Сравнительная оценка плотности маркированных клеток в одинаковые сроки “ишемического” периода показывает различные значения по слоям коры в ядре инсульта и пенумбре (рис. 4а). Отметим, что в I слое выборочная дисперсия плотности клеток в контроле и экспериментальных группах значительно превосходит подобные значения в других слоях коры всех исследованных групп животных.

*b*

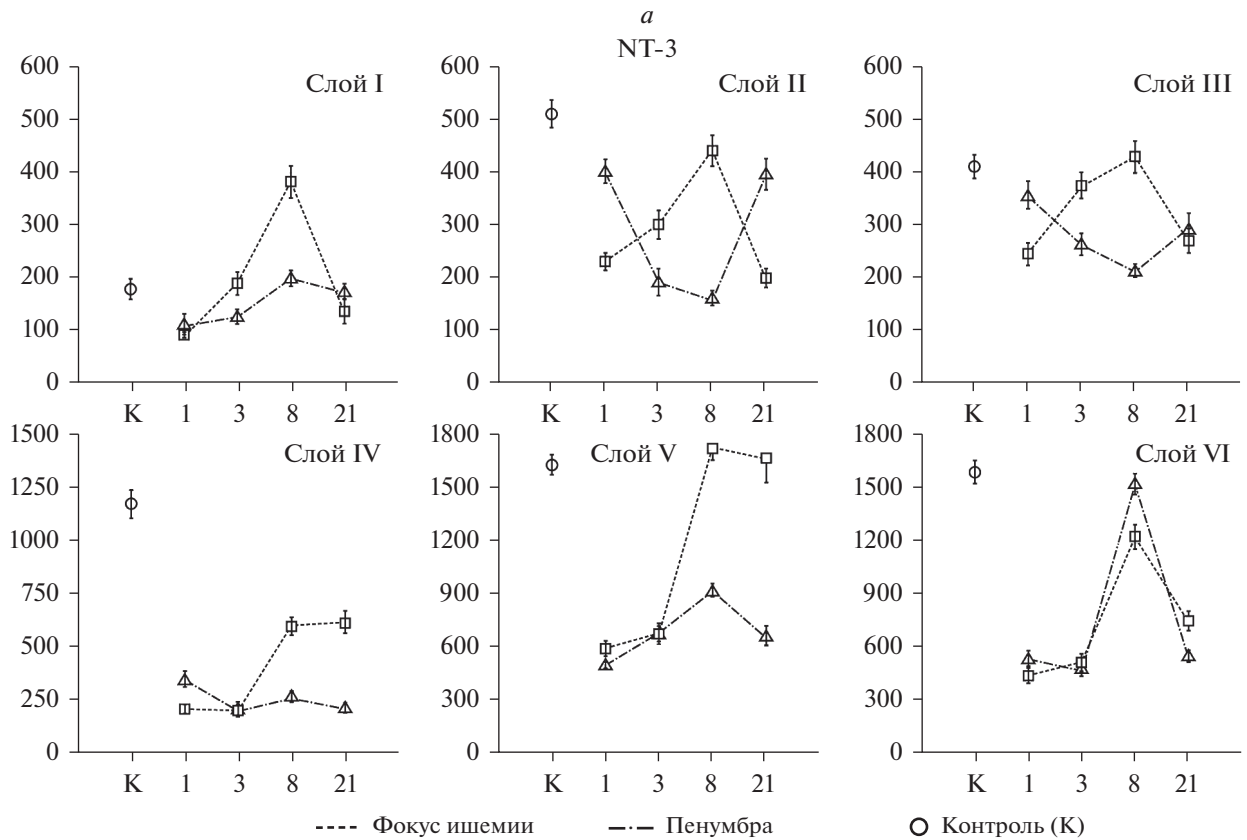
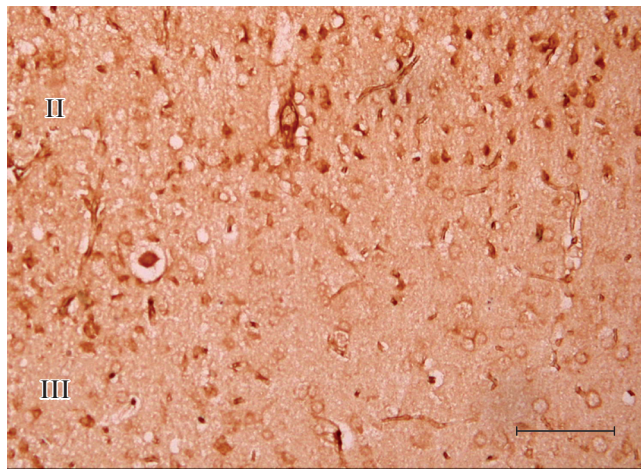
**Рис. 3.** Топография BDNF в теменной коре большого мозга крысы при постоянной окклюзии средней мозговой артерии. *a* – Изменение пространственной плотности (по оси ординат – кл./0.5 мм<sup>2</sup>) BDNF-иммунореактивных нейронов по слоям коры в контроле (K) и на разных сроках ишемического инсульта; по оси абсцисс – время после ишемии, сут; показаны средние значения и их ошибки (M±SEM),  $P < 0.05$ . *b* – BDNF-иммунореактивные нейроны в слоях V–VI области пенумбры на 8-е сут ишемии; масштабная линейка: 150 мкм.

При иммуногистохимическом выявлении NT-3 в неокортексе контрольных крыс обнаруживаются преимущественно пирамидные клетки, составляющие  $78.3 \pm 2.4\%$  от общего числа нейронов. В 1-е сут после индукции инсульта в ядре ишемии наблюдается снижение иммунореактивности по всему поперечнику коры с максимальной концентрацией реактивных клеток в слое II, в то время как в слоях III–IV

и VI их окрашивается относительно меньше (рис. 5). В пенумбре в этот период, напротив, отмечается нарастание пространственной плотности NT-3-иммунореактивных клеток с превалированием последних в слоях V и VI и достоверным снижением этих показателей в поверхностных слоях коры (рис. 5*a*). Отметим, что в I и VI слоях коры ни в одной из контрольных точек экспериментальной ишемии не отмечено



**Рис. 4.** Иммунолокализация GDNF в теменной коре крысы в условиях фокального ишемического инсульта. *a* – Пространственная плотность (по оси ординат – кл./0.5 мм<sup>2</sup>) GDNF-иммунореактивных нейронов по слоям коры в контроле (К) и на разных сроках ишемического инсульта; по оси абсцисс – время после ишемии, сут; показаны средние значения и их ошибки (M ± SEM), *P* < 0.05. *б* – GDNF-иммунореактивные нейроны в III слое пенумбры, 1 сут ишемии. *в* – Гиперэкспрессия GDNF в астроцитах слоя I области пенумбры на 8-е сут ишемии; масштабная линейка: 100 мкм.

*b*

**Рис. 5.** Распределение иммунореактивного NT-3 в теменной коре крысы при фокальном ишемическом инсульте. *a* – Изменение пространственной плотности (по оси ординат – клеток/ $0.5 \text{ мм}^2$ ) NT-3-иммунореактивных нейронов по слоям коры в контроле (К) и на разных сроках ишемического инсульта; по оси абсцисс – время после ишемии, сут; показаны средние значения и их ошибки ( $M \pm SEM$ ),  $P < 0.05$ . *b* – NT-3-иммунореактивные нейроны слоев II и III области пенумбры на 8-е сут ишемии; масштабная линейка: 150 мкм.

достоверных различий между плотностью клеток в зоне фокуса и пенумбры, в то время как в остальных слоях такие различия становятся ярко выраженными (рис. 5*a*).

На 3-и и 8-е сут эксперимента в ядре ишемии почти не встречаются NT-3-позитивные нейроны. Нейропилль здесь контрастирует за счет диффузного окрашивания, в котором можно идентифицировать

астроциты, сопровождающие сосуды. Часто глиоциты группируются в обширные кластеры, простирающиеся на соседние слои. В пенумбре в этот период NT-3 экспрессируют в основном нейроны слоев II–III, в остальных слоях встречаются редкие диффузно рассеянные клетки (рис. 5б). В астроцитах иммунореактивность заметно снижается, а их скопления располагаются в непосредственной близости к ядру ишемии.

На 21-е сут в ядре инсульта между стенками кистоподобных лакун наблюдаются диффузно рассеянные мелкие NT-3-позитивные клетки с округлым или полигональным перикарионом. В этот удаленный период ишемии в пенумбре выявляется топографический паттерн иммунореактивности, соответствующий распределению NT-3 в контроле, хотя и при значительно меньшем количестве окрашенных клеток. Локализация исследованных нейротрофинов в одноименных участках коры контралатерального полушария сохраняет основной топографический паттерн их распределения в пенумбре на всех сроках ишемического повреждения.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе установлено гетерогенное распределение BDNF, GDNF и NT-3 в неокортексе крыс, которое дополняется их различной стратификацией в ядре инсульта и пенумбре на каждом сроке ишемии. Эти данные позволяют картировать цитопротективные эффекты НТ на основе топографии и типологической характеристики маркированных нейронов.

Очаг тотального некроза, ядро инсульта, окружается пенумброй – зоной обратимого ишемического повреждения, в которой наблюдается избирательная и отсроченная гибель клеток. В механизме этой избирательности участвует фактор, индуцируемый гипоксией  $\alpha 1$ , который запускает экспрессию апоптотических молекул и НТ (Barteczek et al., 2017; Sarkar et al., 2019). На моделях временной редукции церебрального кровотока показано, что в ядре ишемии в первую очередь погибают пирамидные нейроны средних и нижних корковых слоев, а в пенумбре – клетки слоев I–II и поверхностного уровня слоя III (Witte et al., 2000). Причины этого явления связывают с дифференцированной локализацией субъединицы GluR2 AMPA-рецепторов, имеющей ограниченную проницаемость для ионов  $Ca^{2+}$ . При инсульте GluR2 сдерживает распространение глутаматной гипервозбудимости, что наряду с апоптозом ГАМК-ергических нейронов вызывает неоднородную гибель клеток по слоям коры (Sommer, Kiessling, 2002). Иммунолокализация исследованных нами НТ согласуется с описанным порядком ишемического повреждения только в первые сутки инсульта, когда в ядре и пенумбре плотность окрашенных нейронов демонстрирует противоположные тренды. Первоначальной реакцией на окислительный стресс является

тотальная редукция маркированных клеток на стороне повреждения. В отсроченный период эти показатели увеличиваются, однако существенно варьируют для каждого типа НТ.

Достоверное снижение количества маркированных клеток в соответствующих слоях ядра и пенумбры может быть связано с аноксической гибелью части нейронов. Остальная их популяция характеризуется селективной устойчивостью и высоким уровнем экспрессии НТ. К ним относятся пирамидные нейроны супра- и инфрагранулярных слоев, и в меньшей степени – интернейроны слоев I и VI. Данные настоящей работы отвечают быстрой и активной экспрессии генов НТ и их рецепторов с максимумом через 72 ч после окклюзии средней мозговой артерии (Дмитриева и др., 2016). Нарастание синтеза НТ при увеличении экспозиции фокальной ишемии способно успешно компенсировать ишемию мозга (Митрошина и др., 2019). При этом нейроны слоя IV в ядре инсульта не выявляются, а в пенумбре их количество значительно редуцировано. Слой IV отличается значительной концентрацией возбуждающих глутаматергических связей, которые формируют таламокортикальные афференты и шипиковые звездчатые клетки (Andjelic et al., 2009). Можно полагать, что эти нейроны лишаются нейротрофиновой поддержки в период ишемической гипервозбудимости и поражаются в первую очередь. Относительно небольшая популяция BDNF- и NT-3-позитивных клеток обнаружена нами в ядре инсульта на 8-ой и 21-ый день после операции. Вероятно, эта иммунореактивность связана с наличием НТ в некоторой порции глиальных клеток и, в частности, микроглии, количество которых в этот период значительно возрастает (Kalinichenko et al., 2020).

Однако не всегда индукция НТ воспроизводит заметный протективный эффект. Молекулы BDNF и NT-3 секретируются в виде смеси предшественников и их зрелых форм, имеющих разные рецепторные мишени и функциональную активность. Например, proBDNF специфически активизирует сцепленный с сортином рецептор смерти  $p75NTR$  и запускает апоптоз, а зрелая форма BDNF регулирует TrkB и репаративные процессы (Sasi et al., 2017). На модели фототромбоза кортикальных сосудов установлено, что proBDNF экспрессируется уже через 6 ч от начала инсульта, а его созревание завершается к концу первых суток. При этом пиковые значения экспрессии  $p75NTR$  отмечаются в течение 3 сут ишемии (Rahman et al., 2018). Баланс этих влияний остается критическим в оценке протективных свойств НТ. Поскольку в нейропиле присутствуют обе их фракции, обнаруженная нами валовая индукция иммунореактивного BDNF может не коррелировать с общим количеством жизнеспособных клеток.

Если границы ядра инсульта, как правило, определяются четко, то ареал распространения пенумбры при микроскопии коры не всегда столь очевиден.



Своеобразным маркером границ пенумбры могут служить скопления активированных астроцитов с индуцибельной экспрессией GFAP и GDNF (Kalinichenko et al., 2020). Локализация BDNF- и NT-3-позитивных клеток в разные периоды корковой ишемии закономерно смещается в латеральном и вертикальном направлениях от ядра инсульта. Этот факт указывает на динамические изменения границ нейропротективной зоны и согласуется с гипотезой, рассматривающей пенумбру как мозаику из множества микролокусов переживающих инсульт нейронов (del Zoppo et al., 2011). Эта особенность касается и контралатерального полушария, где при экспериментальном инсульте наблюдается индукция экспрессии NT-3, TrkA и TrkC (Дмитриева и др., 2016), а по нашим данным формируется сходный с пенумброй паттерн иммунолокализации НТ.

Данные настоящего исследования указывают на тесные метаболические отношения астроцитов и нейронов, адаптирующие их к условиям ишемии. Установленное нами постепенное смещение GDNF-иммунореактивности из нейронального в глиальный компартмент пенумбры следует рассматривать как проявление протективных свойств нейротрофина. Способность астроцитов аккумулировать высокие уровни GDNF показана на различных моделях ишемического инсульта (Mitroshina et al., 2019). Механизмы подобных взаимосвязей остаются неясны. Однако известно, что индукцию GDNF в астроцитах опосредуют аденозиновые A<sub>2A</sub>-рецепторы (Ke et al., 2012). Можно полагать, что аноксия быстро истощает нейронный пул АТФ, вызывает нарастание уровня аденозина в нейропиле и вторичное накопление GDNF в астроцитарной глии. Если это действительно так, то GDNF здесь противостоит вазоконстрикторному действию АТФ, которое при нарушении кровотока может усиливать ишемический процесс (McConnell et al., 2017).

Таким образом, избирательная локализация BDNF, NT-3 и GDNF выступает значимым индикатором защитных и нейродеструктивных процессов при ишемическом повреждении. Эти данные представляют особый интерес для выяснения механизмов нейрохимической адаптации и разработки прецизионных средств фармакологической коррекции состояния нейронов в условиях острого инсульта.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Постоянная окклюзия средней мозговой артерии вызывает закономерную альтерацию экспрессии НТ в нейронах теменной коры крыс. Иммунолокализация BDNF, NT-3 и GDNF характеризуется топографической гетерогенностью в ядре инсульта и ишемической пенумбре и динамично варьирует по слоям коры в разные периоды ишемии.

Пространственная плотность клеток, экспрессирующих НТ, заметно меняется в первые трое суток

инсульта, демонстрируя в ишемическом ядре и пенумбре противоположные топографические тренды. В ядре инсульта они концентрируются в слоях I–II. На 8-е сут ишемии НТ экспрессируется, главным образом, в клетках пенумбры. При этом иммунореактивный BDNF локализуется в нейронах слоев II–III и V, NT-3 – в слоях II–III, GDNF – в астроцитах. В пенумбре основная порция иммунореактивных клеток сосредоточена в поверхностных слоях коры. Данные исследования впервые демонстрируют избирательную локализацию НТ в разных типах нейронов. Различная стратификация НТ в коре и динамика их изменений определяет смещение границ ишемической пенумбры в разные периоды инсульта.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановой темы № 01201350008 Тихоокеанского государственного медицинского университета Минздрава России (Владивосток).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных проводили в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского союза 2010 г. Все экспериментальные процедуры были одобрены Междисциплинарным комитетом по этике Тихоокеанского государственного медицинского университета Минздрава России (протокол № 4 от 6 марта 2013 г.).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дмитриева В.Г., Ставчанский В.В., Поварова О.В., Скворцова В.И., Лимборская С.А., Дергунова Л.В. 2016. Влияние ишемии на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в структурах мозга крыс вне очага повреждения, включая противоположное полушарие. Мол. биология. Т. 50. № 5. С. 775. (Dmitrieva V.G., Stavchansky V.V., Povarova O.V., Skvortsova V.I., Limborska S.A., Dergunova L.V. 2016. Effects of ischemia on the expression of neurotrophins and their receptors in rat brain structures outside the lesion site, including on the opposite hemisphere. Mol. Biol. (Mosk.) V. 50. № 5. P. 775.)
- Калиниченко С.Г., Матвеева Н.Ю., Коробцов А.В. 2020. Нейротрофический фактор мозга (BDNF) как регулятор апоптоза в условиях фокального экспериментального инсульта. Бюлл. эксп. биол. и мед. Т. 169. № 5. С. 634. (Kalinichenko S.G., Matveeva N.Y., Korobtsov A.V. 2020. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a regulator of apoptosis under conditions of focal experimental stroke. Bull. Exp. Biol. Med. V. 169. № 5. P. 701.)
- Коробцов А.В., Калиниченко С.Г. 2017. Экспериментальные стратегии исследования ишемического инсульта. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Т. 117. № 12-2. С. 38. (Korobtsov A.V., Kalinichenko S.G.

2017. The experimental strategies in the study of ischemic stroke. *Zh. Nevrol. Psikhiatr. im S.S. Korsakova*. V. 117. № 12-2. P. 38.)
- Митрошина Е.В., Мищенко Т.А., Шишкина Т.В., Ведунова М.В.* 2019. Роль нейротрофических факторов BDNF и GDNF в адаптации нервной системы к действию факторов ишемии. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. Т. 2. С. 121. (*Mitroshina E.V., Mishchenko T.A., Shishkina T.V., Vedunova M.V.* 2019. Role of neurotrophic factors BDNF and GDNF in nervous system adaptation to the Influence of ischemic factors. *Bull. Exp. Biol. Med.* V. 167. P. 574.)
- Попова Н.К., Ильчибаева Т.В., Науменко В.С.* 2017. Нейротрофические факторы (BDNF, GDNF) и серотонинергическая система мозга. *Биохимия*. Т. 82. № 3. С. 449. (*Popova N.K., Ilchibaeva T.V., Naumenko V.S.* 2017. Neurotrophic factors (BDNF and GDNF) and the serotonergic system of the brain. *Biochemistry (Mosc.)* V. 82. № 3. P. 308.)
- Andjelic S., Gallopin T., Cauli B., Hill E.L., Roux L., Badr S., Hu E., Tamás G., Lambolez B.* 2009. Glutamatergic nonpyramidal neurons from neocortical layer VI and their comparison with pyramidal and spiny stellate neurons. *J. Neurophysiol.* V. 101. P. 641.
- Bartczek P., Li L., Ernst A.S., Böhler L.I., Marti H.H., Kunze R.* 2017. Neuronal HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  deficiency improves neuronal survival and sensorimotor function in the early acute phase after ischemic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* V. 37. P. 291.
- Beker M., Caglayan A.B., Beker M.C., Altunay S., Karacay R., Dalay A., Altıntas M.O., Kose G.T., Hermann D.M., Kilic E.* 2020. Lentivirally administered glial cell line-derived neurotrophic factor promotes post-ischemic neurological recovery, brain remodeling and contralesional pyramidal tract plasticity by regulating axonal growth inhibitors and guidance proteins. *Exp. Neurol.* V. 331. P. 113364. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113364>
- Bothwell M.* 2014. NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handb. Exp. Pharmacol.* V. 220. P. 3.
- Boyce V.S., Mendell L.M.* 2014. Neurotrophic factors in spinal cord injury. *Handb. Exp. Pharmacol.* V. 220. P. 443.
- Bronfman F.C., Lazo O.M., Flores C., Escudero C.A.* 2014. Spatiotemporal intracellular dynamics of neurotrophin and its receptors. Implications for neurotrophin signaling and neuronal function. *Handb. Exp. Pharmacol.* V. 220. P. 33.
- del Zoppo G.J., Sharp F.R., Heiss W.D., Albers G.W.* 2011. Heterogeneity in the penumbra. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* V. 31. P. 1836.
- Ibáñez C.F., Andressoo J.O.* 2017. Biology of GDNF and its receptors – Relevance for disorders of the central nervous system. *Neurobiol. Dis.* V. 97 (Pt B). P. 80.
- Jiang M.Q., Zhao Y.Y., Cao W., Wei Z.Z., Gu X., Wei L., Yu S.P.* 2017. Long-term survival and regeneration of neuronal and vasculature cells inside the core region after ischemic stroke in adult mice. *Brain Pathol.* V. 27. P. 480.
- Kalinichenko S.G., Korobitsov A.V., Matveeva N.Y., Pushchin I.I.* 2020. Structural and chemical changes in glial cells in the rat neocortex induced by constant occlusion of the middle cerebral artery. *Acta Histochem.* V. 122. P. 151573. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151573>
- Ke R.H., Xiong J., Liu Y.* 2012. Adenosine A2a receptor induces GDNF expression by the Stat3 signal in vitro. *Neuroreport*. V. 23. P. 958.
- Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T., Ooneda G.* 1986. Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn. J. Stroke*. V. 8. P. 1.
- Liu Z., Chopp M.* 2016. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Prog. Neurobiol.* V. 144. P. 103.
- Liu W., Wang X., O'Connor M., Wang G., Han F.* 2020. Brain-derived neurotrophic factor and its potential therapeutic role in stroke comorbidities. *Neural Plast.* 2020. P. 1969482. <https://doi.org/10.1155/2020/1969482>
- McConnell H.L., Kersch C.N., Woltjer R.L., Neuwelt E.A.* 2017. The translational significance of the neurovascular unit. *J. Biol. Chem.* V. 292. P. 762.
- Miranda M., Morici J.F., Zaroni M.B., Bekinschtein P.* 2019. Brain-derived neurotrophic factor: a key molecule for memory in the healthy and the pathological brain. *Front. Cell Neurosci.* V. 13. P. 363. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00363>
- Mitroshina E.V., Mishchenko T.A., Shirokova O.M., Astrakhanova T.A., Loginova M.M., Epifanova E.A., Babaev A.A., Tarabykin V.S., Vedunova M.V.* 2019. Intracellular neuroprotective mechanisms in neuron-glia networks mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Oxid Med. Cell Longev.* 2019. P. 1036907. <https://doi.org/10.1155/2019/1036907>
- Pöyhönen S., Er S., Domanskyi A., Airavaara M.* 2019. Effects of neurotrophic factors in glial cells in the central nervous system: expression and properties in neurodegeneration and injury. *Front. Physiol.* V. 10. P. 486. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00486>
- Rahman M., Luo H., Sims N.R., Bobrovskaya L., Zhou X.F.* 2018. Investigation of mature BDNF and proBDNF signaling in a rat photothrombotic ischemic model. *Neurochem. Res.* V. 43. P. 637.
- Sarkar S., Chakraborty D., Bhowmik A., Ghosh M.K.* 2019. Cerebral ischemic stroke: cellular fate and therapeutic opportunities. *Front. Biosci.* V. 24. P. 435.
- Sasi M., Vignoli B., Canossa M., Blum R.* 2017. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Pflugers Arch.* V. 469. P. 593.
- Sims S.K., Rizzo A., Howard K., Farrand A., Boger H., Adkins D.L.* 2020. Comparative enhancement of motor function and BDNF expression following different brain stimulation approaches in an animal model of ischemic stroke. *Neurorehabil. Neural Repair.* V. 34. P. 925.
- Sommer C.J.* 2017. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* V. 133. P. 245.
- Sommer C., Kiessling M.* 2002. Ischemia and ischemic tolerance induction differentially regulate protein expression of GluR1, GluR2, and AMPA receptor binding protein in the gerbil hippocampus: GluR2 (GluR-B) reduction does not predict neuronal death. *Stroke*. V. 33. P. 1093.
- Witte O.W., Bidmon H.J., Schiene K., Redecker C., Hagemann G.* 2000. Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* V. 20. P. 1149.

## **Immunolocalization of BDNF, GDNF, and NT-3 in the Rat Parietal Cortex after the Permanent Occlusion of the Middle Cerebral Artery**

**S. G. Kalinichenko<sup>a, \*</sup>, A. V. Korobtsov<sup>a</sup>, and N. Yu. Matveeva<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Department of Histology, Embryology and Cytology, Pacific State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Vladivostok, 690002 Russia*

*\*e-mail: sgkalinichenko@gmail.com*

The immunolocalization of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the parietal cortex of rats was studied in a model of focal stroke caused by permanent occlusion of the middle cerebral artery. The spatial density of stained cells constantly varies across the layers of the cortex and at different periods of the ischemic process, demonstrating opposite topographic trends in the stroke nucleus and penumbra. All investigated neurotrophins are characterized by a significant reduction of immunoreactive cells in layers IV–VI of the cortex on the first and third days of ischemia. In the supragranular layers, their number remains relatively stable, or slightly decreases in comparison with the control. On the 8th day of ischemia neurotrophins are almost not detected in neurons of the nucleus of the stroke, and induction of immunoreactivity occurs in the penumbra. In penumbra NT-3-immunoreactive neurons prevail in layers II–III, BDNF is detected in neurons of layers II–III and V, and astrocytes constitute the main population of GDNF-immunoreactive cells. The topography of neurotrophins in the contralateral hemisphere follows the pattern of their localization in the area of the penumbra. The heterogeneous stratification of neurotrophins and their selective response to ischemic damage are determined by their different participation in the maintenance of cytoprotective and neurodestructive effects.

*Keywords:* brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, glial cell line-derived neurotrophic factor, selective neuroprotection, middle cerebral artery occlusion, stroke