

ИМИДЖИНГ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

DOI: 10.7868/S0869813918060035

**ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ ВЫЗЫВАЕТ УСИЛЕНИЕ ВЫРАБОТКИ  
БЕЛКА ТРАНСТИРЕТИНА В СОСУДИСТОМ СПЛЕТЕНИИ МОЗГА  
КРЫС В ПЕРВЫЙ МЕСЯЦ ПОСЛЕ РОЖДЕНИЯ**

© Д. С. Васильев,<sup>1,2</sup> Н. Л. Туманова,<sup>1</sup> Н. М. Дубровская,<sup>1,2</sup>  
О. С. Алексеева,<sup>1</sup> Н. Н. Наливаева,<sup>1</sup> И. А. Журавин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет  
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: dvasilyev@bk.ru

Белок транстиретин (ТТР), синтезирующийся в печени и сосудистом сплетении мозга, является транспортным белком жидких сред организма и основным переносчиком тироксина и ретинола. Он также способствует повышению выживаемости нейронов при гипоксическом стрессе и препятствует накоплению амилоидного Аβ-пептида. Цель работы заключалась в изучении влияния пренатальной гипоксии на содержание ТТР в сосудистом сплетении мозга в постнатальном онтогенезе. Для этого самок крыс линии Вистар на 14-й день беременности подвергали действию гипоксии (7 % O<sub>2</sub>, 3 ч), а затем с использованием иммунофлуоресцентного метода и конфокальной микроскопии изучали распределение белка ТТР в сосудистом сплетении потомства. Сопоставляли распределение этого белка у контрольных и экспериментальных крыс на 20-е и 50-е сутки после рождения. Показано, что у молодых крыс, перенесших пренатальную гипоксию, уровень иммунореактивности к ТТР в сосудистом сплетении был выше на 75 % ( $p \leq 0.05$ ), чем у контрольных животных. При этом у половозрелых (P50) крыс, перенесших пренатальную гипоксию, он снижался до контрольных величин. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что в ответ на перенесенный гипоксический стресс в период эмбриогенеза может происходить увеличение экспрессии ТТР в сосудистом сплетении мозга. Повышение содержания ТТР наблюдается только в период раннего постнатального онтогенеза и может способствовать компенсации возникающих нарушений развития нервной системы и организма в целом.

*Ключевые слова:* онтогенез, пренатальная гипоксия, транстиретин, конфокальная микроскопия, крыса.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 6. С. 635—639. 2018

D. S. Vasilev,<sup>1,2</sup> N. L. Tumanova,<sup>1</sup> N. M. Dubrovskaya,<sup>1,2</sup> O. S. Alekseeva,<sup>1</sup> N. N. Naliavaeva,<sup>1</sup> I. A. Zhuravin.<sup>1,2</sup> PRENATAL HYPOXIA INCREASES TRANSTHYRETIN PROTEIN PRODUCTION IN THE CHOROID PLEXUS OF RAT PUPS IN THE FIRST MONTH AFTER BIRTH. <sup>1</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup> Saint Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia, e-mail: dvasilyev@bk.ru.

Transthyretin (TTR) is the main transporter protein of thyroid hormones and retinol, which is mainly synthesized in the liver and brain choroid plexus. It has also been shown to protect neuronal viability under hypoxic conditions and prevent accumulation of the amyloid A $\beta$  peptide. The aim of this work was a comparative study of TTR content and distribution in the choroid plexus of the lateral ventricles of rats subjected to prenatal hypoxia (14<sup>th</sup> day of gestation, 7 % O<sub>2</sub>, 3 h) and rats with normal development on days 20 and 50 after birth. It was found that the immunoreactive level of TTR protein in the choroid plexus of 20 day old hypoxic pups was increased compared to the control pups (up to 175 % of the control level,  $p \leq 0.05$ ). However, later in life, on P50, no differences between the groups were detected. The data obtained suggest that increased production of TTR protein in the choroid plexus of the lateral ventricles is characteristic only of the young rats subjected to prenatal hypoxia and declines to the control levels by adulthood. The increased level of TTR protein production might be protective of the developing brain and the whole organism of the young pups subjected to prenatal hypoxia.

*Key words:* ontogenesis, prenatal hypoxia, transthyretin, confocal microscopy, rat.

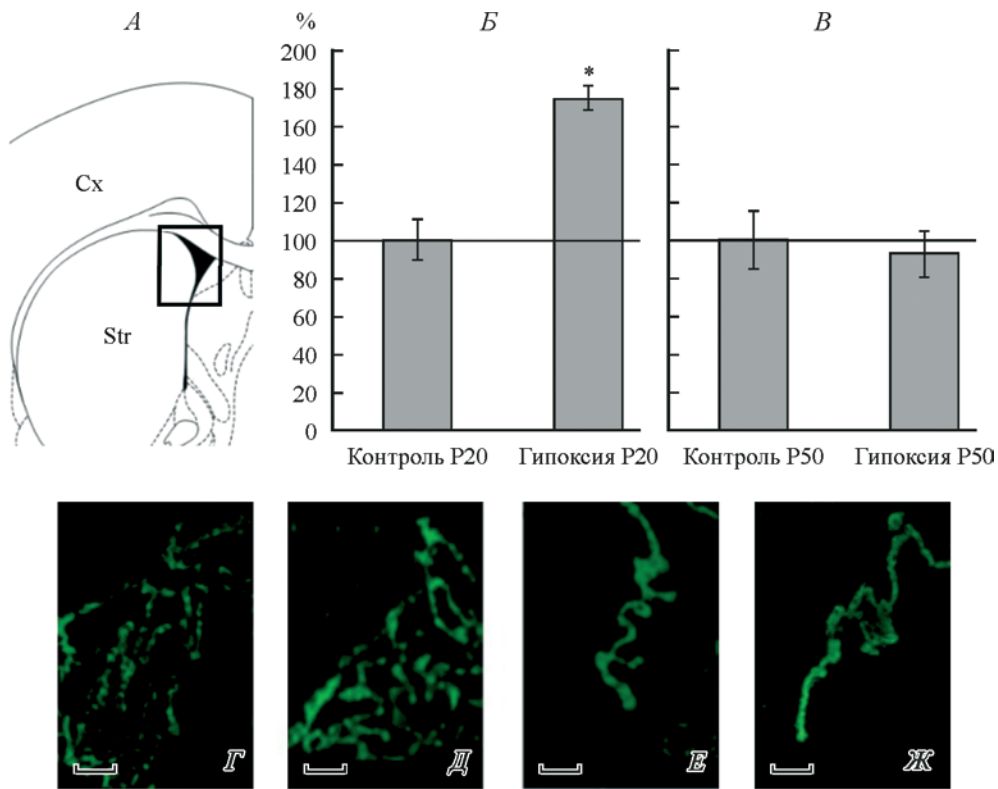
RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 6. P. 635—639. 2018

Белок транстиретин (ТТР) является транспортным белком жидких сред организма и основным переносчиком тироксина и ретинола [2]. Тиреоидные гормоны являются ключевым звеном регуляции дифференцировки и нормального развития головного мозга, особенно во внутриутробном периоде и в первые годы жизни, когда происходит формирование отделов головного мозга [2], поэтому возрастная динамика экспрессии основного переносчика тироксина — белка ТТР — представляет интерес при исследовании нарушений развития головного мозга в раннем онтогенезе. В литературе имеются данные о том, что ТТР способствует повышению выживаемости нейронов при ишемии и гипоксическом стрессе [1, 8], а также играет важную роль в транспорте амилоидного А $\beta$ -пептида, препятствуя развитию болезни Альцгеймера [3]. Тем не менее мутации гена *TTR* приводят к ряду патологий, вызванных амилоидогенезом [7].

В организме человека и животных ТТР синтезируется главным образом в печени и сосудистом сплетении мозга, откуда секретируется в плазму крови и спинномозговую жидкость [6]. На ранних стадиях онтогенеза пик синтеза ТТР в сосудистом сплетении предшествует началу ускоренного роста мозга и происходит в период максимальной репликации нейробластов переднего мозга [9]. Однако в литературе отсутствуют данные об экспрессии и распределении данного белка в сосудистом сплетении головного мозга животных, перенесших гипоксию в период эмбриогенеза, что определило задачу настоящего исследования. Выбор пренатальной гипоксии в качестве экспериментальной модели обусловлен тем, что гипоксическое воздействие на развивающийся плод является одним из наиболее распространенных в медицинской практике.

## МЕТОДИКА

Все опыты проводились в соответствии с протоколом обращения с лабораторными животными ИЭФБ РАН, основанного на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive #86 / 609 for the Care of Laboratory Animals). Для создания гипоксических условий самок крыс линии Вистар на 14-й день беременности подвергали действию гипоксии (7 % O<sub>2</sub>, 3 ч) в специальной камере, снабженной системами терморегуляции, вентиляции и удаления избытка CO<sub>2</sub>. Контрольных животных содержали в аналогичных условиях при нормальном содержании кислорода. На 20-е и 50-е сутки постнатального онтогенеза (P20 и P50) исследовали распределение белка ТТР в ткани сосудистого сплетения желудочков головного мозга у потомков гипоксических и контрольных самок, отбирая по 8 самцов в каждую группу. Ткань мозга фиксировали раствором 10%-ного



Распределение белка ТТР в сосудистом сплетении левого бокового желудочка конечного мозга крыс на P20 (Б, Г, Д) и P50 (Б', Е, Ж).

А — расположение исследуемого участка сосудистого сплетения (обведено черной рамкой) в желудочке конечного мозга крысы. Сх — кора мозга, Стр — стриатум. Схема с модификациями соответствует атласу Paxinos, Watson, 2007 (+0.20 мм от Bregma); Б, Б' — уровень иммунореактивности к белку ТТР в профильном поле сосудистого сплетения у контрольных и перенесших пренатальную гипоксию крыс на P20 (Б) и P50 (Б'). По оси абсцисс — группы животных (n = 8); по оси ординат — уровень иммунореактивности к белку ТТР (определяемый как средний уровень яркости флуоресцентного сигнала по всей площади профильного поля сосудистого сплетения в срезе), выраженный в процентах от уровня интактного контроля (100 %). Данные представлены как среднее ± ошибка среднего. \* U-критерий Манна—Уитни,  $p \leq 0.05$ . Г—Ж — микрофотографии распределения белка ТТР в сосудистом сплетении конечного мозга крыс на P20 (Г, Д) и P50 (Е, Ж) из контрольной (Г, Е) и «гипоксической» (Д, Ж) групп. Иммуногистохимическое окрашивание белка ТТР (FITC-зеленый). Масштаб: 300 мкм.

нейтрального формалина на 0.1M фосфатном буфере (pH 7.4), затем изготавливали фронтальные срезы на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Германия). Иммуногистохимическое исследование ТТР проводили с использованием первичных моноклональных антител LS-B2607-50 (Life Bioscience) в разведении 1:100. Визуализацию осуществляли с помощью FITC-конъюгированных вторичных антител против IgG кролика (ab96902, разведение 1:500). Иммунофлуоресцентное исследование сосудистого сплетения (см. рисунок, А) на уровне +0.20 мм от Bregma (по: [5]) выполняли на микроскопе Leica DMR, оборудованном конфокальным сканером Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуорохрома FITC вызвали светом Ar/He лазера при длине волны 488 нм, а флуоресценцию наблюдали в диапазоне 496—537 нм. Из уровня интенсивности свечения флуорохрома FITC вычитали фоновое свечение и сопоставляли средние величины свечения по всей площади профильного поля сосудистого

сплетения желудочков конечного мозга у контрольных и гипоксических крыс. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический критерий Манна—Уитни (при  $p \leq 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе иммунофлуоресцентного исследования распределения ТТР в сосудистом сплетении мозга 20-суточных крысят выявлено различие между представителями контрольной (см. рисунок, Г) и гипоксической (см. рисунок, Д) групп. У крыс, перенесших пренатальную гипоксию, уровень иммунореактивности к ТТР в сосудистом сплетении был выше на 75 % ( $p \leq 0.05$ ), чем у контрольных животных соответствующего возраста (см. рисунок, Б). При этом у половозрелых (P50) крыс, перенесших пренатальную гипоксию, уровень иммунореактивности к данному белку снижался и достигал контрольных величин (см. рисунок, В). Полученные данные в целом согласуются с имеющимися в литературе представлениями об участии ТТР в реакции организма на гипоксию и другие повреждающие факторы, а также о его роли в повышении толерантности организма к гипоксии [1, 4]. Однако феномен повышения продукции ТТР в сосудистом сплетении в ответ на пренатальную гипоксию показан нами впервые. Такое повышение экспрессии ТТР может быть связано с необходимостью выведения из ткани мозга большого количества продуктов протеолитического расщепления белков, вызванного повышенной элиминацией клеточного материала после пренатальной гипоксии [10]. Дальнейшее изучение механизма регуляции экспрессии ТТР в сосудистом сплетении и других структурах мозга после пренатальной гипоксии может помочь более глубокому пониманию функции этого транспортного белка в ходе формирования, нормального функционирования и старения мозга, а также в развитии нейродегенеративных процессов.

Работа выполнена по государственному заданию (АААА-А18-118012290373-7) при частичной поддержке РФФИ (16-04-00694). Конфокальная микроскопия выполнена на базе Центра коллективного пользования ИЭФБ РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

- [1] Ahmad Y., Sharma N. K., Ahmad M. F., Sharma M., Garg I., Bhargava K. Proteomic identification of novel differentiation plasma protein markers in hypobaric hypoxia-induced rat model. PLOS ONE. 9(5): e98027. 2014.
- [2] Alshehri B., D'Souza D. G., Lee J. Y., Petratos S., Richardson S. J. The diversity of mechanisms influenced by transthyretin in neurobiology: development, disease and endocrine disruption. J. Neuroendocrinol. 27: 303—323. 2015.
- [3] Li X., Zhang X., Ladiwala A. R., Du D., Yadav J. K., Tessier P. M., Wright P. E., Kelly J. W., Buxbaum J. N. Mechanisms of transthyretin inhibition of  $\beta$ -amyloid aggregation in vitro. J. Neurosci. 33(50): 19 423—19 433. 2013.
- [4] Patel J., Landers K. A., Mortimer R. H., Richard K. Expression and uptake of the thyroxine-binding protein transthyretin is regulated by oxygen in primary trophoblast placental cells. J. Endocrinol. 212(2): 159—167. 2012.
- [5] Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Edition. Elsevier Inc. 2007.
- [6] Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. Clin. Chim. Acta. 310: 173—186. 2001.
- [7] Saraiva M. J. Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases. Hum. Mutat. 17(6): 493—503. 2001.
- [8] Santos S. D., Lambertsen K. L., Clausen B. H., Akinc A., Alvarez R., Finsen B., Saraiva M. J. CSF transthyretin neuroprotection in a mouse model of brain ischemia. J. Neurochem. 115: 1434—1444. 2010.

[9] *Schreiber G.* The evolutionary and integrative roles of transthyretin in thyroid hormone homeostasis. *J. Endocrinol.* 175(1): 61—73. 2002.

[10] *Vasilev D. S., Dubrovskaya N. M., Tumanova N. L., Zhuravin I. A.* Prenatal hypoxia in different periods of embryogenesis differentially affects cell migration, neuronal plasticity, and rat behavior in postnatal ontogenesis. *Front. Neurosci.* 10: 126. 2016.

Поступила 9 IV 2018