

СЕЛЕКТИВНЫЙ АНКСИОЛИТИК АФОБАЗОЛ УВЕЛИЧИВАЕТ СОДЕРЖАНИЕ BDNF И NGF В КУЛЬТУРЕ ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ ЛИНИИ HT-22

Т. А. Антипова, Д. С. Сапожникова, Л. Ю. Бахтина, С. Б. Середенин¹

В опытах на культуре иммортализованных клеток гиппокампа мыши было показано, что инкубация с афобазолом в конечной концентрации 10^{-8} М приводит к увеличению содержания NGF, а в конечных концентрациях 10^{-8} М – 10^{-5} М к увеличению содержания BDNF.

Ключевые слова: афобазол, фактор роста нерва NGF, мозговой нейротрофический фактор BDNF, нейроны гиппокампа

ВВЕДЕНИЕ

Из литературы известно, что лиганды σ_1 -рецепторов опосредованно влияют на содержание мозгового нейротрофического фактора BDNF и фактора роста нервов NGF [8, 9]. На культуре клеток PC12 установлено, что гиперэкспрессия σ_1 -рецепторов усиливает NGF-индуцированный рост нейритов, а снижение концентрации NGF ведет к увеличению количества σ_1 -рецепторов [8]. Активация фосфолипазы C — гамма и последующего инозитолтрифосфат-зависимого сигнального каскада, вызванных BDNF, сопровождается повышением экспрессии σ_1 -рецепторов, что свидетельствует об их участии в процессах нейропротекции [9].

Ранее установлено, что афобазол является лигандом σ_1 -рецептора (IC₅₀-7.1E-06M) [7]. На культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22 зарегистрированы его нейропротекторные свойства при моделировании оксидативного стресса и глутаматной токсичности [2]. Исходя из совокупности приведенных данных, целью настоящей работы являлось изучение влияния афобазола на содержание мозгового нейротрофического фактора BDNF и фактора роста нервов NGF в культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях использовали клетки линии HT-22 (иммортализованные клетки гиппокампа мыши). Клетки рассевали по 350 тыс./лунку на 6-луночные планшеты (Corning and Costar), предварительно обработанные раствором поли-D-лизина (0,1 мг/мл). Эксперименты проводили на 3-й день после пассажа (при образовании монослоя). Клетки отмывали от культуральной среды раствором PBS. Для определения содержания NGF клетки соединяли с лизирующим буфером (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 % Triton X-100), pH 7,5 при температуре 4 °C, лизировали в течение 5 мин, затем соскребали, помещали в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали

ли 10 мин при 13000 rpm и 4 °C. Супернатант, содержащий белки цитозоля, анализировали с использованием электрофореза и иммуноблоттинга. Белки разделяли в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ). Перенос белков с ПААГ на мембрану PVDF осуществляли электроолюцией в течение 45 мин. Преинкубацию Вестерн-блотов проводили в растворе TBST (с добавлением 1 % Tween-20) с 5 % (вес/объем) обезжиренным молоком в течение 1 ч. Затем Вестерн-блоты инкубировали в присутствии первых поликлональных антител (Santa Cruz Biotechnology) против NGF в разведении 1:1000 в течение 1 ч. Затем после отмывки блоты инкубировали в присутствии вторых антител (Santa Cruz Biotechnology и Bio-Rad), конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1:2000) в течение 1 ч. Детектирование NGF осуществляли в реакции с ECL-реагентами на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop.

Количественное содержание BDNF определяли методом иммуноферментного анализа (BDNF E_{max} Immunoassay System) в модификации ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) по протоколу фирмы “Promega” (США).

Для определения содержания BDNF афобазол добавляли в культуральную среду в конечных концентрациях от 10^{-11} М до 10^{-5} М. После инкубации с препаратом в течение 1 ч среду заменяли на экстракционный буфер. При определении содержания NGF афобазол вносили в конечной концентрации 10^{-8} М. Через 6 ч клетки лизировали.

На иммунологические планшеты наносили анти-BDNF моноклональные антитела (Anti-BDNF mAb) в карбонатном буфере (pH 9,7), которые связывают BDNF из экстрактов, и инкубировали при 4 °C в течение суток. После отмывки (буфером TBST) наносили другие специфические к BDNF поликлональные АТ (pAb) и инкубировали 2 ч. После отмывки количество специфически связавшихся поликлональных АТ определяли с помощью видоспецифичных анти-IgY АТ, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP), и инкубировали 1 ч. Несвязавшиеся конъюгаты удаляли с помощью отмывки, за которой следовала инкубация

¹ ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

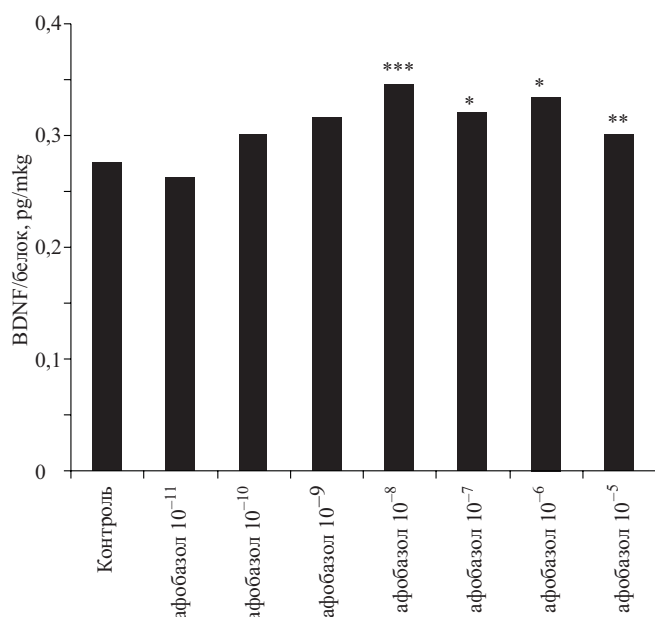


Рис. 1. Влияние различных концентраций афобазола на уровень BDNF в культуре клеток HT-22 (* — $p \leq 0,001$; ** — $p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,05$).

с хромогенным субстратом (TMB One Solution). Через 10 мин реакцию останавливали раствором 1N HCl и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм на спектрофотометре Elisa reader.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистической программы Microsoft Excel и программы Jandel Scientific SigmaPlot и Statistica 6.0 для Windows. Достоверность различий между контролем и опытом проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что в контроле содержание NGF составляет $0,9 \pm 0,26$ отн. д. ед., а через 6 ч после внесения афобазола $1,23 \pm 0,058$ отн. д. ед. (рис. 1). Таким образом, афобазол статистически достоверно на 36 % ($p \leq 0,05$) увеличивает содержание данного нейротрофина в культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22. Через 24 ч после внесения афобазола содержание NGF не отличалось от контрольного уровня.

Данные иммуноферментного анализа по изучению содержания BDNF показали, что афобазол статистически достоверно увеличивает уровень нейротрофина в конечных концентрациях 10^{-8} М – 10^{-5} М, причем наибольшее увеличение (на 25 %, $p \leq 0,05$) отмечено при внесении препарата в конечной концентрации 10^{-8} М (рис. 2). Эти результаты согласуются с данными, полученными при изучении нейропротекторного действия афобазола на моделях оксидативного стресса и глутаматной токсичности в культуре клеток HT-22. Известно, что BDNF защищает нейроны от глутамат-

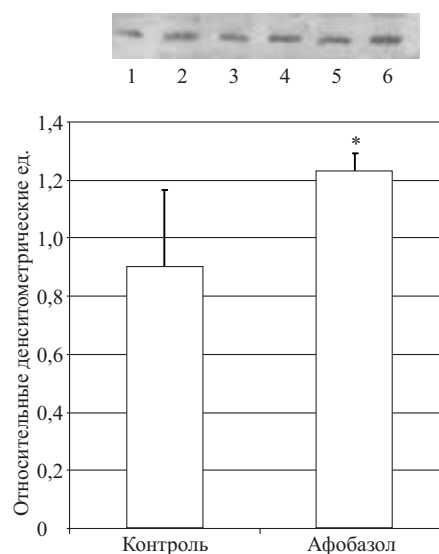


Рис. 2. Изменение содержания фактора роста нервов NGF через 6 ч после внесения афобазола в культуру клеток HT-22 (результаты Вестерн — блот анализа и денситометрии).

Дорожки: 1, 2, 3 — контроль, 4, 5, 6 — афобазол (10^{-8} М).

ной токсичности, редуцируя повреждающее действие NO [4]. Установлено, что BDNF снижает активность каспазы-3 в нейронах коры и стриатума [3]. NGF играет важную роль в процессах созревания и поддержания жизнедеятельности холинергических нейронов нижних отделов переднего мозга и нейронов симпатической нервной системы [5]. Последние исследования функции NGF показали его участие в высвобождении ацетилхолина и глутамата из синаптических везикул нейронов коры большого мозга крысы. Нейропротекторное действие NGF проявляется в активации ядерного фактора транскрипции NF- κ B, который является антиапоптогическим сигналом. Под контролем этого фактора транскрипции находится синтез белковых регуляторов, которые блокируют TNF- или Apo3L- (индукторы апоптоза) индуцированную активацию каспазы-8, относящейся к семейству апоптогических протеаз [6]. Кроме того, на модели травматического повреждения мозга крысы введение экзогенного NGF после повреждения повышало активность ферментов антиоксидантной защиты клеток, а именно, супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы [10].

Таким образом, обнаруженную в настоящей работе способность афобазола увеличивать уровень BDNF и NGF следует рассматривать как важный элемент механизма его нейропротекторного действия. Полученные данные согласуются с предыдущими результатами, продемонстрировавшими способность афобазола предотвращать снижение содержания BDNF в различных структурах мозга животных при стрессовых воздействиях [1], и подтверждают гипотезу о сочетании в фармакологическом спектре афобазола анксиолитических и нейропротекторных свойств.

ВЫВОДЫ

1. Афобазол в культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22 увеличивает содержание нейротрофинов BDNF и NGF.

2. Максимальный эффект афобазола проявляется при использовании конечной концентрации 10^{-8} М.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. А. Вальдман, Д. С. Мелкумян и др., *Психофармакол. биол. Наркол.*, **5**(3), 549 – 551 (2005).
2. Т. А. Зенина, И. В. Гавриш, Д. С. Мелкумян, Т. С. Середенина, С. Б. Середенин, *Бюл. экспер. биол.*, **8**, 161 – 163 (2005).
3. S. T. Kim, J. H. Choi, et al., *J. Neurochem.*, **95**(1), 89 – 98 (2005).
4. T. Kume, H. Kouchiyama, et al., *Brain Res.*, **756**(1–2), 200 – 204 (1997).
5. R. Levi-Montalcini., *Science*, **237**, 1154 – 1162 (1987).
6. H. Liu, R. Nowak, et al., *J. of Neurochem.*, **86**, 1553 – 1563 (2003).
7. S. Seredenin, G. Neznamov, et al., *The international J. of Neuropsychopharmacology*, **11**(1), 275 (2008).
8. M. Takebayashi, T. Hayashi, T-P Su, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **303**(3), 1227 – 1237 (2002).
9. Y. Yagasaki, T. Numakawa, et al., *J. Biol. Chem.*, **281**(18), 12941 – 12049 (2006).
10. Z. Zhou, H. Chen, et al., *J. Basic Clin Physiol Pharmacol.*, **14**, 217 – 224 (2003).

Поступила 25.09.08

SELECTIVE ANXIOLYTIC AFOBAZOLE INCREASES THE CONTENT OF BDNF AND NGF IN THE CULTURE OF HIPPOCAMPAL HT-22 LINE NEURONS

T. A. Antipova, D. S. Sapozhnikova, L. Yu. Bakhtina, and S. B. Seredenin

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

Experiments on immortalized hippocampal cell culture of mice showed that afobazole increases the NGF level in a final concentration of 10^{-8} M and the BDNF level in final concentrations from 10^{-8} to 10^{-5} M.

Key words: Afobazole, BDNF, hippocampal neurons, NGF