

М. В. Шмидт^{1,2}✉, **А. В. Смирнов**^{1,2}, **И. Н. Тюренков**¹, **Д. А. Бакулин**¹,
Ю. И. Великородная^{1,2}, **В. В. Коломыцев**¹, **Л. В. Горюнова**¹

¹ Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

² Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия

✉ schmidtmv80@gmail.com

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ BDNF В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА I ТИПА

Аннотация. Цель исследования. Анализ корреляции между характером и степенью патоморфологических изменений и экспрессией BDNF в различных отделах головного мозга при экспериментальном воспроизведении стрептозотозининдуцированного сахарного диабета. Экспериментальное исследование проведено на 30 белых беспородных лабораторных крысах в возрасте 12 месяцев. Моделирование стрептозотозининдуцированного сахарного диабета продолжалось 6 месяцев. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали тионином по методу Ниссля. Выявление мозгового нейротрофического фактора (BDNF) проводили с помощью иммуногистохимического исследования с использованием первичных антител к белку BDNF. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0 (StatSoft, USA). Различия между группами оценивали по критерию Манна – Уитни (Mann – Whitney, *U*-test) и считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Выявлено, что морфологические изменения в головном мозге при экспериментальном моделировании диабетической энцефалопатии характеризуются снижением цитоплазматической экспрессии белка BDNF в моторных, соматосенсорных, аудиторных областях коры головного мозга и в CA1, CA3 полях гиппокампа в нейронах с признаками обратимых изменений, а также в нейронах без значимых патоморфологических признаков повреждения, что, по-видимому, способствует снижению устойчивости нейронов неокортекса и архикортекса к повреждению при сахарном диабете.

Ключевые слова: головной мозг, сахарный диабет, диабетическая энцефалопатия

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ. № 21-15-00192.

M. V. Shmidt^{1,2}✉, **A. V. Smirnov**^{1,2}, **I. N. Ttyurenkov**¹, **D. A. Bakulin**¹,
Y. I. Velikorodnaya^{1,2}, **V. V. Kolomycev**¹, **L. V. Goryunova**¹

¹ Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

² Volgograd Medical Research Center, Volgograd, Russia

✉ schmidtmv80@gmail.com

FEATURES OF BDNF EXPRESSION IN THE RAT BRAIN IN EXPERIMENTAL MODELING OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Abstract. Purpose of the study. Analysis of the correlation between the nature and degree of pathomorphological changes and the expression of BDNF in various parts of the brain during the experimental reproduction of streptozotocin-induced diabetes mellitus. The experimental study was carried out on 30 white outbred laboratory rats aged 12 months. Modeling of streptozotocin-induced diabetes mellitus lasted 6 months. Sections 5–7 μm thick were stained with thionin using the Nissl method. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was detected by immunohistochemistry using primary antibodies to the BDNF protein. Statistical data processing was carried out using the Statistica 6.0 software package (StatSoft, USA). Differences between groups were assessed using the Mann – Whitney *U*-test and were considered statistically significant at $p < 0.05$. It was revealed that morphological changes in the brain during experimental modeling of diabetic encephalopathy are characterized by a decrease in the cytoplasmic expression of the BDNF protein in the motor, somatosensory, auditory areas of the cerebral cortex and in the CA1, CA3 fields of the hippocampus in neurons with signs of reversible changes, as well as in neurons without significant pathomorphological signs of damage, which apparently contributes to a decrease in the resistance of neocortex and archicortex neurons to damage in diabetes mellitus.

Keywords: brain, diabetes mellitus, diabetic encephalopathy

Funding: the work was carried out with the financial support of the RSF grant No. 21-15-00192.

Сахарный диабет (СД), характеризующийся высокой заболеваемостью и смертностью, является серьезной проблемой здравоохранения во всем мире.

Результатирующим действием хронической гипергликемии на организм пациентов является развитие осложнений, сопровождающихся повреждением, дисфункци-

ей и недостаточностью со стороны различных органов: кровеносных сосудов, сердца, почек, органов желудочно-кишечного тракта, а также периферической (ПНС) и центральной нервной системы (ЦНС). В настоящее время любое когнитивное расстройство: тревога, потеря памяти, депрессия, деменция, а также болезнь Альцгеймера, возникшие на фоне СД, при отсутствии других предрасполагающих факторов, рассматривается как диабетическая энцефалопатия (ДЭ). Гипергликемия провоцирует ряд механизмов, которые, как считается, лежат в основе ДЭ, включая апоптоз нейронов, окислительный стресс, нейровоспаление и измененный нейрогенез, гиперлептемию, повышение уровня глюкокортикоидов, митохондриальную дисфункцию и т. д. [1, 2]

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) представляет собой белок, участвующий в регуляции нескольких процессов, включая нейропластичность, нейровоспаление, нейрогенез и дифференцировку нейронов, и связан с рядом неврологических и психиатрических расстройств [3–5]. Обнаружен низкий уровень BDNF и развитие когнитивного дефицита при СД. Предполагается, что снижение уровня BDNF может нарушать метаболизм глюкозы и способствовать прогрессированию СД и его осложнений [4].

Показано, что когнитивный дефицит у мышей при СД снижается при лечении производными адмантана, что приводит к возрастанию экспрессии GLP-1-глюкагоноподобного пептида, а также генов BDNF, Cav1 в головном мозге и центральной блокаде провоспалительного синтеза цитокинов [6].

Кроме того, до настоящего времени, остаются малоизученным вопрос об особенностях иммуногистохимической экспрессии BDNF в различных отделах головного мозга при диабетической энцефалопатии и сопряженности данной экспрессии с характером и степенью нейродегенеративных изменений.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Анализ корреляции между характером и степенью патоморфологических изменений и экспрессией BDNF в различных отделах головного мозга при экспериментальном воспроизведении стрептозотониндуцированного СД.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальное исследование проведено на 30 белых беспородных лабораторных крысах-самках в возрасте 12 месяцев. Моделирование стрептозотониндуцированного СД длительностью 6 месяцев проводили по ранее описанной методике [7]. В качестве позитивного контроля использовали крыс без СД (интактных) той же партии животных. Забор тканей головного мозга проводили у наркотизированных (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутривенно) животных.

Материал фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, с дальнейшим обезвоживанием в бата-

рее спиртов и изготовлением парафиновых блоков. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали тионином по методу Ниссля. Исследовали признаки повреждения в высокочувствительных к различным повреждающим факторам популяциях клеток ганглионарного слоя коры и пирамидных нейронов гиппокампа (поля CA1, CA3).

Выявление мозгового нейротрофического фактора (BDNF) проводили с помощью иммуногистохимического исследования с использованием первичных антител к белку BDNF (нейротрофический фактор мозга; англ. brain-derived neurotrophic factor) в соответствии с инструкциями производителя (разведение 1 : 100) (Affinity Biosciences, China) и визуализирующей полимерной системы детекции Гистофайн – N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Nichirei Nichirei Biosciences INC., Japan). Срезы докрашивали гематоксилином. Интенсивность экспрессии BDNF на срезах оценивали с помощью программы анализа изображений ImageJ 1.54d. Определяли относительную площадь, занимаемую иммунопозитивным материалом в поле зрения микроскопа. Фотодокументирование осуществляли цифровой фотокамерой Olympus (Япония). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0 (StatSoft, USA). Различия между группами оценивали по критерию Манна – Уитни (Mann – Whitney, *U*-test) и считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В серии экспериментов по моделированию стрептозотониндуцированного СД структурные изменения носили неоднородный характер в различных структурах головного мозга и значительно варьировали от животного к животному. В гиппокампе среди нейронов пирамидного слоя CA1 поля у крыс с экспериментальным СД обнаружены единичные гиперхромные клетки (табл. 1).

В CA3 гиппокампа визуализировалось значительное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы перикарионов.

Обнаруживались также единичные сморщенные нейроны с резко выраженной базофилией цитоплазмы перикарионов и пикнотичным ядром. При морфометрическом анализе отмечена тенденция к увеличению количества поврежденных нейронов. Относительная плотность гиперхромных нейронов с дистрофическими изменениями в группе животных с экспериментальным СД составляла $(10,19 \pm 4,09) \%$, в группе контрольных крыс данный показатель составил $(2,38 \pm 0,75) \%$ (при $p > 0,05$).

Из всех функциональных отделов церебральной коры патоморфологические изменения наблюдалось, в основном, в моторных, соматосенсорных и аудиторных областях коры. Обращает на себя внимание тот факт, что дистрофический процесс затрагивал

преимущественно крупные клетки ганглионарного слоя. Преобладали гиперхромные изменения, характеризующиеся уменьшением объема и деформацией клеточных тел. Отмечалось усиление базофилии цитоплазмы, при этом глыбки базофильного материала локализовались перинуклеарно или по периферии перикариона.

Ядра также деформировались и уменьшались в объеме. Часть клеток характеризовались выраженной гиперхромией и гомогенизацией цитоплазмы

с невозможностью визуализации ядерного материала. В некоторых нейронах данные изменения сочетались с появлением внутрицитоплазматических вакуолей.

По данным морфометрического исследования, достоверное увеличение поврежденных нейронов фиксировалось во всех исследуемых отделах неокортекса, однако наиболее выраженные дистрофические изменения фиксировались в моторных и соматосенсорных отделах неокортекса (см. табл.).

Относительная численная плотность поврежденных нейронов в различных отделах головного мозга ($M \pm m$) %

Структуры головного мозга	Степень патоморфологических изменений нейронов	Интакт	СД
CA1 поле гиппокампа	НН	96,42 ± 0,63	96,48 ± 0,48
	СН	3,25 ± 0,39	2,98 ± 0,40
	ГН	0,32 ± 0,32	0,55 ± 0,37
CA3 поле гиппокампа	НН	97,62 ± 0,75	89,81 ± 4,09
	СН	1,99 ± 0,57	2,54 ± 0,25
	ГН	0,39 ± 0,39	7,65 ± 4,05
Моторная кора	НН	98,14 ± 0,63	85,16 ± 2,35*
	СН	1,59 ± 0,52	6,78 ± 2,26*
	ГН	0,28 ± 0,28	8,06 ± 2,01*
Соматосенсорная кора	НН	97,65 ± 0,69	68,10 ± 4,47*
	СН	2,11 ± 0,64	7,20 ± 1,97*
	ГН	0,25 ± 0,25	24,70 ± 3,86*
Аудиторная кора	НН	97,70 ± 0,85	89,47 ± 1,36*
	СН	2,01 ± 0,78	5,83 ± 4,24*
	ГН	0,29 ± 0,29	4,70 ± 1,24*

Примечания: * – показатели статистически значимо отличаются от группы Интакт при $p < 0,05$; Критерий Манна – Уитни. Степень поражения нейронов [Чубинидзе А. И., 1972]: нейроны нормальные, неизменные (НН); слабоизмененные нейроны (СН) с сохранением ядра, но со структурными или тинкториальными нарушениями компонентов цитоплазмы (набухание, гиперхроматоз, хроматолиз, центральная тинкториальная ацидофилия); грубо измененные нейроны (ГН) – выраженное сморщивание, «тяжелое изменение», гомогенизирующее изменение нейронов, клетки-тени.

У интактных животных нейротрофический фактор выявлялся преимущественно в цитоплазме нейронов и клеток глии, а также эндотелии средних и крупных сосудов. Иммунопозитивное окрашивание носило неоднородный характер: преобладали клетки с умеренной экспрессией белка в цитоплазме, однако, в единичных случаях обнаруживались интенсивно окрашенные клетки (рис. 1).

У экспериментальных животных со стрептозотининдуцированным СД иммуногистохимическое исследование продемонстрировало достоверное снижение относительной площади иммунопозитивного материала как в полях гиппокампа, так и различных функциональных отделах церебральной коры (рис. 2).

В CA1 поле гиппокампа фиксировалось преимущественно уменьшение концентрации BDNF в цитоплазме клеток без значимых признаков повреждения нейронов.

По сравнению с интактными крысами увеличивалось количество слабо позитивных и BDNF-негативных нейронов. В CA3 поле и исследуемых отделах неокортекса сохранялась данная тенденция, но дополнительно отмечалось выраженное снижение экс-

прессии нейротрофического фактора в клетках с признаками повреждения различной степени выраженности (рис. 1).

Таким образом, результаты проведенной нами работы позволили выявить сопряженность снижения уровня экспрессии BDNF со степенью нейродегенеративных изменений в коре головного мозга крыс при экспериментальном моделировании СД I типа.

Стоит отметить тот факт, что при экспериментальной диабетической энцефалопатии, экспрессия нейротрофического фактора начинала снижаться даже в отсутствие видимых патоморфологических изменений в нейронах и в клетках глии, что наблюдалось нами в CA1 поле гиппокампа. При этом, дефицит нейротрофина продолжал нарастать по мере развития дистрофических изменений, за счет резкого снижения экспрессии BDNF в цитоплазме поврежденных клеток (CA3 поле гиппокампа, церебральная кора), что позволяет рассматривать развитие когнитивных нарушений и признаков атрофических и обратимых изменений в нейронах коры головного мозга при СД в контексте снижения нейропротекторного влияния BDNF [8, 9].

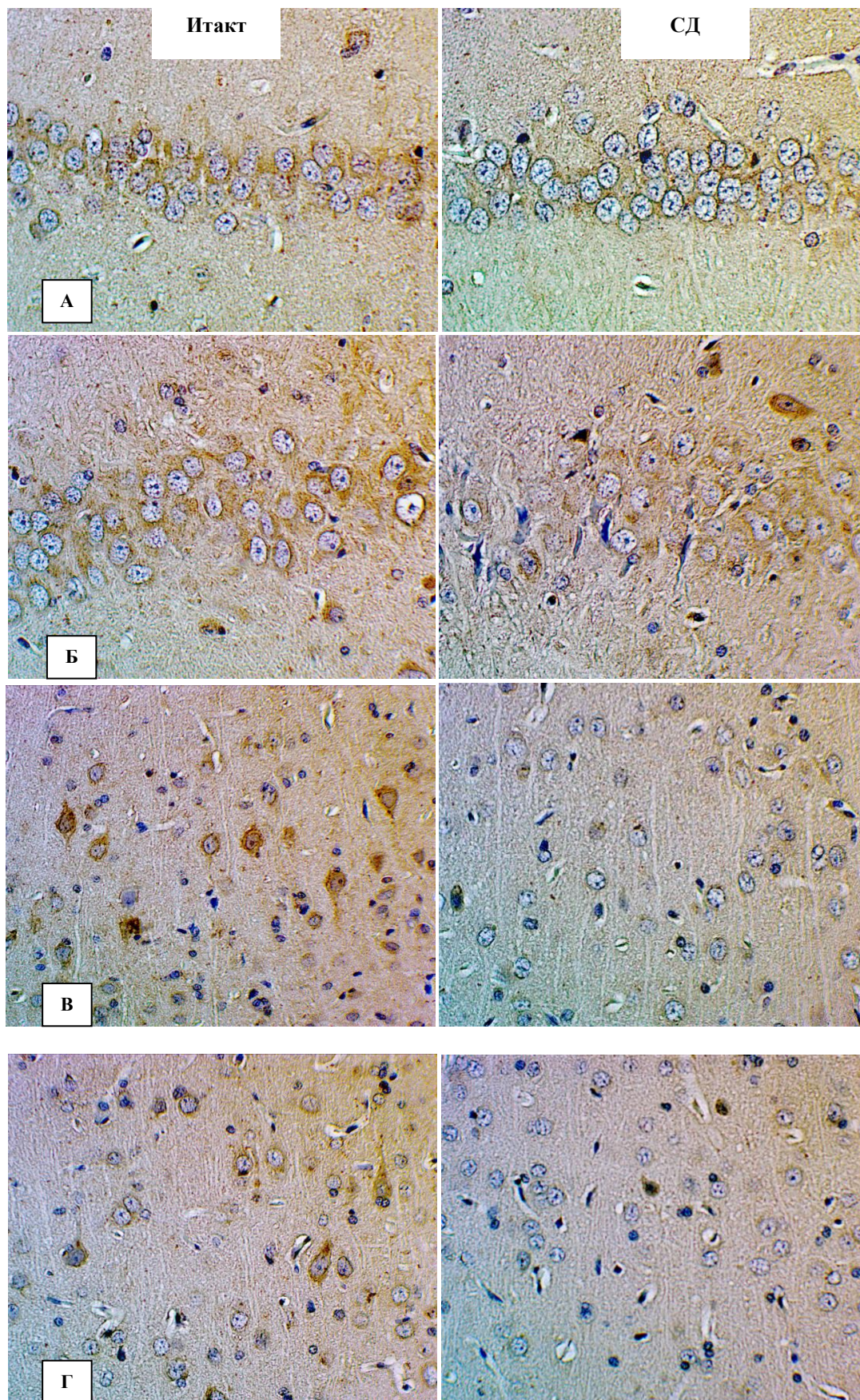


Рис. 1. Снижение экспрессии BDNF в структурах головного мозга при экспериментальной диабетической энцефалопатии: А – CA1 поле гиппокампа; Б – CA3 поле гиппокампа; В – Моторная кора. Г – Аудиторная кора. Иммуногистохимическое исследование, антитела против BDNF, докраска гематоксилином. Увеличение $\times 400$.

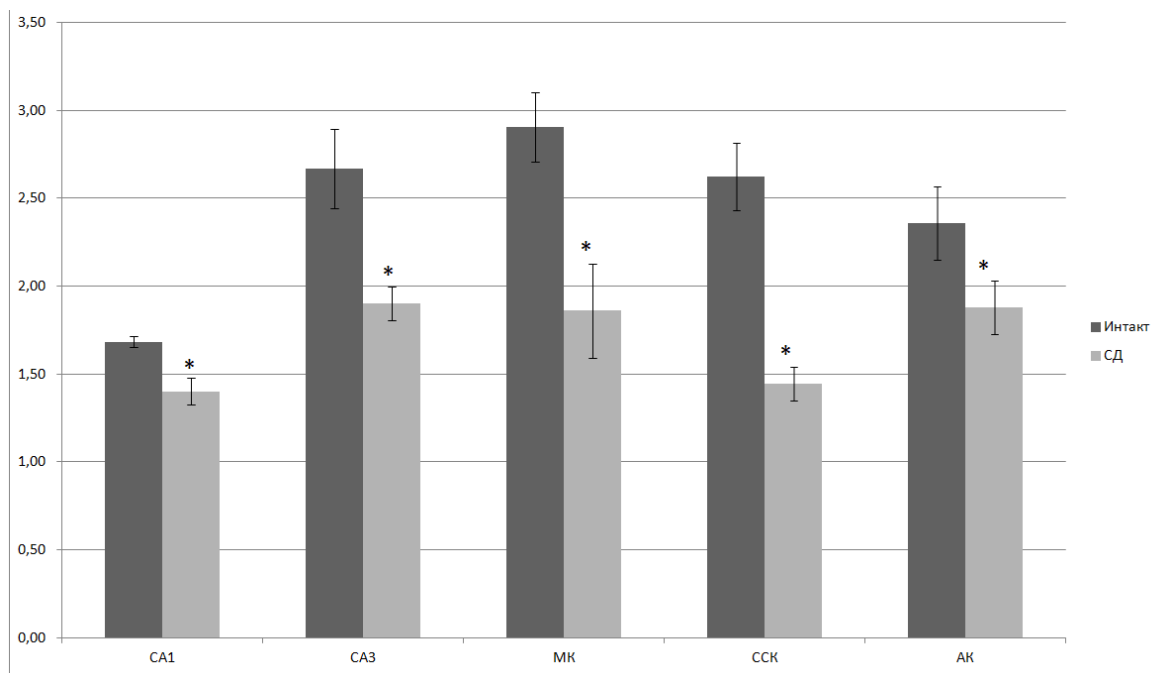


Рис. 2. Относительная площадь экспрессии BDNF в различных функциональных отделах головного мозга при моделировании СД $M \pm m \%$. CA1- CA1 поле гиппокампа; CA3- CA3 поле гиппокампа; МК – моторная кора; ССК – соматосенсорная кора; АК – аудиторная кора

Примечание. * – показатели статистически значимо отличаются от группы интакт при $p < 0,05$; Критерий Манна – Уитни.

Кроме того, данное исследование свидетельствует о том, что иммуногистохимическое определение экспрессии BDNF в структурах головного мозга является чрезвычайно чувствительным методом, выявляющим морфофункциональные изменения нейронов и клеток глии на самых ранних стадиях ДЭ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, морфологические изменения в головном мозге при экспериментальном моделировании диабетической энцефалопатии характеризуются снижением цитоплазматической экспрессии белка BDNF в моторных, соматосенсорных, аудиторных областях коры головного мозга и в CA1, CA3 полях гиппокампа в нейронах с признаками обратимых изменений, а также в нейронах без значимых патоморфологических признаков повреждения, что, по-видимому, способствует снижению устойчивости нейронов неокортекса и архикортекса к повреждению при СД.

Нейропротективное влияние BDNF может быть связано с его противовоспалительным, регенераторным, а также антиапоптотическим свойствами [3, 10, 11], делает актуальным поиск путей сохранения и/или стимуляции продукции BDNF для патогенетически обоснованной нейропротекции при СД и его осложнениях.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Смирнов А. В., Бисинбекова А. И., Файбисович Т. И. Морфофункциональные изменения головного мозга при сахарном диабете. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2022;19(3):3–8.

2. Wang C., Li J, Zhao S, Huang L. Diabetic encephalopathy causes the imbalance of neural activities between hippocampal glutamatergic neurons and GABAergic neurons in mice. *Brain Res*. 2020;1742:146863. doi:10.1016/j.brainres. 2020.146863

3. Аврущенко М. Ш., Острова И. В. Постреанимационные изменения экспрессии мозгового нейротрофического фактора (BDNF): взаимосвязь с процессом гибели нейронов. *Общая реаниматология*. 2017;13(4):6–21.

4. Moosaie F., Mohammadi S., Saghadzadeh A. et al. Brain-derived neurotrophic factor in diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2023; 18(2):e0268816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268816>.

5. Magdalena M., Morici J. F., Zanoni M. B. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019;13:363.

6. Piątkowska-Chmiel I., Gawrońska-Grzywacz M., Popiołek Ł. et al. The novel adamantane derivatives as potential mediators of inflammation and neural plasticity in diabetes mice with cognitive impairment. *Sci Rep*. 2022;12(1):6708.

7. Тюренок И. Н., Смирнов А. В., Бакулин Д. А. и др. Морфологические особенности миокарда при экспериментальном сахарном диабете и его фармакологической коррекции мефаргином. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2022;4:25–29.

8. Selvarajah D., Wilkinson I. D., Fang F. et al. Structural and Functional Abnormalities of the Primary Somatosensory Cortex in Diabetic Peripheral Neuropathy: A Multimodal MRI. *Tesfaye Diabetes*. 2019;68(4):796–806. doi: 10.2337/db18-0509.

9. Tyurenkov I. N., Smirnov A. V., Mednikov D. S. et al. Functional and morphological changes in the pyramidal layer of the hippocampus in rats with encephalopathy induced by prolonged exposure to gravitational overloading. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2020;50(4):479–484.

10. Liu P., Li H., Wang Y. et al. Harmine Ameliorates Cognitive Impairment by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation and En-

hancing the BDNF/TrkB Signaling Pathway in STZ-Induced Diabetic Rats. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:535.

11. Rozanska O., Uruska A., Zozulinska-Ziolkiewicz D. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:841.

REFERENCES

1. Smirnov A. V., Bisinbekova A. I., Faibisovich T. I. Morphofunctional changes of the brain in diabetes mellitus. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of the Volgograd State Medical University*. 2022;19(4):3–8.

2. Wang C., Li J., Zhao S., Huang L. Diabetic encephalopathy causes the imbalance of neural activities between hippocampal glutamatergic neurons and GABAergic neurons in mice. *Brain Res.* 2020;1742:146863. doi:10.1016/j.brainres.2020.146863

3. Avrushchenko M. Sh., Ostrova I. V. Postresuscitative Changes of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Protein Expression: Association With Neuronal Death. *Obshchaya reanimatologiya = General reanimatology*. 2017;13(4):6–21.

4. Moosaie F., Mohammadi S., Saghadzadeh A. et al. Brain-derived neurotrophic factor in diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2023; 18(2):e0268816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268816>.

5. Magdalena M., Morici J.F., Zannoni M. B. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the

Healthy and the Pathological Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019;13:363.

6. Piątkowska-Chmiel I., Gawrońska-Grzywacz M., Popiołek Ł. et al. The novel adamantane derivatives as potential mediators of inflammation and neural plasticity in diabetes mice with cognitive impairment. *Sci Rep.* 2022;12(1):6708.

7. Tyurenkov I. N., Smirnov A. V., Bakulin D. A. et al. Morphological features of the myocardium in experimental diabetes mellitus and its pharmacological correction with mefargin. *Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Volgograd Medical Scientific Journal*. 2022;4:25–29. (In Russ.).

8. Selvarajah D., Wilkinson I. D., Fang F. et al. Structural and Functional Abnormalities of the Primary Somatosensory Cortex in Diabetic Peripheral Neuropathy: A Multimodal MRI. *Tesfaye Diabetes*. 2019;68(4):796–806. doi: 10.2337/db18-0509.

9. Tyurenkov I. N., Smirnov A. V., Mednikov D. S. et al. Functional and morphological changes in the pyramidal layer of the hippocampus in rats with encephalopathy induced by prolonged exposure to gravitational overloading. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2020;50(4):479–484.

10. Liu P., Li H., Wang Y. et al. Harmine Ameliorates Cognitive Impairment by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation and Enhancing the BDNF/TrkB Signaling Pathway in STZ-Induced Diabetic Rats. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:535.

11. Rozanska O., Uruska A., Zozulinska-Ziolkiewicz D. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:841.

Информация об авторах

Максим Вячеславович Шмидт – кандидат медицинских наук, доцент, schmidtmv80@gmail.com

Алексей Владимирович Смирнов – доктор медицинских наук, профессор, alexeysmirnov.volggmu@gmail.ru

Иван Николаевич Тюренок – чл.-корр РАН, доктор медицинских наук, профессор, fibfuv@mail.ru

Дмитрий Александрович Бакулин – кандидат медицинских наук, доцент, fibfuv@mail.ru

Юлия Ивановна Великородная – научный сотрудник, alta-u@mail.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 14.06.2023; одобрена после рецензирования 14.07.2023; принята к публикации 14.08.2023.

Information about authors

Maksim V. Schmidt – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, schmidtmv80@gmail.com

Alexey V. Smirnov – Doctor of Medical Sciences, Professor, alexeysmirnov.volggmu@gmail.com

Ivan N. Tyurenkov – Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Professor, fibfuv@mail.ru

Dmitry A. Bakulin – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, fibfuv@mail.ru

Yulia I. Velikorodnaya – Researcher, alta-u@mail.ru

The authors declare no conflicts of interests.

The article was submitted 14.06.2023; approved after reviewing 14.07.2023; accepted for publication 14.08.2023.