

УДК 616.8-00

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОЙ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ СИСТЕМЫ ГИППОКАМПА КРЫС, ВЫЗВАННЫХ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИЕЙ

© 2022 г. О. В. Ветровой^{1, 2, *}, В. А. Стратилова¹, Е. В. Ломерт³, Е. И. Тюлькова¹

¹ Лаборатория регуляции функций нейронов мозга,

ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Кафедра биохимии, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Группа молекулярной генетики опухолевых клеток, ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 21.01.2022 г.

После доработки 17.02.2022 г.

Принята к публикации 26.02.2022 г.

В настоящем исследовании было проведено изучение влияния нейропротективного метода трехкратной умеренной гипобарической гипоксии, предъявляемой на 8–10 сут постнатального развития, на содержание серотониновых рецепторов 7-го типа (5HT7R), уровень мРНК глюкокортикоидных рецепторов (*nr3c1*), глюкокортикоид-зависимых генов рецептора кортиколиберина 1го типа (*crhr1*) и $\alpha 7$ субъединицы рецептора ацетилхолина (*chnra7*) в гиппокампе 2-недельных контрольных крысят и крысят, перенесших пренатальную гипоксию (ПГ). ПГ вызывает увеличение содержания белка 5HT7R, а также ведет к уменьшению количества мРНК как глюкокортикоидных рецепторов (*nr3c1*), так и мишеней глюкокортикоид-зависимой транскрипции (*crhr1*, *chnra7*) в гиппокампе. Сеансы 3 УГГ вызывают снижение экспрессии 5HT7R на уровне белка в гиппокампе ПГ крысят до контрольного уровня, не влияя на этот показатель у контрольных животных. 3 УГГ не оказывает влияние на содержание мРНК *nr3c1*, *crhr1* и *chnra7* в гиппокампе контрольных и ПГ крысят. Результаты свидетельствуют о том, что стимуляция мозга крыс в раннем неонатальном периоде сеансами умеренной гипоксии не является достаточно эффективным методом предотвращения в раннем онтогенезе нарушений глюкокортикоидной системы гиппокампа, вызванных пренатальной гипоксией, однако позволяют предположить отсроченные корректирующие эффекты данного метода.

Ключевые слова: пренатальная гипоксия, умеренная гипобарическая гипоксия, гиппокамп, 5HT7R, глюкокортикоидные рецепторы, глюкокортикоид-зависимая транскрипция

DOI: 10.31857/S1027813322030128

ВВЕДЕНИЕ

Ранний онтогенез – период пренатального и раннего постнатального развития, является наиболее значимым этапом для настройки функций клеток мозга [1, 2]. В отличие от зрелого организма, повреждающее действие на который приводит к нарушению функционирования уже сформировавшейся структуры, патологические воздействия в пренатальном периоде вызывают изменения настройки порогов чувствительности сигнальных систем развивающегося организма, которые сохраняются на протяжении дальнейшей жизни [3–5]. Проявляясь в младенчестве в нарушении физического, эмоционального и умственного развития ребенка, последствия пренатального стресса сохраняются у взрослых часто в латентной форме, усугубляясь с возрастом [6–9].

Особенно опасным стрессовым фактором в раннем онтогенезе является гипоксия [7, 10]. Ра-

нее нами было показано, что гипоксические эпизоды, предъявляемые беременным самкам крыс на 14–16 сут гестации, в период формирования гиппокампа плода, вызывают устойчивые нарушения функционирования глюкокортикоидной системы потомства [10], выражающиеся в нарушении экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе, снижении глюкокортикоид-зависимой транскрипции [4], ослаблении экстрагипоталамического контроля над глюкокортикоидной отрицательной обратной связью и, как следствие, увеличении базального уровня кортикостерона [10]. Данные особенности проявляются на протяжении всей жизни и ведут к ослаблению периферической рецепции глюкокортикоидов и, следовательно, нарушению реализации глюкокортикоид-зависимых функций, сопровождающаяся дисфункцией медиаторных систем мозга.

Известно, что стимуляция клеток гиппокампа серотонином, вырабатываемым проекциями дорсальных ядер шва [11], вовлекается в обеспечение стабильной экспрессии глюкокортикоидных ре-

* Адресат для корреспонденции: 199034 Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6; e-mail: vov210292@yandex.ru.

цепторов [12]. Было показано, что эффективность выброса серотонина может быть увеличена сеансами краткосрочной гипоксии за счет деполяризации клеточных мембран [13]. В рамках исследований, направленных на изучение эффектов нейротропных методов пре- и посткондиционирования было выявлено, что сеансы умеренной гипобарической гипоксии способствуют нормализации экспрессии глюкокортикоидных рецепторов у взрослых крыс, подвергавшихся гипоксии и тяжелому психоэмоциональному стрессу [14, 15]. Поэтому нами было сделано предположение о возможности использования трехкратной умеренной гипобарической гипоксии с целью перепрограммирования функциональной активности клеток гиппокампа крыс, переживших пренатальную гипоксию. Настоящее исследование было направлено на проверку этой гипотезы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и модель пренатальной гипоксии. Работа выполнена на взрослых самках крыс линии Wistar весом 300–350 г и их потомстве. Животные были получены из Биоколлекции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и содержались в лабораторных условиях при свободном доступе к воде и пище. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов были утверждены комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Для создания ПГ беременных самок помещали трижды (на 14, 15 и 16 сут беременности) в барокамеру проточного типа и снижали давление до 180 мм рт. ст, что соответствует 5% нормобарического кислорода. Длительность каждого воздействия составляла 3 ч, интервал между воздействиями – 24 ч. Перед рождением потомства беременных крыс рассаживали по отдельным клеткам, и в дальнейшем каждый помет содержался отдельно.

Последующая работа производилась на детенышах самцах. Половину контрольных и ПГ крысят подвергали трем сеансам умеренной гипобарической гипоксии (3 УГГ). Для создания 3 УГГ на 8, 9 и 10 сут постнатального периода крысят помещали в барокамеру проточного типа и снижали давление до 360 мм рт. ст, что соответствует 10% нормобарического кислорода. Длительность каждого воздействия составляла 2 часа, интервал между воздействиями – 24 ч. После каждого воздействия крысят возвращали в материнскую клетку. С целью стандартизации условий контрольных и ПГ животных, не подвергавших сеансам 3 УГГ, также помещали в барокамеру по аналогичному протоколу, но не снижали давление.

Таким образом, эксперименты проведены на 4 группах крыс: 1) контроль; 2) ПГ; 3) контроль + 3 УГГ; 4) ПГ + 3 УГГ (для каждой группы $n = 5$).

Подготовка проб мозга для анализа. Гиппокамп 2-недельных крысят быстро извлекали и замораживали для дальнейшей экстракции и анализа белков интереса методом вестерн блоттинга либо помещали в тризол (BC032, ExtractRNA, Евроген, Россия) для экстракции РНК и последующего количественного анализа мРНК интереса.

Вестерн блоттинг. Для экстракции белков гиппокампа 2-недельных крысят гомогенизировали в ручном гомогенизаторе стекло–стекло в 50 мМ Трис-НСI буфере (рН 8.0), содержащем 150 мМ NaCl, 1% тритон X-100, коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (78440, Thermo Scientific, США), инкубировали на качалке 30 мин при температуре +4°C, после чего центрифугировали 10 мин при 14000 g, отбирали супернатант и кипятили 5 мин с трехкратным буфером Лэммли.

Белки полученных тотальных лизатов гиппокампа разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли и осуществляли перенос на PVDF мембрану (Thermo Scientific, США). Далее, после блокировки в течение 1 часа в растворе 5% сухого молока на Трис-NaCl буфере (TBS, рН 7.4), мембраны инкубировали с моноклональными кроличьими антителами против 5HT7R (1 : 1000, ab128892, Abcam, США) и с поликлональными кроличьими антителами против β -актина (1 : 2000, a2066, Sigma Ald., США) в течение 2 ч при комнатной температуре. Мембраны отмывали в TBST буфере и инкубировали с козьими противокроличьими HRP-антителами (0.25 мкг/мл, a16096, Thermo Scientific, США) в течение 1 часа при комнатной температуре. После серии отмывок в буфере TBS, содержащем 0.1% Tween-20, осуществляли визуализацию белков интереса с применением хемилюминесцентного набора Clarity ECL (Bio-Rad, США) и используя систему документирования ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, США). Количественный анализ содержания белка 5HT7R проводили с использованием программы ImageJ (NIH, Bethesda, MD, США) нормируя данные на содержание β -актина.

Выделение и очистка РНК, обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени. Общую РНК из гиппокампа 2-недельных крысят изолировали, используя набор ExtractRNA (BC032, Евроген, Россия), очищали от ДНК с применением наборов DNaseI (EN0521, ThermoFisher, США) и CleanRNA Standard (BC033, Евроген, Россия) согласно инструкциям производителя. Синтез кДНК проводили из 1 мкг тотальной РНК используя набор MMLV Reverse Transcription Kit (SK021, Евроген, Россия). Количественную ПЦР в реальном времени проводили, используя набор qPCRmix-HS SYBR + LowROX (Евроген, Россия) на амплификаторе Real-Time CFX96 (Bio-Rad, США). Последовательности праймеров, температуры плавления и размеры фрагментов представлены в табл. 1.

Уровни содержания мРНК глюкокортикоидного рецептора (*nr3c1*), глюкокортикоид-зависи-

Таблица 1. Праймеры, использованные для количественной ПЦР в реальном времени

Ген	Праймеры 5'–3'	Температура плавления T , °C	Размер продукта, п. н.
Бета-2-микроглобулин (<i>b2m</i>)	Forward TGCCATTTCAGAAAACCTCCCC Reverse GAGGAAGTTGGGCTTCCCATT	57	73
Глюкокортикоидный рецептор (<i>nr3c1</i>)	Forward ATCATACAGACAATCAAG Reverse TACTCTTCATAGGATACC	55	156
Рецептор кортиколиберина Iго типа (<i>crhr1</i>)	Forward CGTCTTCATCTACTTCAACTC Reverse GGACCTCACTGTTCAGAA	62	86
α 7-субъединица рецептора ацетилхолина (<i>chrna7</i>)	Forward CTCTTGGGAATAACTGTCTT Reverse CGAAGTATTGTGCTATCA	55	105

мых генов рецептора кортиколиберина Iго типа (*crhr1*) и α 7 субъединицы рецептора ацетилхолина (*chrna7*), нормированные на содержание мРНК β -2 микроглобулина (*b2m*) в качестве референса, были исследованы с использованием $\Delta\Delta Ct$ метода.

Статистическая обработка результатов. Результаты обрабатывали с помощью пакетов анализа данных STATISTICA 7.0 Stat Soft, Inc и Microsoft Excel'2003, используя непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Изменения считали достоверными при $p \leq 0.05$. Все результаты представлены в виде среднего арифметического \pm SEM (standard error of mean).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки влияния сеансов 3 УГГ на количество серотониновых рецепторов 5HT7R в гиппокампе 2-недельных крысят, переживших ПГ, мы использовали метод вестерн блоттинг. ПГ вызывает увеличение количества 5HT7R по сравнению с контролем (185% от контроля) (рис. 1). Сеансы 3 УГГ не влияют на количество 5HT7R в гиппокампе контрольных крысят (113% от контроля), но вызывают снижение их количества у крысят, переживших ПГ (125% от контроля) (рис. 1).

Для оценки влияния сеансов 3 УГГ на уровень экспрессии гена глюкокортикоидных рецепторов (*nr3c1*) и эффективность глюкокортикоид-зависимой экспрессии генов (*crhr1*, *chrna7*) [16] в гиппокампе 2-недельных ПГ крысят был осуществлен количественный анализ мРНК этих генов. ПГ вызывает уменьшение количества *nr3c1* по сравнению с контролем (51% от контроля) (рис. 2а), что сопровождается уменьшением содержания мРНК глюкокортикоид-зависимых генов *crhr1* (рис. 2б) и *chrna7* (рис. 2в) (25% и 35% от контроля, соответственно). Сеансы 3 УГГ не влияют на уровень экспрессии *nr3c1* (рис. 2а) и глюкокортикоид-зависимую транскрипцию (рис. 2, б, в) ни у контрольных крысят, ни у крысят, подвергавшихся ПГ.

В настоящее время известным является факт того, что серотонинергическая стимуляция нейронов гиппокампа опосредованно через серотониновые рецепторы 5HT7R приводит к увеличе-

нию количества глюкокортикоидных рецепторов NR3C1 [12]. Ранее нами было показано, что патогномичным и опосредующим эндокринные эффекты пренатальной гипоксии симптомом является хроническое снижение количества NR3C1 и экспрессии генов, регулируемых данным транскрипционным фактором, в нейронах гиппокампа, сопровождающееся стабильным увеличением уровня кортикостерона в плазме крови [10]. Как

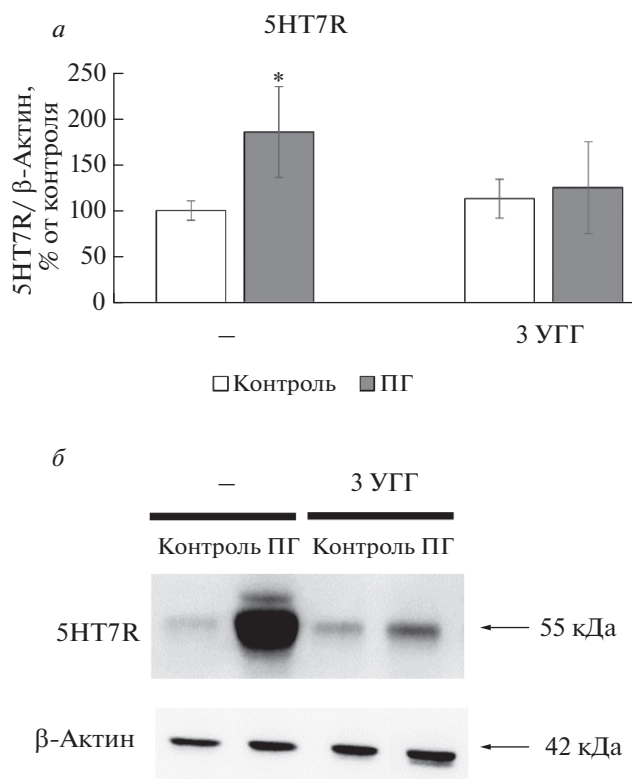


Рис. 1. Гистограмма (а) и фотография результатов анализа содержания белка 5HT7R методом вестерн блоттинга (б) в гиппокампе 2-недельных контрольных крысят и крысят, переживших ПГ на 14–16 сут эмбриогенеза, с последующими сеансами 3 УГГ на 8–10 сут постнатального развития либо без них. Данные нормированы на количество белка β -актина и представлены в % от контроля. * Различия с контролем статистически достоверны, $p \leq 0.05$ (U-критерий Манна–Уитни).

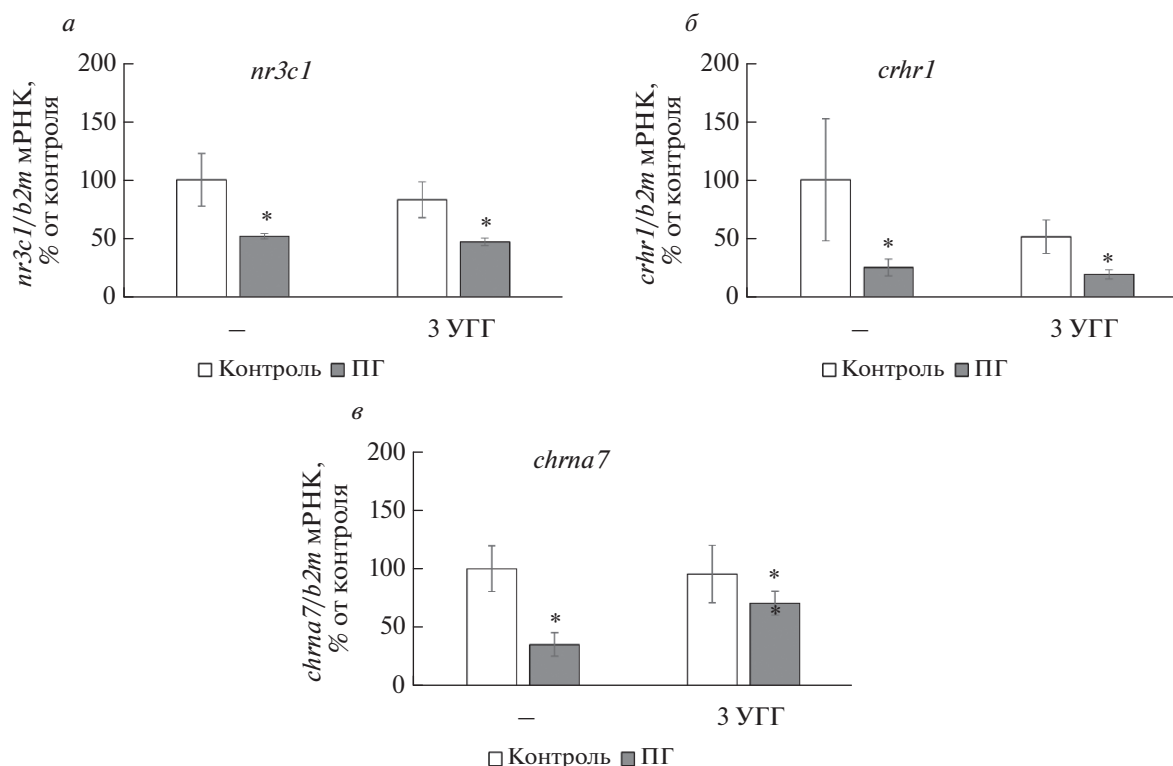


Рис. 2. Относительное содержание мРНК глюкокортикоидного рецептора *nr3c1* (а) и глюкокортикоид-зависимых генов рецептора кортиколиберина 1го типа *crhr1* (б) и $\alpha 7$ субъединицы рецептора ацетилхолина *chrna7* (в) в гиппокампе 2-недельных контрольных крысят и крысят, переживших ПГ на 14–16 сут эмбриогенеза, с последующими сеансами 3 УГГ на 8–10 сут постнатального развития либо без них. Данные нормированы на количество мРНК бета-2 микроглобулина *b2m* и представлены в % от контроля. * Различия с контролем статистически достоверны, $p \leq 0.05$ (U-критерий Манна–Уитни).

показано в настоящем исследовании, базальное количество 5HT7R в гиппокампе крысят, подвергавшихся пренатальной гипоксии, увеличено, что может быть рассмотрено как компенсаторный эффект недостаточного количества NR3C1 или же как следствие недостаточной серотониновой стимуляции исследуемой структуры мозга.

Вопреки нашему предположению, согласно которому увеличение серотониновой стимуляции гиппокампа вследствие сеансов умеренной гипобарической гипоксии должно способствовать нормализации уровня NR3C1 в этой структуре мозга крыс, переживших ПГ [11–15], гипотеза не оправдалась. Характерный для гипоксических состояний усиленный выброс серотонина [13] при изначально высоком уровне 5HT7R в гиппокампе ПГ крыс в ответ на сеансы умеренной гипоксии не привел ни к коррекции экспрессии глюкокортикоидных рецепторов NR3C1, ни, соответственно, к нормализации глюкокортикоид-зависимой транскрипции. Таким образом, сеансы умеренной гипоксии, предъявляемой на 8–10 сут постнатального онтогенеза ПГ крысам, не оказались в полной мере эффективным подходом для коррекции дисфункции глюкокортикоидной системы в гиппокампе развивающихся крыс, перенесших пренатальную гипоксию, однако способствовали нормализации количества серотониновых рецепторов.

Известно, что глюкокортикоиды негативно регулируют продукцию серотонина в ядрах шва [16]. При этом ядра шва у крыс формируются существенно раньше предъявляемых нами сеансов гипоксии [1] и, в отличие от гиппокампа, их развитие не должно быть подвержено влиянию стрессорного ответа материнского организма на гипоксию. В связи с этим наблюдаемое в данной работе увеличение экспрессии 5HT7R в гиппокампе крыс, подвергавшихся пренатальной гипоксии, может свидетельствовать о наличии дефицита серотониновой стимуляции данной структуры мозга вследствие избыточной глюкокортикоид-зависимой транскрипции в ядрах шва и, как следствие, ослабления синтеза и усиления деградации серотонина в этой структуре мозга. В свою очередь, нормализация количества 5HT7R в гиппокампе сеансами умеренной гипоксии животных, перенесших пренатальную гипоксию, вероятно отражает нормализацию активности серотониновой системы с помощью этого подхода.

В связи с существенной ролью серотонинергической системы мозга в развитии депрессивных расстройств [17, 18], дальнейшие детальные исследования особенностей взаимодействия серотонинергической и глюкокортикоидной систем в мозге крыс, подвергавшихся пренатальной гипоксии, позволят прояснить конкретные механизмы

формирования предрасположенности к депрессии в результате нарушений пренатального онтогенеза. Исследования отсроченных эффектов сеансов умеренной гипоксии на функциональную активность ядер шва, рецепцию серотонина экстрагипоталамическими структурами мозга и устойчивость животных к стрессовым воздействиям позволят прояснить значимость нормализации количества гиппокампальных серотониновых рецепторов в коррекции последствий пренатальной гипоксии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2020-921 от 13.11.2020) в рамках проекта “Научные центры мирового уровня” Павловский центр “Интегративная физиология — медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости”, направление: “Биологические и социальные основы инклюзии”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Golan H., Huleihel M. // *Dev. Sci.* 2006. V. 9. № 4. P. 338–349.
- Rice D., Barone S. // *Environ. Health Perspect.* 2000. V. 108. P. 511–533.
- Piešová M., Mach M. // *Physiol. Res.* 2020. V. 69. № 2. P. 199–213.
- Vetrovoy O., Stratilov V., Nimiritsky P., Makarevich P., Tyulkova E. // *Neurochem. Res.* 2021. V. 46. № 3. P. 550–563.
- Camm E.J., Cross C.M., Kane A.D., Tarry-Adkins J.L., Ozanne S.E., Giusanni D.A. // *FASEB J.* 2021. V. 35. № 5.
- Dudley K.J., Xiang L., Kobor M.S., Kippin T.E., Bredy T.W. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2011. V. 35. № 7. P. 1544–1551.
- Xiong F., Zhang L. // *Front. Neuroendocrinol.* 2013. V. 34. № 1. P. 27–46.
- Nalivaeva N.N., Turner A.J., Zhuravin I.A. // *Front. Neurosci.* 2018. V. 12.
- Wang B., Zeng H., Liu J., Sun M. // *Front. Neurosci.* 2021. V. 15.
- Vetrovoy O., Tyulkova E., Stratilov V., Baranova K., Nimiritsky P., Makarevich P., Rybnikova E. // *Dev. Neurosci.* 2021. V. 42. P. 145–158.
- Berumen L.C., Rodriguez A., Miledi R., Garcia-Alcocer G. // *Sci. World J.* 2012. V. 2012. P. 1–15.
- Laplante P., Diorio J., Meaney M.J. // *Dev. Brain Res.* 2002. V. 139. № 2. P. 199–203.
- Erdemli G., Crunelli V. // *Neurosci.* 2000. V. 96. № 3. P. 565–574.
- Rybnikova E., Mironova V., Pivina S., Tulkova E., Ordyan N., Nalivaeva N., Turner A., Samoilov M. // *Psychoneuroendocrinology.* 2007. V. 32. № 7. P. 813–823.
- Баранова К.А., Пивина С.Г., Рыбникова Е.А. // *Нейрохимия.* 2018. № 2. С. 126–131.
- Morsink M.C., Steenbergen P.J., Vos J.B., Karst H., Joels M., De Kloet E.R., Datson N.A. // *J. Neuroendocrinol.* 2006. V. 18. № 4. P. 239–252.
- Kraus C., Castrén E., Kasper S., Lanzenberger R. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2017. V. 77. P. 317–326.
- Yagishita S. // *Psychiatry. Clin. Neurosci.* 2020 V. 74. № 2. P. 91–98.

Possible Correction of Impaired Hippocampal Glucocorticoid System in Rats Induced by Prenatal Hypoxia

O. V. Vetrovoy^{a, b}, V. A. Stratilov^a, E. V. Lomert^c, and E. I. Tyulkova^a

^a Pavlov Institute of Physiology, RAS, St. Petersburg, Russia

^b St. Petersburg University, St. Petersburg, Russia

^c Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, Russia

In 2-weeks old rat pups we studied an effect of neuroprotective treatment by triple mild hypobaric hypoxia (3МНН), which has been applied on days 8-10th of postnatal development, on the content of serotonin receptors of type 7 (5HT7R), relative mRNA levels of glucocorticoid receptors (*nr3c1*) and also glucocorticoid-dependent genes of the CRH receptor of type 1 (*crhr1*) and $\alpha 7$ subunits of acetylcholine receptor (*chrna7*) in the hippocampus of control rat pups and pups that survived prenatal hypoxia (PH). PH leads to an increase in the 5HT7R levels but decreases levels of mRNA of the glucocorticoid receptor (*nr3c1*) gene, as well as of mRNA of the glucocorticoid-dependent genes (*crhr1*, *chrna7*) in the hippocampus. Three sessions of mild hypoxia reduced the levels of 5HT7R in rat hippocampus to the control but did not affect those parameters in the control group. 3МНН did not affect the levels of *nr3c1*, *crhr1* and *chrna7* mRNA in the hippocampus of the control and PH rat pups. The results indicate that stimulation of rat brain in the perinatal period by three sessions of mild hypoxia is not a sufficiently effective method for correcting the changes in the hippocampal glucocorticoid system, caused by prenatal hypoxia but suggest possible delayed beneficial effects of this method.

Keywords: prenatal hypoxia, mild hypobaric hypoxia, hippocampus, 5HT7R, glucocorticoid receptors, glucocorticoid-dependent transcription