

УДК 66.047

ТРАНСДУКЦИЯ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО КОНСТРУКТА НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА BDNF АКТИВИРУЕТ ЗАЩИТНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ НЕЙРОНОВ ПРИ ГИПОКСИИ И ИШЕМИИ*Е.А. Туровский^{1,2}, А.А. Бабаев², М.В. Туровская¹**Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия,**НИИ Нейронаук, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Россия,*

Известно, что кратковременная гипоксия, сменяющаяся реоксигенацией, оказывает как на клеточном уровне (Turovskaya et al., 2011), так и на уровне целого организма (Semenov et al., 2002) положительный эффект и способствует защите клеток мозга при длительном воздействии гипоксии или ишемии. При этом феномен гипоксического preconditionирования активируется в глутаматергических нейронах, а в тормозных ГАМКергических нейронах данный эндогенный защитный механизм отсутствует (Turovsky et al., 2013). Кроме этого, наряду с положительным эффектом, кратковременная гипоксия оказывает и отрицательные эффекты в виде симптомов постгипоксического гипервозбуждения в виде генерации спонтанных Ca^{2+} -импульсов во время реоксигенации ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Turovskaya et al., 2014). Длительная ишемия, которая наряду с гипоксией сопровождается снижением уровня глюкозы во внеклеточной среде, что вызывает повреждение и гибель клеток мозга, и, в первую очередь, ГАМКергических нейронов (Turovskaya et al., 2019; Turovskaya et al., 2020). Следовательно, эпизоды гипоксии или длительная ишемия оказывают наиболее выраженное повреждающее действие на ГАМКергические нейроны, что говорит о необходимости разработки способов селективной активации защитных сигнальных систем этих нейронов с одновременным усилением эндогенных защитных механизмов в глутаматергических нейронах.

В последние несколько лет появляется все больше работ, которые показывают важную роль нейротрофических факторов в защите клеток мозга от повреждающих факторов ишемии и их участие в активации механизмов preconditionирования (Gaidin et al., 2020). Одним из таких нейротрофинов является нейротрофический фактор мозга (BDNF), который широко представлен в различных отделах мозга. BDNF – нейротрофический фактор мозга, открытый в 1982 году, который представлен двумя типами – белком-предшественником, pro-BDNF и зрелым BDNF. Известно, что гипоксическое preconditionирование крыс с помощью трех эпизодов умеренной гипоксии вызывает увеличение уровня BDNF уже через 1 день и способствует устойчивости животных при травматическом стрессе (Baranova et al., 2015), однако механизмы и возможные отрицательные обратные связи этого изменения не исследованы. Более того, механизмы защитного действия сверхэкспрессии BDNF на различные популяции нейронов остаются не исследованными, также как и пути трансдукции сигналов, активируемые во время гипоксического preconditionирования. Для изучения эндогенных защитных механизмов глутаматергических и ГАМКергических нейронов гиппокампа нами был создан аденоассоциированный конструктор, селективно кодирующий последовательность BDNF в нейронах (рис. 1).

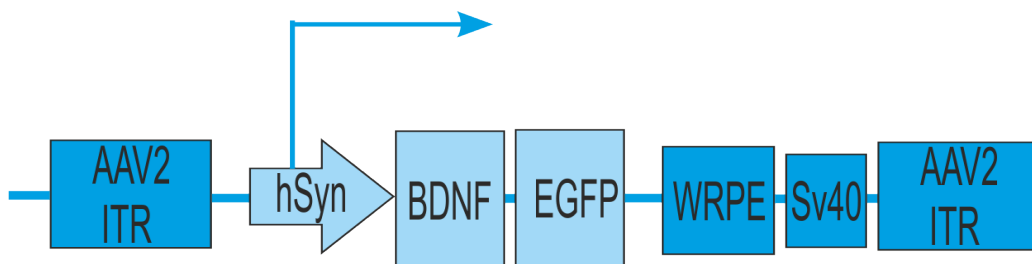


Рис. 1. Схема аденоассоциированного конструктора, несущего последовательность, кодирующую BDNF в нейронах. Обозначения: hSyn – ген человеческого промотора белка синапсина; BDNF – нейротрофический фактор головного мозга; Egfp (enhanced green fluorescent protein) – зеленый флуоресцентный белок; WPPE (Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element) – энхансер, регуляторный элемент, значительно усиливающий работу промотора синапсина hSyn; SV40 polyA – сигнальная последовательность, фланкированная ITR (Inverted terminal repeat) – повторами из AAV серотипа 2.

На рисунке 2А представлены Ca^{2+} -сигналы ГАМКергических (черная кривая) и глутаматергических (серая кривая) нейронов в ответ на кратковременные аппликации активатора NMDAR (10 мкМ NMDA в безмагниевой среде), эпизоды кратковременной гипоксии (Гип) и 10-минутные периоды реоксигенации (Реокс). Видно, что в среднем, амплитуда Ca^{2+} -сигналов у глутаматергических нейронов уменьшается после каждого последующего эпизода гипоксии, о чем также свидетельствует уменьшение тангенса угла наклона прямой, аппроксимирующей Ca^{2+} -ответы отдельных глутаматергических нейронов (рис. 2Б) на аппликацию NMDA. После первого эпизода гипоксии тангенс угла наклона прямой составляет $0,57 \pm 0,02$, после второго и третьего эпизодов – $0,39 \pm 0,07$ и $0,33 \pm 0,07$, соответственно. Такой феномен гипоксия-индуцированного уменьшения Ca^{2+} -ответов на активацию ионотропных рецепторов глутамата является проявлением гипоксического preconditionирования. В тоже время, в ГАМКергических нейронах, наоборот, происходит увеличение амплитуд Ca^{2+} -ответов на NMDA после эпизодов гипоксии (рис. 2А, черная кривая), а тангенс угла наклона прямой, аппроксимирующей эти ответы составляет $1,09 \pm 0,14$ после первого эпизода и достигает $1,11 \pm 0,18$ и $1,14 \pm 0,14$ после второго и третьего эпизодов гипоксии (рис. 2Б, обозначены звездочкой), что говорит об отсутствии феномена гипоксического preconditionирования.

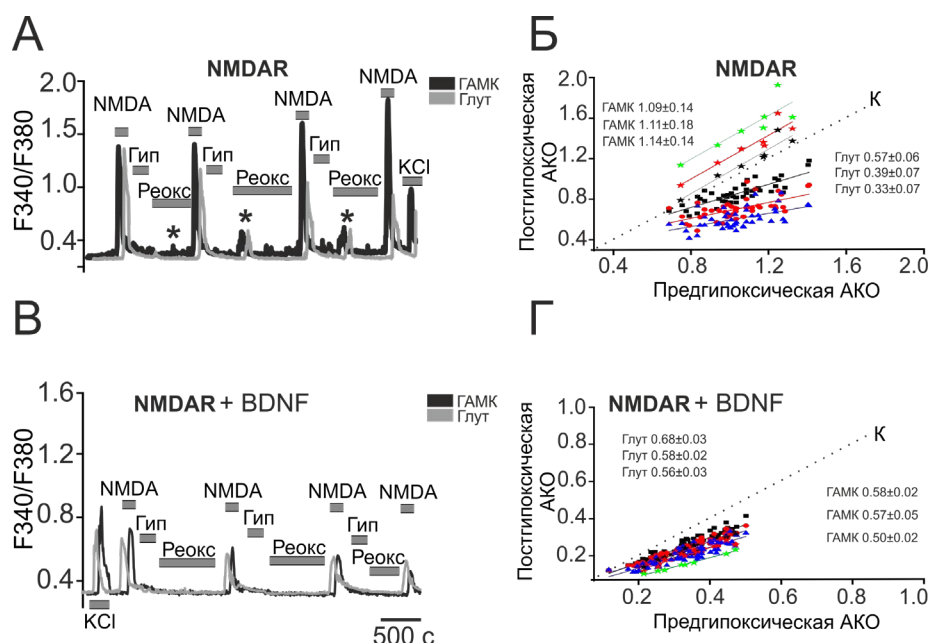


Рис. 2. Сверхэкспрессия BDNF активирует гипоксическое preconditioning NMDA-рецепторов в ГАМКергических нейронах. А, В – Усредненные Ca^{2+} -ответы не трансдуцированных (А) и трансдуцированных (В) BDNF-EGFP ГАМКергических (черная кривая) и глутаматергических (серая кривая) нейронов на аппликацию 10 мкМ NMDA в безмагниевой среде при действии кратковременных эпизодов гипоксии (Гип) и реоксигенации (Реокс). Б, Г – Зависимости амплитуды Ca^{2+} -ответа (АКО) на NMDA после эпизодов кратковременной гипоксии (Постгипоксическая АКО, отн. ед.) от амплитуды Ca^{2+} -ответа до гипоксии (Предгипоксическая АКО, отн. ед.) в ГАМКергических (ГАМК) и глутаматергических (Глут) нейронах, в которые трансдуцировали (Г) и не трансдуцировали BDNF-EGFP (Б). Представлены амплитуды Ca^{2+} -ответов и их аппроксимации линейной функцией для ГАМКергических (звездочки) и глутаматергических нейронов после одного (черные квадраты), двух (красные кружки) и трех (синие треугольники) эпизодов кратковременной гипоксии. Цифрами разного цвета показаны значения тангенса угла наклона аппроксимирующих прямых. Прямая К – линейная аппроксимация данных в контроле (без гипоксии).

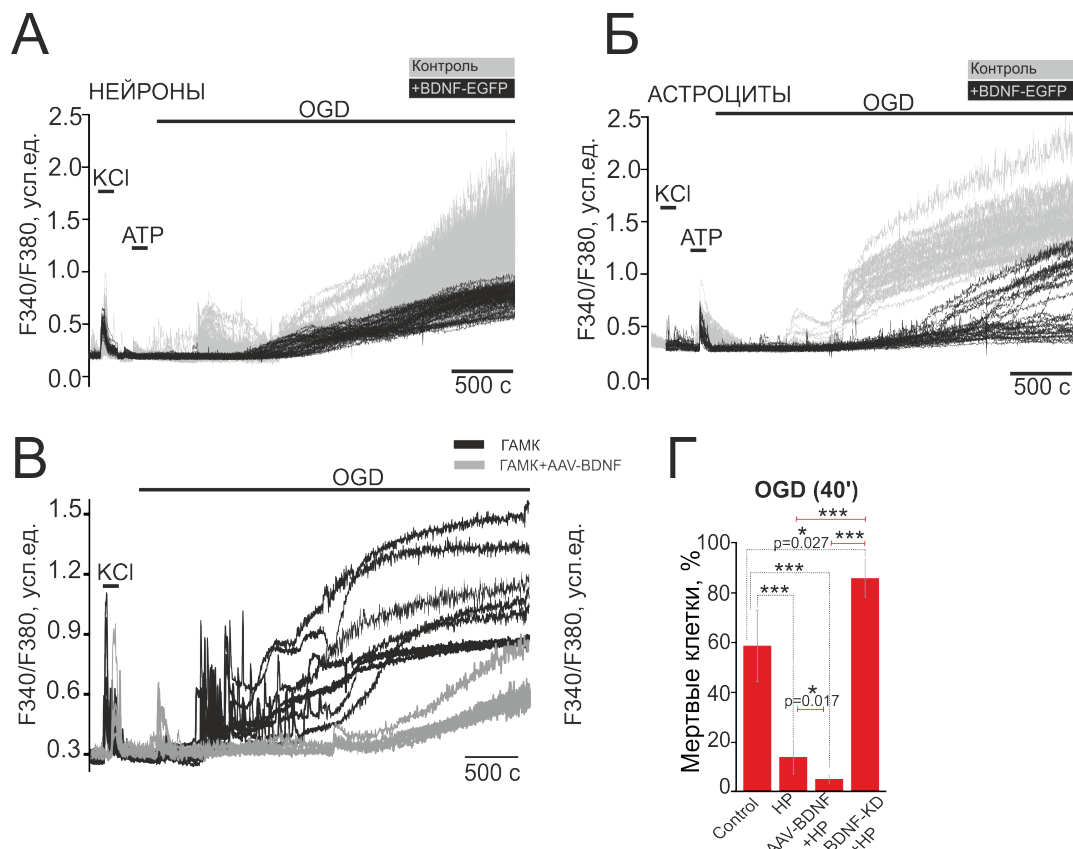


Рис. 3. Нейропротекторное действие сверхэкспрессии BDNF при ишемии (OGD). Эффекты, направленные на защиту ГАМКергических нейронов. А – Ca^{2+} -ответы контрольных нейронов (в культуру не трансдуцировали конструктор, кривые серого цвета) и нейронов из культуры, трансдуцированной конструктором (AAV) – Syn-BDNF-EGFP (кривые черного цвета) на OGD длительностью 40 минут. Б – Ca^{2+} -ответы контрольных астроцитов (в культуру не трансдуцировали конструктор, кривые серого цвета) и астроцитов из культуры, трансдуцированной конструктором (AAV) – Syn-BDNF-EGFP (кривые черного цвета) на 40 минут OGD. В – OGD-индуцированные Ca^{2+} -ответы ГАМКергических нейронов гиппокампа, которые трансдуцировали (серые кривые) и нет (черные кривые) (AAV) – Syn-BDNF-EGFP-конструктором. Г – Процент клеток, погибших вследствие некроза ($\% \pm SE$) после 40 минут OGD в экспериментальных группах: Control – контрольная группа; HP – клетки, прекоинкубированные эпизодами гипоксии; AAV-BDNF+HP – культура гиппокампа, трансдуцированная (AAV) – Syn-BDNF-EGFP-конструктором и прекоинкубированная эпизодами гипоксии; BDNF-KD+HP – клетки, трансфицированные siRNA против гена BDNF и прекоинкубированные эпизодами гипоксии. Клетки прекоинкубировали эпизодами гипоксии и на 24 часа возвращали в CO_2 -инкубатор

В клеточных культурах гиппокампа, нейроны которых трансдуцировали аденоассоциированным конструктором (BDNF-EGFP), который в течение 2–3 суток приводит к сверхэкспрессии BDNF, наблюдается уменьшение предгипоксической амплитуды Ca^{2+} -ответов на аппликацию 10 мкМ NMDA в безмагниевой среде (по сравнению с культурами без сверхэкспрессии BDNF) (не показано). Ca^{2+} -ответы индивидуальных глутаматергических нейронов как до эпизодов гипоксии, так и после них, лежат правее по оси X (рис. 2Г), по сравнению с глутаматергическими нейронами. Тангенс угла наклона линейной функции, аппроксимирующей эти ответы составляет $0,68 \pm 0,03$, $0,58 \pm 0,03$ и $0,56 \pm 0,03$ после каждого из трех эпизодов гипоксии. При этом в ГАМКергических нейронах (рис. 2В, черная кривая) культур, сверхэкспрессирующих BDNF, происходит уменьшение амплитуд Ca^{2+} -сигналов на аппликацию NMDA, что говорит об индукции феномена гипоксического прекоинкубирования. Тангенс угла наклона прямой, аппроксимирующей Ca^{2+} -ответы этих ГАМКергических нейронов уже после первого эпизода гипоксии составляет $0,58 \pm 0,02$ и с каждым последующим эпизодом гипоксии уменьшается до $0,57 \pm 0,05$ и $0,5 \pm 0,02$, соответственно (рис. 2Г, обозначены ГАМК).

Кроме того, для нейронов гиппокампа во время реоксигенации характерна генерация $s[Ca^{2+}]_i$, являющаяся признаком постгипоксического гипервозбуждения (рис. 2А, обозначено *), приводящих к повреждению и гибели определенных популяций ГАМКергических нейронов (Туровский и др., 2017; Turovskaya et al., 2020). При этом для культур, в нейронах которых сверхэкспрессируется BDNF, характерно полное подавление этих $s[Ca^{2+}]_i$ (рис. 2В), т. е. высокий уровень BDNF ингибирует постгипоксическое гипервозбуждение нейронов гиппокампа. Ишемия-подобные условия (OGD), индуцируемые с помощью депривации глюкозы и кислорода во внеклеточной среде, вызывают двухфазные Ca^{2+} -сигналы в нейронах (рис. 3А, серые кривые) и астроцитах (рис. 3Б, серые кривые), регистрируемые по увеличению флуоресценции витального Ca^{2+} -чувствительного зонда Fura-2. Первая фаза OGD-индуцированных Ca^{2+} -ответов является обратимой, а вторая фаза – представляет собой глобальное (необратимое) повышение $[Ca^{2+}]_i$, приводящее к повреждению и гибели клеток гиппокампа *in vitro*. В клеточных культурах, нейронам которых трансдуцировали конструктор (AAV) – Syn-BDNF-EGFP (рис. 3А) наблюдалось полное ингибирование первой (обратимой) фазы OGD-индуцированных Ca^{2+} -ответов, и подавление второй фазы глобального повышения $[Ca^{2+}]_i$ в 1,5 и 2,3 раза у нейронов (рис. 3А, черные кривые) и астроцитов (рис. 3Б, черные кривые), соответственно. Такое снижение Ca^{2+} -сигналов в ответ на OGD при сверхэкспрессии BDNF ведет за собой снижение числа погибших клеток, которое составляет 6 ± 5 %.

Для ГАМКергических нейронов при OGD характерны повышенные амплитуды Ca^{2+} -сигналов во время первой фазы клеточной реакции без полной отдачи $[Ca^{2+}]_i$ до уровня покоя, а также большие скорости нарастания $[Ca^{2+}]_i$ во время второй фазы (рис. 3В, черные кривые). Трансдукция (AAV) – Syn-BDNF-EGFP в нейроны гиппокампа приводит к существенному подавлению амплитуды Ca^{2+} -сигналов во время первой фазы ответа ГАМКергических нейронов на OGD, а также к многократному снижению скорости увеличения $[Ca^{2+}]_i$ во время второй фазы Ca^{2+} -ответов (рис. 3В, серые кривые), что способствует выживанию ГАМКергических нейронов. Интересно, что прекондиционирование клеточных культур гиппокампа эпизодами гипоксии приводит к снижению процента погибающих клеток от OGD до 20 %, тогда как в контроле через 40 минут OGD гибнет более 60 % нейронов (рис. 3Г). При этом прекондиционирование клеточных культур, трансдуцированных (AAV) – Syn-BDNF-EGFP-конструктором приводит к снижению процента погибающих клеток до 3 % и менее, тогда как нокадаун гена BDNF в клетках гиппокампа, наоборот, увеличивает гибель до 93 % (рис. 3Г).

Таким образом, сверхэкспрессия BDNF в нейронах гиппокампа вызывает появление феномена гипоксического прекондиционирования в ГАМКергических нейронах, направленного на уменьшение амплитуд Ca^{2+} -сигналов при активации NMDA-рецепторов. При этом в глутаматергических нейронах культур со сверхэкспрессией BDNF происходит усиление прекондиционирующего действия эпизодов гипоксии. При ишемии сверхэкспрессия полностью подавляет обратимую фазу OGD-индуцированного повышения $[Ca^{2+}]_i$ у нейронов и астроцитов, а также значительно ограничивает повышение $[Ca^{2+}]_i$ во время фазы его глобального роста, и, снижает процент погибающих по типу некроза клеток. Данный защитный эффект полностью отменяется в случае нокадауна гена BDNF, что говорит о ведущей роли данного нейротрофина в активации феномена гипоксического прекондиционирования и выживаемости различных типов нейронов во время ишемии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Turovskaya M.V. et al. Repeated brief episodes of hypoxia modulate the calcium responses of ionotropic glutamate receptors in hippocampal neurons // *Neurosci Lett*. 2011. – V.496. – P.11–14.
2. Semenov D.G., et al. Calcium transients in the model of rapidly induced anoxic tolerance in rat cortical slices: involvement of NMDA receptors // *Neurosignals* – 2002. – V.11. – No.6. – P.329–335.
3. Turovsky E.A., et al. Short-term episodes of hypoxia induces posthypoxic hyperexcitability and selective death of GABAergic hippocampal neurons // *Exp. Neurol.* – 2013. – V.250. – P.1–7.
4. Turovskaya M.V., et al. Short-term hypoxia induces a selective death of GABAergic neurons // *Biochemistry (Moscow) supplement. series a: membrane and cell biology* – 2014. – V.8. – No.1. – P.125–135.
5. Turovskaya M.V., et al. Taxifolin protects neurons against ischemic injury in vitro via the activation of antioxidant systems and signal transduction pathways of GABAergic neurons // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2019. – V.96. – P.10–24.
6. Turovskaya M.V., et al. BDNF overexpression enhances the preconditioning effect of short-term episodes hypoxia, promoting survival of GABAergic neurons // *Neurosci. Bull.* – 2020.
7. Baranova K.A., et al. The neurotrophin BDNF is involved in the development and prevention of stress-induced psychopathologies // *Neurochem. J.* – 2015. – V.9. – No.2. – P.108–115.
8. Туровский Е.А., et al. Кальций-связывающие белки защищают ГАМКергические нейроны гиппокампа от гибели при гипоксии и ишемии *in vitro* // *Биологические мембраны* – 2017. – Т.34. – № 5. – с. 77–89.
9. Gaidin S.G., et al. The selective BDNF overexpression in neurons protects neuroglial networks against OGD and glutamate-induced excitotoxicity // *Int j Neurosci.* – 2020. – V.26. – P.1–21.