

На правах рукописи

Астраханова Татьяна Александровна

**МЕХАНИЗМЫ BDNF – ОПОСРЕДОВАННОЙ АДАПТАЦИИ
НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ К ДЕЙСТВИЮ ГИПОКСИИ**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2019

Работа выполнена на кафедре нейротехнологий Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Научный руководитель: **Ведунова Мария Валерьевна**

доктор биологических наук, профессор кафедры нейротехнологий ИББМ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Официальные оппоненты: **Белослудцев Константин Николаевич**

доктор биологических наук,
профессор кафедры биохимии, клеточной биологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет»

Наumenko Владимир Сергеевич

доктор биологических наук, заведующий лабораторией нейрогеномики поведения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Ведущая организация: ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук

Защита состоится: «10» октября 2019 года в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.21 при ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/927>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Соколова Евгения Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Изучение процессов адаптации нервной системы к гипоксическому повреждению остается ключевой проблемой современной нейробиологии и медицины. Исследуемый вопрос осложняется тем, что аэробный обмен веществ в клетках головного мозга является одним из наиболее интенсивных, а процессы адаптации сопровождаются изменениями как на функциональном, так и на метаболическом уровнях. Среди перестройки различных систем, направленных на обеспечение доставки к тканям кислорода, энергетический обмен имеет первостепенное значение. В связи с этим, актуальным является поиск веществ, способных контролировать метаболизм клеток головного мозга в условиях стресса, в том числе и при гипоксии. Научный интерес сегодня отводится молекулам эндогенного происхождения, среди которых выделяют нейротрофический фактор головного мозга BDNF (англ. Brain-derived Neurotrophic Factor). Показано, что BDNF способен снижать негативные последствия гипоксического повреждения и минимизировать последствия ишемии головного мозга. Реализация функций нейротрофического фактора опосредована связыванием с тирозинкиназным рецептором В (TrkB), сопровождающегося запуском основных метаболических каскадов. В литературе частично представлены данные о влиянии BDNF на митохондрии, однако отсутствует единое понимание механизмов защитного действия BDNF, поскольку имеющиеся экспериментальные результаты нередко противоречивы и являются предметом дискуссии (Максимович и др., 2019; Ураков, 2019; Lejri et al., 2018; Sheng et al., 2018; Xu et al., 2018; Ishii et al., 2019; Lacerte, Mesfin, 2019).

Не менее важным аспектом является исследование процессов адаптации нервной системы к действию гипоксии на нейросетевом уровне. При длительном культивировании клеток головного мозга возможно изучение как функциональных, так и метаболических свойств нервных клеток. Принципиальным отличием является возможность исключить адаптацию к недостатку кислорода на системном уровне и провести анализ на уровне нейронной сети (Митрошина и др., 2011; Stepanova et al., 2019).

Таким образом, более детальное изучение механизмов BDNF – опосредованной адаптации нервной системы к недостатку кислорода позволит сформировать фундаментальную основу для решения проблемы восстановления функциональной и метаболической активности клеток головного мозга как на нейросетевом, так и на системном уровнях.

Цель и задачи исследования

Целью работы явилось исследование антигипоксического действия BDNF при моделировании гипоксии *in vivo* и *in vitro*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить взаимосвязи между концентрацией BDNF и устойчивостью животных к гипоксии;
2. Изучить TrkB - опосредованный механизм действия BDNF на функциональное состояние митохондрий при моделировании гипоксии;

3. Исследовать влияние BDNF на метаболическую активность нейрон-глиальной сети при моделировании гипоксии *in vitro*;
4. Изучить влияние экзогенного BDNF на синтез мРНК эндогенного BDNF;
5. Исследовать влияние BDNF на синтез мРНК одного из антиапоптотических агентов NFκB1.

Научная новизна

Впервые осуществлено комплексное изучение особенностей антигипоксического действия BDNF на митохондрии. Выявлена взаимосвязь между концентрацией BDNF и устойчивостью животного к гипоксии.

Показано, что хроническое экзогенное введение BDNF в условиях нормоксии (1 нг/мл) стимулирует работу I и II дыхательных комплексов (*in vitro*).

Впервые показано, что хроническое эндогенное накопление BDNF оказывает нейропротективный эффект в условиях гипоксии на уровне метаболизма митохондрий (*in vivo*).

Показано влияние экзогенного BDNF на синтез собственного внутриклеточного нейротрофического фактора головного мозга на разных сроках развития и функционировании нейрон-глиальной сети (*in vitro*).

Научно-практическая значимость

Полученные в работе данные о действии нейротрофического фактора головного мозга на метаболизм митохондрий в условиях гипоксии расширяют теоретические представления о механизмах нейропротективного действия BDNF в условиях стресс-факторов и углубляют понимание его молекулярных сигнальных механизмов.

Показано, что BDNF может являться корректором энергетического метаболизма клеток головного мозга в условиях гипоксии.

Основные результаты и выводы будут использованы в учебном процессе при разработке спецкурсов для студентов ВУЗов и аспирантов биологического профиля.

Личный вклад автора

Автор лично принимал участие в проведении экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также совместно с соавторами участвовал в написании научных статей и апробации результатов исследования на конференциях и симпозиумах.

Положения, выносимые на защиту

1. Устойчивость животных к действию острой гипобарической гипоксии зависит от функционального состояния митохондрий и связана с концентрацией BDNF в головном мозге.
2. BDNF влияет на показатели функционального состояния митохондрий в норме и при гипоксии.
3. Увеличение BDNF стимулирует синтез мРНК эндогенного BDNF.

4. Действие BDNF на митохондрии связано с молекулярными каскадами, активируемые через TrkB-рецепторы.

5. Антигипоксическое действие BDNF не связано с увеличением синтеза мРНК антиапоптотического фактора NFkB1.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на следующих международных и всероссийских конференциях: 67-71й всероссийской школе-конференции с международным участием «Биосистемы: Организация, Поведение, Управление» (Нижний Новгород, 2014-2018); IV международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014); международной конференции «Proceedings of World conference on regenerative medicine (Ляйпциг, 2015); международной конференции «Proceedings of 12th European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease Location» (Испания, 2015); международной конференции Opera Medica et Physiologica, N. Novgorod. Russia (Нижний Новгород, 2015-2016, Нижний Новгород-Самара, 2018); V всероссийском съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015); всероссийской конференции «Современная нейробиология: достижения, закономерности, проблемы, инновации, технологии» (Уфа, 2015); международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2015, 2017); 20 – й международной Пушинской школе–конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (Пушино, 2016, 2018); 21–м двухгодичном симпозиуме международного общества по нейронауке от стволовых клеток до поведения в норме и патологии ЦНС (Антиб, 2016); Тринадцатом международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2017); всероссийской с международным участием междисциплинарной научной школе, в рамках подготовки к XXIII Съезду Российского Физиологического Общества им. И.П. Павлова посвященному 100 – летию создания этого общества Иваном Петровичем Павловым Воронеж, 2017); международной конференции Brain Injury Across the Age Spectrum: Improving Outcomes for Children, Adolescents, and Adults in this issue в журнале Head Trauma Rehabilitation (Филадельфия, 2018).

Публикации

По теме диссертации опубликована 32 работы, из них 7 статей в реферируемых журналах, входящих в перечень ВАК, 24 тезиса в сборниках всероссийских и международных конференций, 1 учебно-методическое пособие.

Структура и объем диссертации

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 102 страницах, содержит 42 рисунка и 4 таблицы. Список литературы содержит 101 источник.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектом исследований *in vitro* служили первичные культуры клеток головного мозга, полученные от мышинных эмбрионов 18 дня гестации линии СВА.

Рисунок 1. Культура диссоциированных клеток гиппокампа, полученная от 18-дневных эмбрионов мышей линии СВА

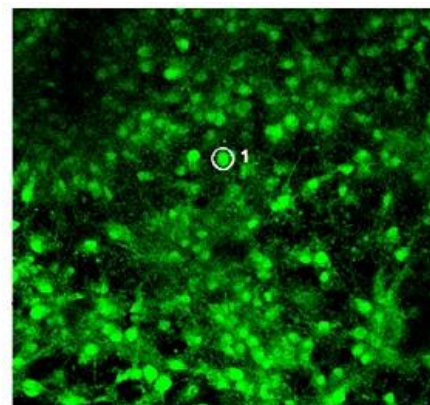


Культивирование клеток гиппокампа осуществлялось с целью регистрации кальциевой активности культур, скорости потребления кислорода митохондриями, определения экспрессии мРНК BDNF и мРНК NFkB1 при моделировании нормобарической гипоксии.

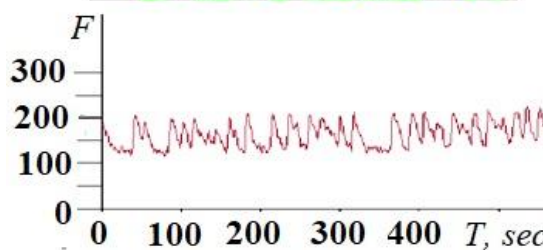
Опыты *in vivo* проводились на самцах мышей линии C57BL/6, СВА (моделирование острой гипобарической гипоксии). Содержание животных в сертифицированном виварии Национального исследовательского Нижегородского государственного университета и исследовательская работа проводились в соответствии с требованиями приказов №1179 МЗ СССР от 11.10.1983 и №267 МЗ РФ от 19.06.2003, а также в соответствие с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» и отвечали требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и были согласованы с биоэтической комиссией ННГУ.

Метод регистрации функциональной кальциевой активности. В работе был использован лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Carl Zeiss LSM 510 DuoScan (Германия).

Рисунок 2. Характерный пример зарегистрированной спонтанной кальциевой активности в культуре первичных диссоциированных клеток гиппокампа (ось ординат - интенсивность флуоресценции, F%, ось абсцисс - время T, с)



Регистрировались временные серии изображений поля флуоресценции красителя (зонда Oregon Green 488 BAPTA-1 AM). Выделение кальциевых осцилляций, полученных при помощи флуоресцентной конфокальной микроскопии, проводили с помощью оригинального программного пакета «Astroscanner». Интенсивность флуоресценции показывала зависимость внутриклеточной концентрации ионов кальция от времени, свидетельствующую о метаболической активности клеток, связанных в сети определенной архитектуры (Митрошина и др., 2011; Пимашкин и др., 2010).



Метод прижизненной детекции мРНК при помощи РНК-детекторных зондов. Детектирование мРНК осуществлялось при помощи РНК-детекторных зондов (рис. 3) SmartFlare™ (Merck Millipore), которые позволяют проводить прижизненные исследования накопления мРНК без повреждения клеток. Визуализация мРНК-зондов осуществлялась с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 510 DuoScan (Германия).

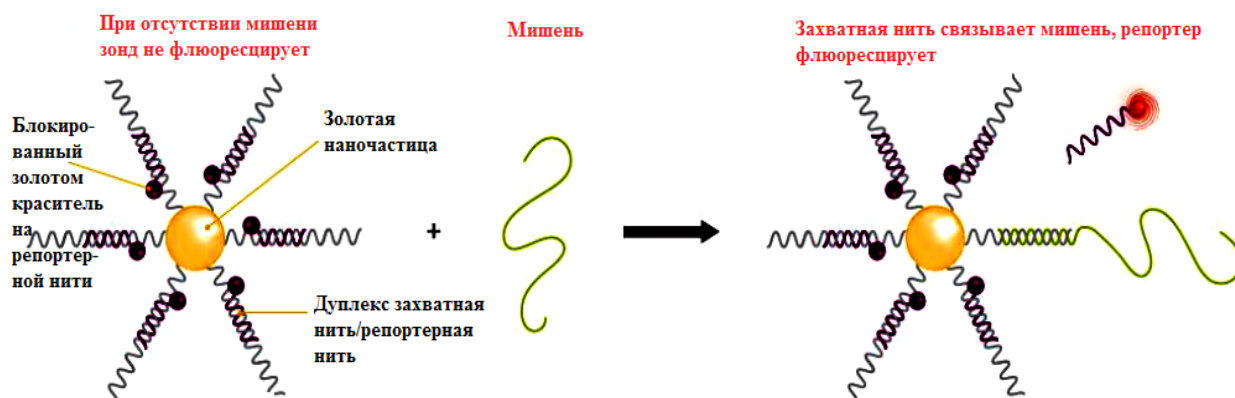


Рисунок 3. Принцип работы мРНК детекторного зонда Smart Flare

Олиго-дууплексы состоят из «РНК-захватывающей» нити, и комплементарной ей «репортерной» последовательности, которая включает флуорофор, блокированный золотой наночастицей. Проникнув в клетку зонд вступает в контакт со своей РНК-мишенью, последняя связывается с комплементарной ей «захватывающей» нитью и заменяет репортерную нить. Репортерная нить, флуорофор в которой теперь разблокирован, флуоресцирует и может быть детектирована.

Моделирование нормобарической гипоксии *in vitro* проводили путем 10-минутной замены нормоксической культуральной среды на среду со сниженным (в 10 раз) содержанием кислорода. Опытной группе за 20 минут до начала эксперимента, во время гипоксического воздействия, и сразу после, в среду культивирования добавляли 1 нг/мл BDNF. Ранее было показано, что применение данной концентрации нейротрофического фактора при моделировании гипоксии является оптимальной (Ведунова с соавт., 2014).

Моделирование острой гипобарической гипоксии осуществлялось путем помещения мыши в барокамеру, в которой создавали давление 220-240 мм рт. ст., что соответствует высоте 10000 м над уровнем моря до первого агонального вздоха. Проводилось распределение животных по устойчивости к действию ОГБГ по критерию времени жизни (Тж, мин) на «высоте». Тж отсчитывали от момента подъема на площадку до остановки дыхания, либо появления второго агонального вдоха. В группу низкоустойчивых (НУ) включали животных с Тж менее 3 мин, в группу среднеустойчивых (СУ) с Тж от 3 до 7 мин и в группу высокоустойчивых (ВУ) особей, выживающих на «высоте» от 7 до 10 мин.

Метод оценки функционального состояния митохондрий заключался в регистрации скорости потребления кислорода изолированными митохондриями при помощи респирометра Oroboros Oxygraph-2k (Австрия).

Согласно классификации Чанса проведена оценка функциональных состояний митохондрий (V3 и V4). На рисунке 4 приведена схематизированная запись изменения скорости потребления кислорода митохондриями клеток головного мозга.



Рисунок 4. Характерный пример зарегистрированной скорости потребления кислорода митохондриями (ось ординат слева – скорость потребления кислорода митохондриями (пмоль/(с*мл), ось абсцисс – точки добавления компонентов в экспериментальную среду)

Оценивали состояние V4 – дыхание на экзогенных субстратах (5 мМ глутамат, 5 мМ малат или 10 мМ сукцинат), но в отсутствии АДФ; состояние V3 – скорость дыхания митохондрий при окислительном фосфорилировании, то есть в присутствии субстратов окисления и АДФ. А также дыхательный контроль, то есть отношение V3/V4, характеризующего степень сопряжения дыхательной цепи митохондрий.

Результаты и их обсуждение

Влияние ОГБГ на функциональное состояние митохондрий головного мозга

Для выявления особенностей активности дыхательной цепи митохондрий в условиях гипоксии в зависимости от концентрации нейротрофического фактора головного мозга проведен анализ функционального состояния митохондрий у мышей линии C57BL/6 через 1 сутки после моделирования ОГБГ.

Не выявлено достоверных отличий при регистрации скорости потребления кислорода митохондриями в состоянии V4 и V3 (окисление глутамата и малата) (рис. 5 А, Б). Однако, зафиксировано достоверное ($p \leq 0,01$, критерий Манна-Уитни) снижение значений в группе гипоксия при оценке состояния V4, где в качестве субстрата окисления выступал сукцинат (рис. 5 В). Это говорит о

значительной степени повреждения дыхательной цепи митохондрий при используемой модели ОГБГ. В этом случае, согласно литературным данным, повреждение электронотранспортной функции митохондрий распространяется поступательно и затрагивает вначале область цитохромов в-с (III комплекс), затем цитохромоксидазу (IV комплекс) (Лукиянова, 2003).

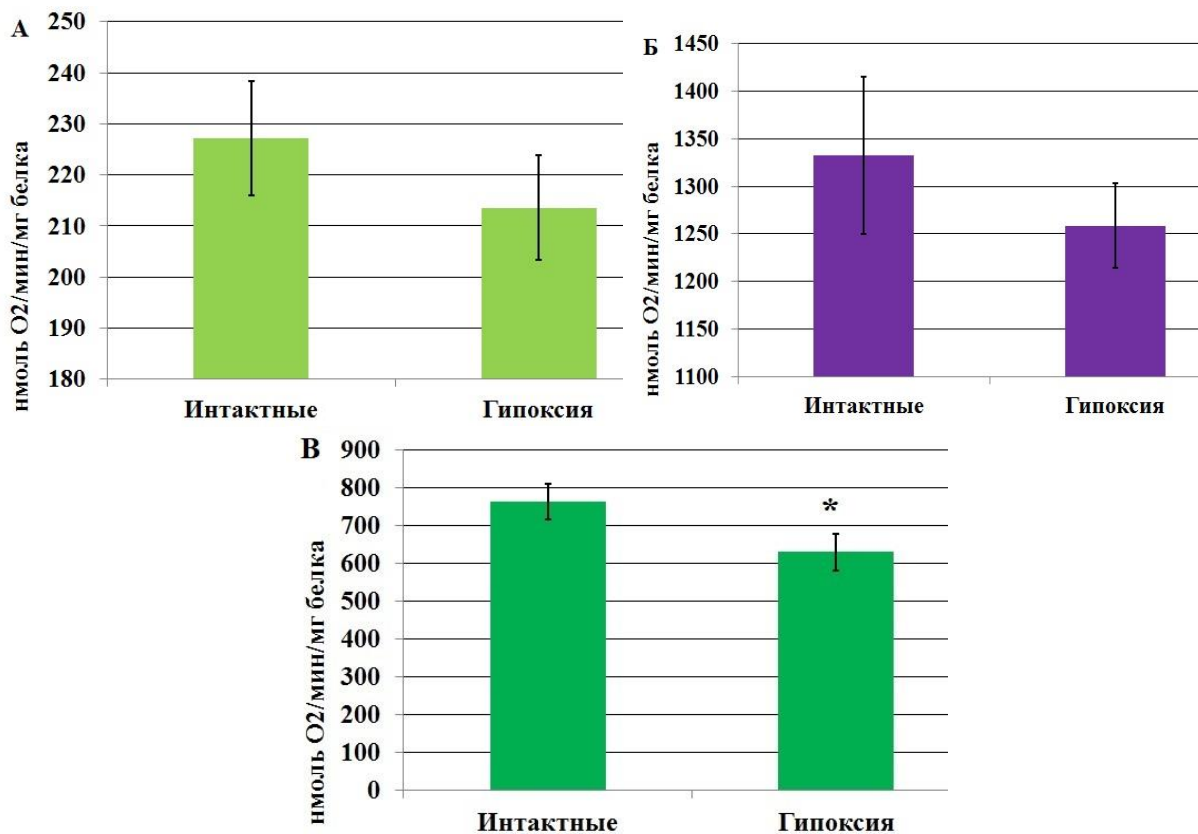


Рисунок 5. Показатели состояния дыхательной цепи митохондрий клеток головного мозга мышей после эпизода ОГБГ (1 сутки после гипоксии)

* - достоверные отличия от показателей интактной группы

$p \leq 0,01$, критерий Манна-Уитни

А – скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии V4 (субстраты глутамат и малат)

Б – скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии V3 (субстраты глутамат, малат, АДФ)

В – скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии V4 (субстрат сукцинат)

При оценке концентрации нейротрофического фактора BDNF у мышей линии C57BL/6 выявлено снижение показателей в группе Гипоксия, но достоверные различия отсутствуют.

С целью исследования характерных особенностей состояния дыхательной цепи митохондрий у животных с разной устойчивостью к ОГБГ осуществлен анализ состояния дыхательной цепи митохондрий у высоко-, средне- и низкоустойчивых животных (рис. 6). Показано, что в группах среднеустойчивых (С.У.) и низкоустойчивых (Н.У.) животных скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии V4 при окислении субстратов глутамата и малата достоверно ($p \leq 0,01$, критерий Манна-Уитни) ниже значений Интактной группы и группы высокоустойчивых (В.У.) животных (показатели группы С.У. на 20% меньше значений Интактной группы и группы В.У. животных; показатели Н.У.

животных ниже на 30 % относительно Интактной группы и на 29 % относительно группы В.У. животных) (рис. 6А).

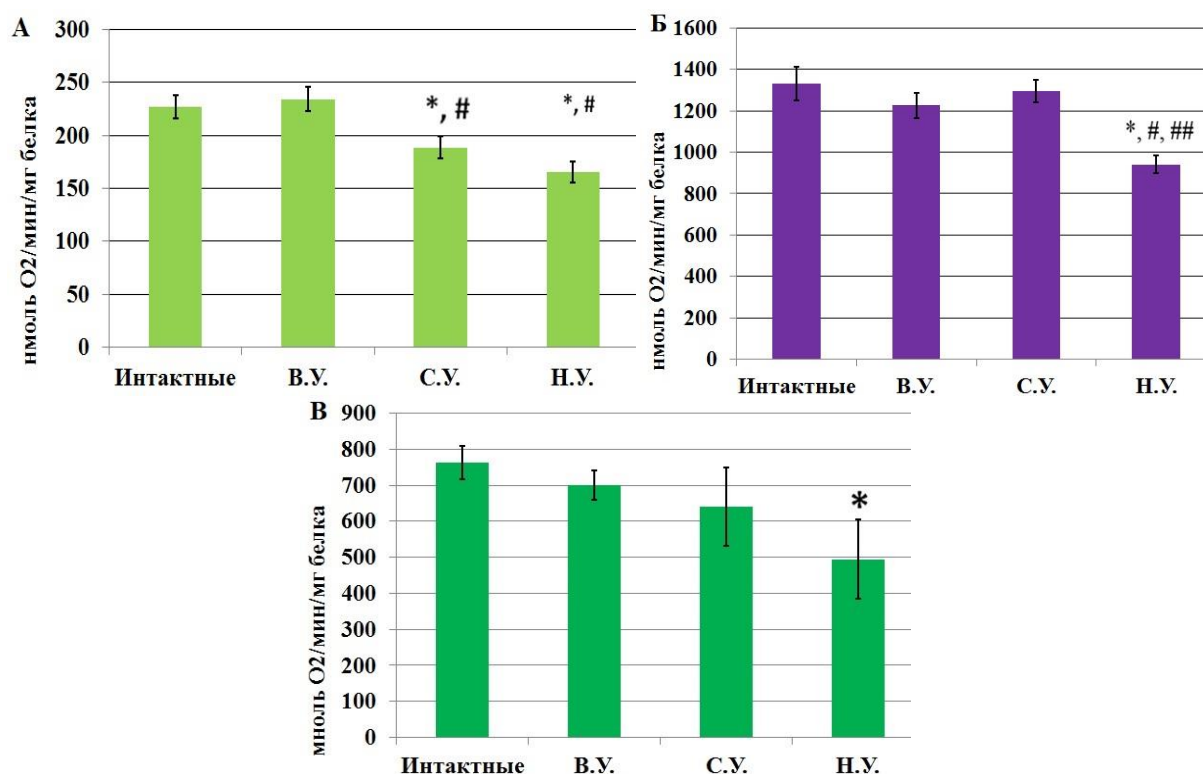


Рисунок 6. Показатели состояния дыхательной цепи митохондрий клеток головного мозга мышей с различной устойчивостью к ОГБГ (1 сутки после гипоксии)

* - отличие от интактной группы

- отличие относительно группы высокоустойчивых животных (В.У.)

- отличие относительно группы среднеустойчивых животных (С.У.)

В.У. – высокоустойчивые животные

С.У. – среднеустойчивые животные

Н.У. – низкоустойчивые животные

$p \leq 0,01$, критерий Манна-Уитни

А – скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии V4 (субстраты глутамат и малат)

Б – скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии V3 (субстраты глутамат, малат, АДФ)

В – скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии V4 (субстрат сукцинат)

Скорость потребления кислорода митохондриями головного мозга в состоянии V4 при окислении сукцината (рис. 6В) достоверно снижается только в группе Н.У. животных. Значения состояния V3 (рис. 6Б) достоверно ($p \leq 0,01$, критерий Манна-Уитни) снижаются только в группе Н.У. животных и составляют $940,74 \pm 42,14$ нмоль O₂/мин/мг белка, что на 29% ниже значений Интактной, на 23 % В.У. и на 27 % С.У. групп животных.

Из полученных результатов следует, что через сутки после моделирования ОГБГ у В.У. животных отсутствуют достоверные изменения показателей V4 и V3. Однако же в группе С.У. животных отмечается нарушение НАДН-зависимого участка дыхательной цепи. В ответ на снижение концентрации кислорода происходит подавление его активности. Это состояние компенсируется активацией компенсаторных механизмов – активация II комплекса дыхательной

цепи (сукцинатоксидазный путь окисления). Интересно отметить, что в группе Н.У. животных через 1 сутки после ОГБГ такое переключение не наблюдается. В этом случае происходит подавление и I, и II комплексов дыхательной цепи. Таким образом, при острой гипоксии у Н.У. животных наблюдается более ранняя дезнегизация клеток, которая характеризуется более выраженными функционально-метаболическими нарушениями. Компенсаторные механизмы оказываются недостаточными.

Также была выявлена зависимость между концентрацией нейротрофического фактора и устойчивостью животных к ОГБГ. Установлена корреляция между концентрацией нейротрофического фактора и устойчивостью к ОГБГ (Коэффициент корреляции между концентрацией BDNF и временем жизни на высоте в группе Н.У. составил 0,73). Таким образом, BDNF связан с устойчивостью животных к ОГБГ и, следовательно, может участвовать в адаптации нервной системы к недостатку кислорода.

Влияние нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на функциональное состояние митохондрий головного мозга

Для более детального изучения роли BDNF в адаптации нервной системы к гипоксии на следующем этапе проведена оценка TrkB-опосредованного действия BDNF на выживаемость мышей и активность дыхательной цепи митохондрий при моделировании ОГБГ. Показано, что однократное введение нейротрофического фактора головного мозга положительно влияет на выживаемость животных, тогда как при блокаде TrkB-рецепторов выживаемость животных снижается в 2 раза относительно значений группы Гипоксия (рис. 7). Выживаемость животных в группе Гипоксия составила 27%; в группе Гипоксия + ANA-12 (животные с превентивным введением ANA-12 (0,5 мг/кг)) — 13%. В группе животных Гипоксия + BDNF (животные с превентивным введением BDNF (4мкг/кг)) выживаемость составила в среднем 40%, что в 1,4 раза выше, чем в группе Гипоксия.

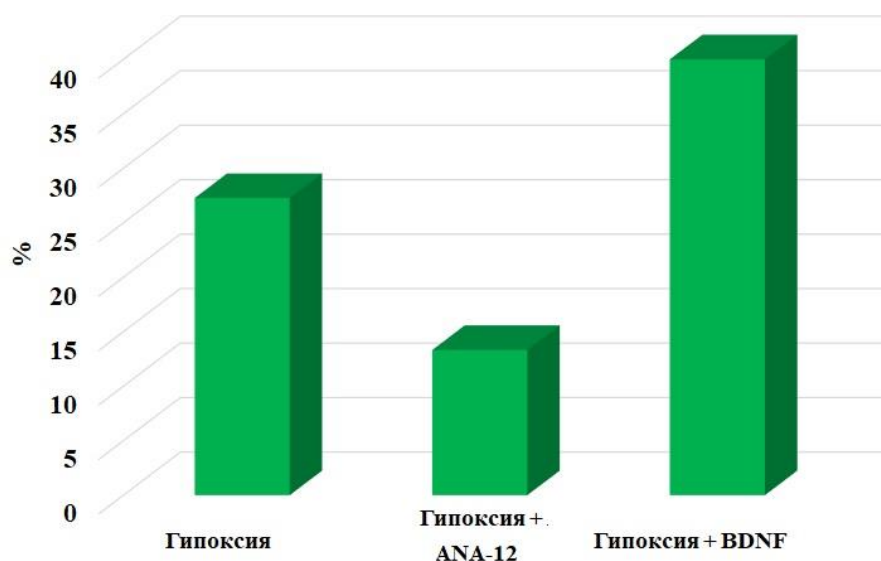


Рисунок 7. Выживаемость мышей после моделирования острой гипобарической гипоксии

Поскольку блокада TrkB-рецепторов нейротрофического фактора головного мозга отражается на выживаемости животных проведен анализ TrkB -

опосредованного механизма действия BDNF на функциональное состояние митохондрий при моделировании гипоксии.

Показано, что в условиях гипоксии снижение сопряжения окисления и фосфорилирования обусловлено BDNF-TrkB-сигнализацией. При оценке степени сопряжения окислительного фосфорилирования (табл. 1) установлено, что в условиях гипоксии коэффициент дыхательного контроля V3/V4 достоверно снижается до $3,81 \pm 0,31$ по сравнению с интактными значениями ($6,31 \pm 0,38$) ($p \leq 0,01$, критерий Манна-Уитни).

Таблица 1

Показатели состояния дыхательной цепи митохондрий головного мозга мышей после эпизода ОГБГ

Группа	V3/V4
Интактные	$6,31 \pm 0,38$
Гипоксия	$3,81 \pm 0,31^*$
Гипоксия + BDNF	$6,09 \pm 0,48^{\#}$
Гипоксия + ANA-12	$4,13 \pm 0,29^{*,\#,##}$

* - отличие относительно интактной группы, # - отличие от группы Гипоксия, ## - отличие от группы Гипоксия+BDNF ($p \leq 0,01$, критерий Манна-Уитни)

Применение блокатора TrkB-рецепторов ANA-12 (0,5 мг/кг) в условиях острой гипобарической гипоксии (группа Гипоксия + ANA-12) также приводит к снижению дыхательного контроля и составляет $4,13 \pm 0,29$. Уменьшение значений дыхательного контроля свидетельствует о снижении степени сопряжения окисления и фосфорилирования.

Однако нами зафиксировано, что однократное применение нейротрофического фактора головного мозга BDNF восстанавливает значение V3/V4 практически до интактных показателей и составляет $6,09 \pm 0,48$.

Таким образом, в условиях ОГБГ превентивное введение BDNF поддерживает степень сопряжения окисления и фосфорилирования в пределах показателей интактных значений. Этот механизм имеет решающее значение поскольку в результате его функционирования определяется скорость синтеза АТФ в клетке.

Митохондриальная дисфункция является ключевым моментом при нарушении нейропластичности, нейрональной дегенерации и развитии нейродегенеративных заболеваний поскольку нейросетевые процессы сопровождаются большим расходом энергии. Нейрон-глиальные сети являются хорошей модельной системой относительно простого клеточного моносостава определенных областей мозга. В связи с этим, принципиальным является вопрос рассмотрения влияния BDNF на нейрон-глиальные клетки, поскольку это исключает системный эффект механизмов адаптации.

Влияние нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на функциональное состояние митохондрий первичных диссоциированных культур

Проведен анализ показателей состояния дыхательной цепи митохондрий

первичных диссоциированных культур при хроническом введении нейротрофического фактора головного мозга, поскольку существенно важным вопросом является определение адаптационной роли BDNF на уровне функционирования отдельной нейрон-глиальной сети.

Показано, что в условиях нормоксии хроническое добавление BDNF (1 нг/мл) стимулирует дыхание в состоянии V4 при окислении глутамата и малата (рис. 8А). Значения V4 при ежедневном введении BDNF увеличиваются в 2 раза по сравнению с интактной группой (14 день развития культуры, 14DIV). Однако изменение дыхания в состоянии V4 при окислении сукцината не зафиксировано (рис. 8В). При этом установлено, что хроническая блокада TrkB-рецепторов приводит к достоверному снижению дыхания в состоянии V3 (рис. 8Б).

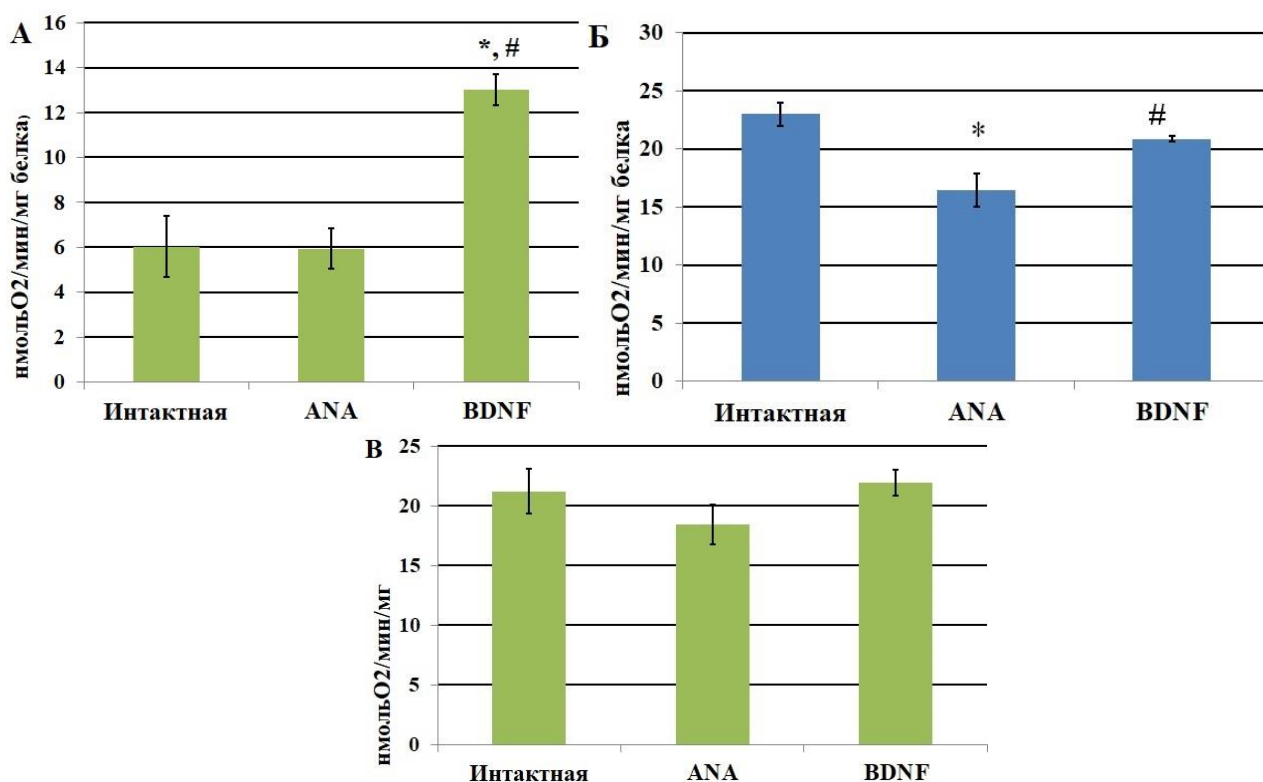


Рисунок 8. Показатели состояния дыхательной цепи митохондрий первичной диссоциированной культуры клеток головного мозга, 14 DIV

* - отличие от интактной группы

- отличие от группы ANA-12

$p \leq 0,01$, критерий Манна-Уитни

А – скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии V4 (субстраты глутамат и малат)

Б – скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии V3 (субстраты глутамат, малат, АДФ)

В – скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии V4 (субстрат сукцинат)

Исключительно важным является вопрос о влиянии нейротрофического фактора головного мозга на функционирование дыхательной цепи митохондрий при его хроническом эндогенном накоплении.

Влияние вирусной трансдукции BDNF на функциональное состояние митохондрий головного мозга

Для исследования хронического, но уже эндогенного накопления

концентрации BDNF, в головной мозг новорожденных мышей (P1) был инжектирован аденоассоциированный вирусный вектор AAV-Syn-BDNF-eGFP, несущий в своей последовательности гены нейротрофического фактора головного мозга.

Установлено, что использование вирусного конструкта, обеспечивающего хроническое накопление BDNF в течение 1,5 месяцев, влияет на показатели состояния дыхательной цепи митохондрий (рис.9).

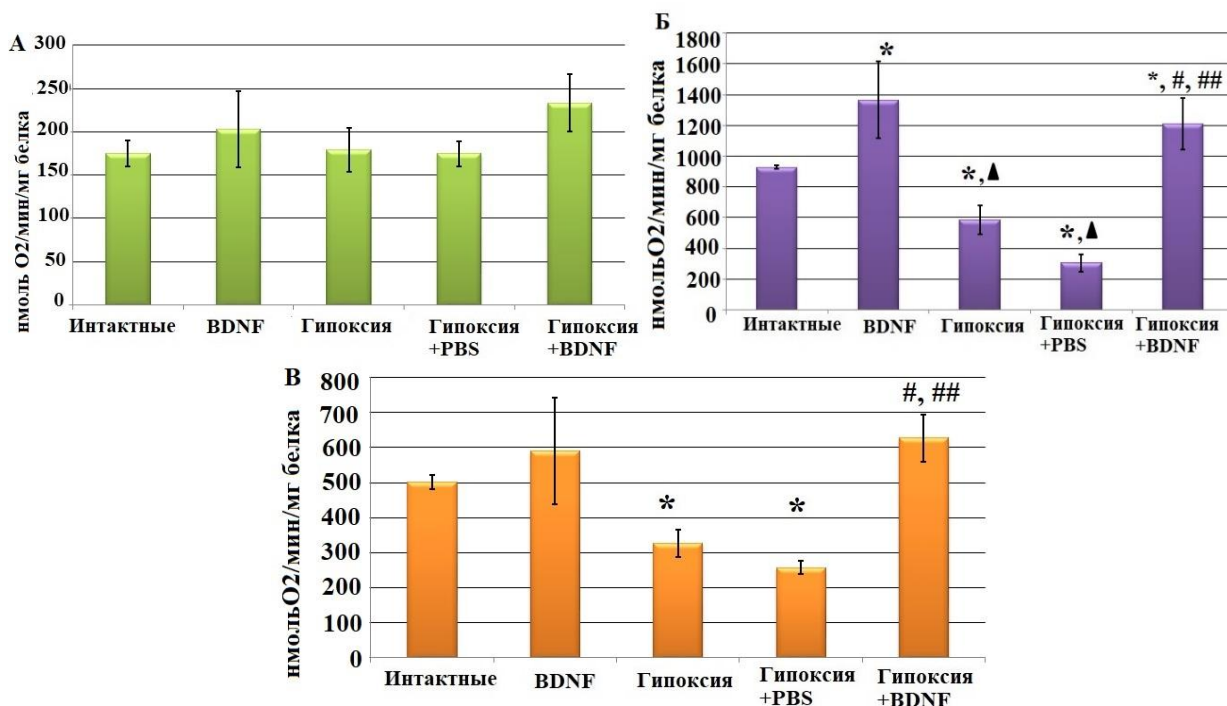


Рисунок 9. Показатели состояния дыхательной цепи мышей, трансфицированных вирусным вектором AAV-Syn-BDNF-eGFP

* - отличие от интактной группы

▲ - отличие от группы BDNF

- отличие от группы Гипоксия

- отличие от группы Гипоксия + PBS

$p \leq 0,01$, критерий Манна-Уитни

А – скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии V4 (субстраты глутамат и малат)

Б – скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии V3 (субстраты глутамат, малат, АДФ)

В – скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии V4 (субстрат сукцинат)

Показано, что при хроническом эндогенном накоплении BDNF проявляет нейропротективные свойства, поскольку поддерживает дыхание в состоянии V4 при окислении субстрата сукцината (рис. 9В). При этом хроническое накопление BDNF не только восстанавливает показатели состояния V3, но и препятствует их падению (рис. 9Б) после эпизода ОГБГ до интактных значений, но и приводит к их достоверному росту ($p \leq 0,01$, критерий Манна-Уитни).

Также показано, что нейротрофический фактор головного мозга реализует нейропротективный эффект на уровне сохранения дыхательного контроля (табл. 2). Эпизод ОГБГ приводил к снижению V3/V4 до $3,72 \pm 0,34$, что на 30% ниже интактных значений ($5,30 \pm 0,17$). Однако хроническое эндогенное накопление

нейротрофического фактора головного мозга сохраняет степень сопряжения окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий (не установлено отличий показателей между интактной группой и группой Гипоксия+BDNF).

Таблица 2

Показатели состояния дыхательной цепи митохондрий головного мозга после эпизода ОГБГ у мышей, трансфицированных вирусным вектором AAV-Syn-BDNF-eGFP

Группа	V3/V4
Интактные	5,30±0,17
BDNF	6,90±0,77 *, #, ##
Гипоксия	3,72±0,34 *
Гипоксия+PBS	2,33±0,16 *, #
Гипоксия+ BDNF	5,44±0,36 #, ##

*-отличие от интактной группы, #-отличие от группы Гипоксия, ##- отличие от группы Гипоксия+PBS ($p \leq 0,01$, критерий Манна-Уитни)

Интересно отметить, что в норме нейротрофический фактор головного мозга достоверно увеличивает значения дыхательного контроля ($6,90 \pm 0,77$) ($p \leq 0,01$, критерий Манна-Уитни).

С целью изучения механизмов адаптации нейрон-глиальных сетей, опосредованных действием нейротрофического фактора BDNF, перспективным является исследование ионных токов. Ионы кальция, являясь вторичным мессенджером, участвуют в реализации многочисленных биохимических сигнальных процессах и поэтому могут выступать в качестве индикатора функциональной активности на нейросетевом уровне.

Влияние нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на функциональную кальциевую активность диссоциированных культур гиппокампа *in vitro*

Проведена оценка антигипоксических и нейропротекторных свойств нейротрофического фактора BDNF по показателям функциональной кальциевой активности диссоциированных культур гиппокампа.

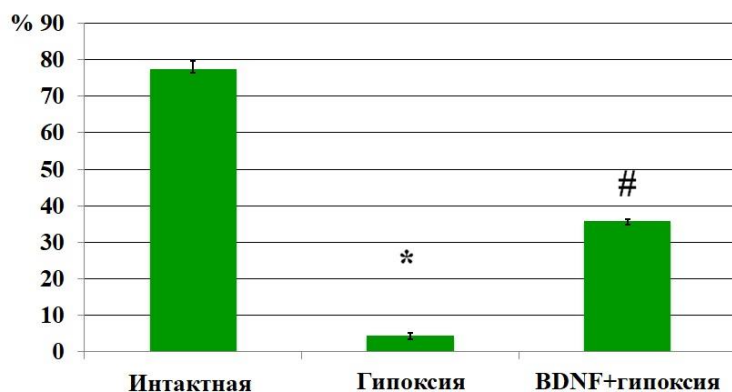


Рисунок 10. Процент клеток, проявляющих кальциевую активность на 15 день развития (через сутки после гипоксии)

* - различия достоверны относительно интактной группы ($p \leq 0,05$, ANOVA)

- различия достоверны относительно группы Гипоксия ($p \leq 0,05$, ANOVA)

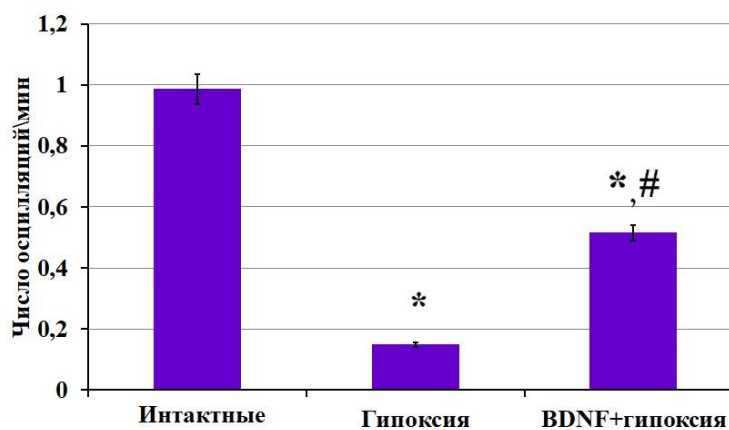


Рисунок 11. Частота кальциевых осцилляций на 15 день развития (через сутки после гипоксии)

* - различия достоверны относительно интактной группы ($p \leq 0,05$, ANOVA)

- различия достоверны относительно группы Гипоксия ($p \leq 0,05$, ANOVA)

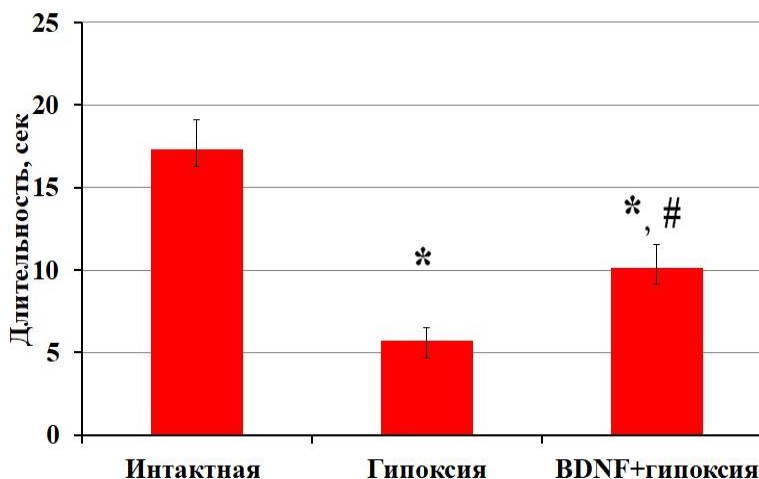


Рисунок 12. Длительность кальциевых осцилляций на 15 день развития (через сутки после гипоксии)

* - различия достоверны относительно интактной группы ($p \leq 0,05$, ANOVA)

- различия достоверны относительно группы Гипоксия ($p \leq 0,05$, ANOVA)

В результате проведенных исследований выявлено, что 10-минутная гипоксия вызывает необратимые изменения в функциональной кальциевой активности первичных диссоциированных культур гиппокампа. Уже через сутки количество клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность, достоверно уменьшается ($p \leq 0,05$, ANOVA) (рис. 10). В группе, которая была подвергнута гипоксическому воздействию, выявлено очень небольшое число клеток, проявляющих кальциевую активность ($3,9 \pm 1,2$ %) относительно интактных показателей ($77 \pm 1,3$ %). Применение BDNF (1 нг/мл) частично нивелирует негативное действие нормобарической гипоксии, что выражается в достоверном ($p \leq 0,05$, ANOVA) увеличении процента клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность ($35 \pm 1,2\%$).

Превентивное введение BDNF в концентрации 1 нг/мл в культуры, перенесших эпизод нормобарической гипоксии, оказывает положительное действие, которое выражается в достоверном увеличении частоты (рис. 11) и длительности (рис. 12) кальциевых осцилляций. Однако, превентивное введение BDNF, способствующее нормализации показателей кальциевой активности после эпизода нормобарической гипоксии, также характеризуется достоверными отличиями ($p \leq 0,05$, ANOVA) от интактных значений (рис. 11, 12), что, вероятно, обуславливает повреждающее действие гипоксии.

Различные уровни экспрессии BDNF имеют решающее значение для функционирования нейрон-глиальной сети. Важно оценить влияние экзогенного BDNF на синтез собственного внутриклеточного нейротрофического фактора головного мозга. В связи с этим, нами проведен ряд экспериментов по изучению

влияния экзогенного BDNF на синтез мРНК эндогенного BDNF на разных этапах развития диссоциированной культуры гиппокампа.

Показано, что концентрация эндогенного BDNF увеличивается на ранних сроках развития (рис. 13) и наиболее значима в период активного синаптогенеза (14 день развития).

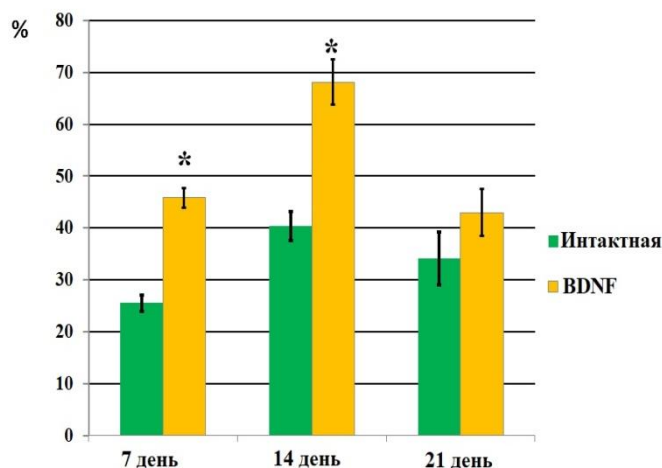


Рисунок 13. Доля мРНК BDNF – положительных клеток в первичных диссоциированных культурах гиппокампа на разных сроках развития (* - различия достоверны относительно интактной группы, # - различия достоверны относительно группы 7 дня развития ($p \leq 0,05$, ANOVA))

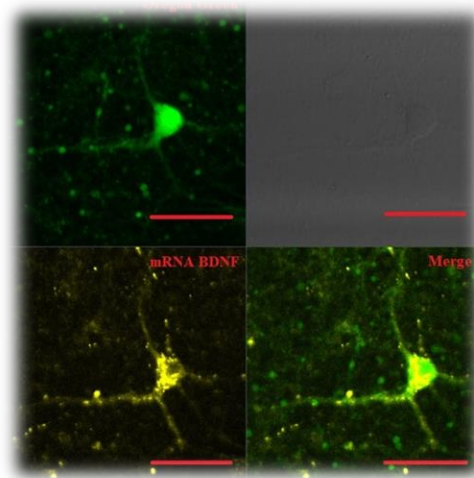


Рисунок 14. мРНК BDNF – положительная клетка первичной диссоциированной культуры гиппокампа

Одним из сигнальных путей BDNF является активация антиапоптотического фактора NFκB. Нами проведен анализ экспрессии мРНК NFκB1 в условиях нормоксии и гипоксии при аппликации нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) (рис. 15).

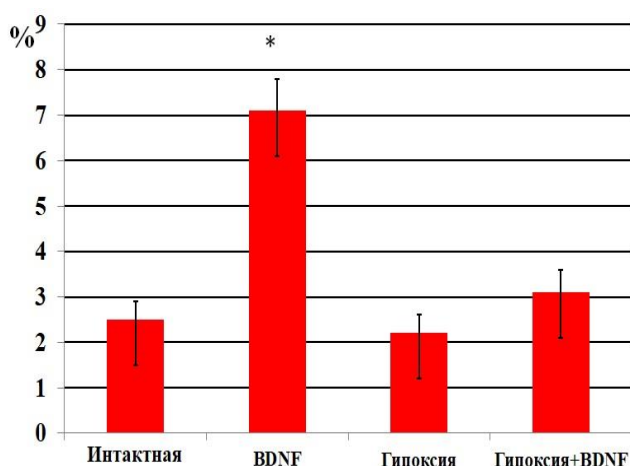


Рисунок 15. Процент NFκB1 - положительных клеток в первичной диссоциированной культуре гиппокампа через сутки после гипоксии
* - различия достоверны относительно интактной группы ($p \leq 0,05$, ANOVA)

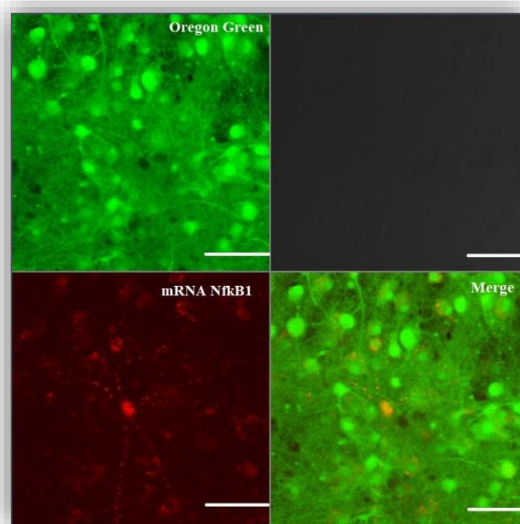


Рисунок 16. мРНК NFκB1 – положительная клетка первичной диссоциированной культуры гиппокампа

Показано, что BDNF оказывает достоверное ($p \leq 0,05$, ANOVA) влияние на увеличение процента клеток, в которых активируется синтез мРНК NFkB1 в нормальных условиях. В условиях кислородного голодания не выявлено достоверного увеличения процента NFkB1 – позитивных клеток, что может быть связано с подавлением синтетических процессов в клетке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное изучение антигипоксического действия нейротрофического фактора головного мозга (BDNF). Показано что нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) повышает устойчивость животных к действию острой гипобарической гипоксии и оказывает влияние на работу дыхательной цепи митохондрий посредством TrkB-сигнализации. Антигипоксический эффект реализуется за счет сохранения активности НАДН-зависимого пути окисления субстратов.

С целью более детального раскрытия механизма антигипоксического действия нейротрофического фактора головного мозга проведен анализ влияния BDNF на кальциевый гомеостаз нейрон-глиальной сети. Установлено, что превентивная аппликация BDNF способствовала сохранению функциональной кальциевой активности первичной диссоциированной культуры клеток головного мозга в условиях острой кислородной недостаточности.

Для установления антигипоксических путей BDNF, реализуемых на молекулярном уровне, проведена оценка влияния нейротрофического фактора на уровень синтеза антиапоптотического фактора NFkB1. Показано, что антигипоксический эффект нейротрофического фактора в условиях острой кислородной недостаточности не связан с активацией NFkB1.

Также показано, что при превентивной аппликации BDNF не происходит физиологического подавления собственного нейротрофического фактора. Установлено что синтез эндогенного BDNF увеличивается на ранних сроках развития нейрон-глиальной сети, то есть в период активных метаболических процессов.

На основании полученных в работе результатов была предложена схема (рис. 17) участия нейротрофического фактора головного мозга в реализации антигипоксического действия в клетках головного мозга.

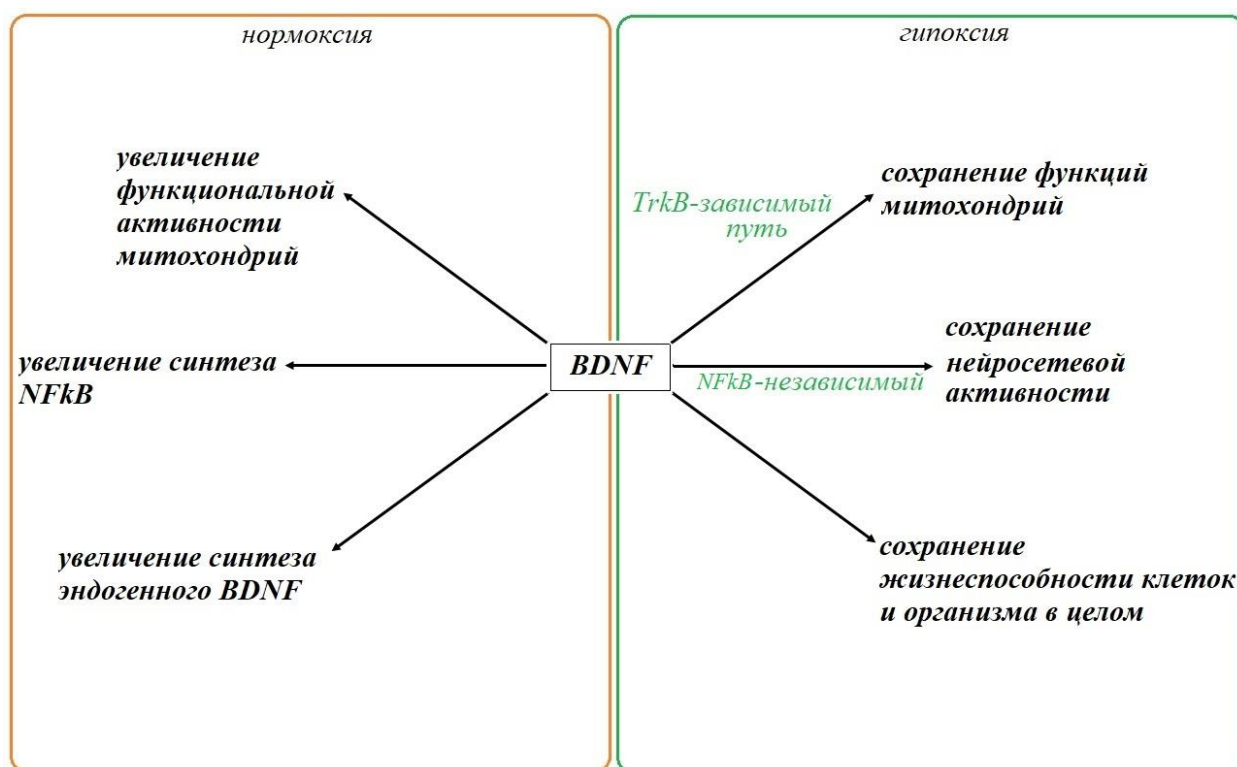


Рисунок 17. Потенциальная схема участия нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) в реализации антигипоксического действия в клетках головного мозга

Таким образом, проведенные исследования показывают потенциальную возможность использования нейротрофического фактора головного мозга в качестве антигипоксанта.

ВЫВОДЫ

1. Установлена взаимосвязь между устойчивостью животного к острой гипобарической гипоксии и концентрацией BDNF в головном мозге.
2. Действие BDNF на митохондрии опосредовано активацией TrkB-рецепторов.
3. BDNF обладает нейропротекторным действием, выражающемся в сохранении функциональной кальциевой и митохондриальной активности клеток нейрон-глиальной сети.
4. Экзогенное увеличение BDNF повышает процент клеток, в которых активируется синтез мРНК BDNF.
5. Отсутствует взаимосвязь между антигипоксическим действием BDNF и синтезом мРНК антиапоптотического фактора NFkB1.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Митрошина Е.В., Шишкина Т.В., **Астраханова Т.А.**, Мухина И.В. Антигипоксические и нейропротективные свойства нейротрофических факторов BDNF и GDNF при гипоксии *in vitro* и *in vivo* // Современные технологии в медицине. – 2014. – Т. 6 (4). – С. 38 – 47.
2. Ведунова М.В., Шишкина Т.В., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., **Астраханова Т.А.**, Пимашкин А.С., Мухина И.В. Нейропротективное и антигипоксическое действие глиального нейротрофического фактора (GDNF) при моделировании гипоксии в культурах диссоциированных клеток гиппокампа // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. – №1. – С. 33 – 39. doi: 10.1007/s10517-016-3369-3
3. Митрошина Е.В., Абогессименгане Б.Ж., Уразов М.Д., Хамрауй И., Мищенко Т.А., **Астраханова Т.А.**, Щелчкова Н.А., Лапшин Р.Д., Шишкина Т.В., Белоусова И.И., Мухина И.В., Ведунова М.В. Адаптационная роль глиального нейротрофического фактора при ишемии головного мозга // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т. 9(1) – С. 68 – 77. doi: 10.17691/stm2017.9.1.08
4. Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Шишкина Т.В., **Астраханова Т.А.**, Прохорова М.В., Ведунова М.В. Применение методики прижизненного детектирования экспрессии мРНК в сочетании с кальциевым имиджингом для исследования нейросетевой активности *in vitro* // Биологические мембраны. – 2018. – Т. 35. – №2. – С. 104 – 114. doi: 10.7868/S0233475518020020
5. **Астраханова Т.А.**, Уразов М.Д., Усенко А.В., Митрошина Е.В., Мищенко Т.А., Щелчкова Н.А., Ведунова М.В. BDNF – опосредованная регуляция функционального состояния митохондрий клеток головного мозга в условиях гипоксии // Современные технологии в медицине. – 2018. – Т. 10. – № 3. – С. 88 -94. doi: 10.17691/stm2018.10.3.10
6. Уразов М.А., **Астраханова Т.А.**, Усенко А.В., Мищенко Т.А., Щелчкова Н.А., Кравченко Г.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Влияние пренатальной гипоксии на функциональное состояние // Современные технологии в медицине. – 2019. – Т.10. – № 4. С. 60 – 68. doi:10.17691/stm2018.10.4.07
7. Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Usenko A.V., Voronova N.V., **Astrakhanova T.A.**, Shirokova O.M., Kastalskiy I.A., Vedunova M.V. Features of Neural Network Formation and Their Functions in Primary Hippocampal Cultures in the Context of Chronic TrkB Receptor System Influence // Front. Physiol. – 2019. – V.9. – № 1925. P. 1-17. doi:org/10.3389/fphys.2018.01925

Публикации в других научных журналах, сборниках научных статей, тезисах конференций:

8. Сахарнова Т.А., Мухина И.В., Митрошина Е.В., Ведунова М.В., **Астраханова Т.А.** TrkB–опосредованное антигипосическое и нейропротективное действие нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) // Материалы IV международной научно–практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань, Россия – 2014. – С.164 – 168.
9. Mishchenko T., Vedunova M., Mitroshina E., Shishkina T., **Astrakhanova T.**, Babaev A., Mukhina I. The role of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in antihypoxic and reparative mechanisms in neural networks during acute hypoxia in vitro // Proceedings of World conference on regenerative medicine. PP-205. Тезисы опубликованы в журнале: Regenerative Medicine. – 2015. – V. 10 (07S). – PP-205.
10. Vedunova M.V., Mitroshina E.V., **Astrakhanova T.A.**, Mukhina I.V. Antihypoxic properties of Glial cell line–derived neurotrophic factor (GDNF) in the acute normobaric hypoxia in vitro // Proceedings of 12th European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease Location, Spain, Bilbao. – 2015. – V. 63. – P. 264.
11. Vedunova M.V., Mitroshina E.V., **Astrakhanova T.A.**, Mukhina I.V. The Influence Of Brain–Derived Neurotrophic Factor (Bdnf) On Functional Activity Of The Culture Hippocampus During Hypoxia (In Vitro Modelling) // Opera Medica et Physiologica, N. Novgorod. Russia. – 2015. – P. 55.
12. **Астраханова Т.А.**, Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Мухина И.В. Влияние нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на функциональную метаболическую активность диссоциированных культур гиппокампа при моделировании нормобарической гипоксии in vitro // V съезд биофизиков России. Ростов-на Дону, Россия. – 2015. – Т. 2. – С. 343.
13. Ведунова М.В., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Шишкина Т.В., **Астраханова Т.А.**, Бабаев А.А., Мухина И.В. Изучение некоторых молекулярных механизмов нейропротекторного действия глиального нейротрофического фактора (GDNF) при моделировании гипоксии in vitro // Современная нейробиология: достижения, закономерности, проблемы, инновации, технологии. Уфа, Россия. – 2015. – С. 134.
14. Митрошина Е.В., Шишкина Т.А., Мищенко Т.А., **Астраханова Т.А.**, Бабаев А.А. и другие. Исследование влияния GDNF на уровень экспрессии мРНК GluR2 при моделировании нормобарической гипоксии in vitro // Материалы Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Пущино, Россия. – 2015. – С. 539 – 542.

15. Vedunova M.V., Shishkina T.V., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Pimashkin A.S., **Astrakhanova T.A.**, Mukhina, I.V. Antihypoxic and Neuroprotective Effects of Glial Cell–Derived Neurotrophic Factor (GDNF) in Cultures of Dissociated Hippocampal Cells under Conditions of Experimental Hypoxia // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2016. – V.161. – P.168 – 174.
16. Mitroshina E.V., Abogessimengane B.Zh., Urazov M.D., Khamray I., Mishchenko T.A., **Astrakhanova T.A.**, Shchelchkova N.A., Lapshin R.D., Belousova I.I., Mukhina I.V., Vedunova M.V. The Influence Of Glial Cell Line–Derived Neurotrophic Factor And Modulated Activity Of Endocannabinoid System On C3h Mice Sustainability To Ischemic Brain Injuryin Vivo // Opera Medica et Physiologica, N. Novgorod, Russia – 2016. – V. 2. – № 2 (3). – P. 83 – 84.
17. Шишкина Т.В., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., **Астраханова Т.А.**, Мухина И.В., Ведунова М.В. Изучение влияния GDNF на сохранение структурного и функционального состояния нейронных сетей в условиях острой гипоксии // 20 – я Международная Пущинская школа–конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». – 2016. – С. 297.
18. Ведунова М.В., Митрошина Е.В., **Астраханова Т.А.**, Мухина И.В. Изучение возможных механизмов нейропротекторного действия нейротрофического фактора головного мозга BDNF в норме и при гипоксии // 20 – я Международная Пущинская школа–конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА. Пущино, Россия. – 2016. – С. 304.
19. Абогессименгане Б. Ж., Хамрауй И., Лапшин Р. Д., Белоусова И. И., **Астраханова Т.А.**, Мухина И. В., Ведунова М. В. Адаптация метода моделирования ишемии головного мозга мышей для оценки неврологического статуса // Биосистемы: организация, поведение, управление»: 69–я Всероссийская школа–конференция молодых ученых. Н. Новгород, Россия. – 2016. – С. 4.
20. **Астраханова Т.А.**, Абогессименгане Б.Ж., Хамрауй И., Пчелин П.В., Щелчкова Н. А., Лапшин Р.Д., Мухина И.В., Ведунова М.В. Динамика изменений скорости потребления кислорода митохондриями головного мозга при окклюзии сонных артерий // Биосистемы: организация, поведение, управление»: 69 – я Всероссийская школа–конференция молодых ученых. Н. Новгород, Россия. – 2016. – С. 12.
21. Шишкина Т. В., Мищенко Т. А., Митрошина Е. В., **Астраханова Т.А.**, Ведунова М. В. Изучение антигипоксических и нейропротекторных свойств GDNF, а также возможных молекулярных механизмов их реализации // Биосистемы: организация, поведение, управление»: 69 – я Всероссийская школа–конференция молодых ученых. Н. Новгород, Россия. – 2016. – С. 175.
22. Ведунова М.В., **Астраханова Т.А.**, Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Мухина И.В. Роль TrkB–рецепторов в развитии и функциональной

- реорганизации нейронных сетей // Материалы 21-го двухгодичного симпозиума Международного общества по нейронауке от стволовых клеток до поведения в норме и патологии ЦНС. Антиб Франция. – 2016. – P1.087/
23. **Астраханова Т.А.**, Щелчкова Н. А., Логинов П.А., Самсонова К. И., Мухина И. В., Ведунова М. В. Изучение дыхательной функции митохондрий полушарий головного мозга при фокальной ишемии у крыс // Биосистемы, организация, поведение, управление: Тезисы докладов 70 – й Всероссийской с международным участием школы–конференции молодых ученых, Н. Новгород, Россия, – 2017. – С. 16.
24. Уразов М.Д., Митрошина Е.В., Абогессименгане Б.Ж., Хамрауй И., Мищенко Т.А., **Астраханова Т.А.**, Щелчкова Н.А., Лапшин Р.Д., Белоусова И.И., Мухина И.В., Ведунова М.В. Особенности воздействия нейротрофического фактора головного мозга на устойчивость различных линий мышей к ишемии *in vivo* // Материалы Тринадцатого международного междисциплинарного конгресса «НЕЙРОНАУКА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ПСИХОЛОГИИ». Судак, Россия. – 2017. – С. 412 – 413.
25. Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Шишкина Т.В., **Астраханова Т.А.**, Прохорова М.В., Ведунова М.В. Новые возможности прижизненного детектирования экспрессии мРНК *in vitro* // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 1 / под ред. Зинченко В.П., Бережнова А.В. Пущино, Россия: цифровая типография Fix–Print, –2017. – С. 435 – 441.
26. Уразов М.Д., Митрошина Е.В., Абогессименгане Б.Ж., Хамрауй И., Мищенко Т.А., **Астраханова Т.А.**, Щелчкова Н.А., Лапшин Р.Д., Белоусова И.И., Мухина И.В., Ведунова М.В. Особенности воздействия нейротрофического фактора головного мозга на устойчивость различных линий мышей к ишемии *in vivo* // Всероссийская с международным участием междисциплинарная научная Школа, в рамках подготовки к XXIII Съезду Российского Физиологического Общества им. И.П. Павлова посвященному 100 – летию создания этого общества Иваном Петровичем Павловым. Воронеж. Россия. – 2017. С. 105 – 107.
27. Уразов М.Д., **Астраханова Т.А.**, Усенко А.В., Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Влияние нейротрофического фактора головного мозга на устойчивость мышей линии SHK к хронической пренатальной гипоксии *in vivo* // Сборник тезисов 22 – ой Международной Пущинской школы–конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». Пущино, Россия. – 2018. – С. 372 – 373.
28. **Астраханова Т.А.**, Аферова С.И., Уразов М.Д., Усенко А.В., Мухина И.В., Ведунова М.В. Изучение скорости потребления кислорода митохондриями при моделировании хронической пренатальной гипоксии мышей линии C57Bl/6 *in vivo* // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы

докладов 71 – й Всероссийской с международным участием школы–конференции молодых ученых. – Н.Новгород. – 2018. – С. 27.

29. Уразов М.Д., **Астраханова Т.А.**, Усенко А.В., Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Роль нейротрофического фактора головного мозга в адаптации мышей линии C57BL6 к повреждающему действию гипоксии *in vivo* // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 71 – й Всероссийской с международным участием школы–конференции молодых ученых. – Н.Новгород, Россия. – 2018. – С. 230.

30. **Astrakhanova T.A.**, Aferova S.I., Urazov M.D., Usenko A.V., Mukhina I.V., Vedunova M.V. Investigation of the Oxygen Uptake by Brain Mitochondria during Chronic Prenatal Hypoxia in Mice // Volga neuroscience meeting 2018, N. Novgorod – Samara. Opera Medica et Physiologica. – 2018. – P. 16.

31. Mishchenko T., Mitroshina E., Urasov M., Usenko A., **Astrakhanova T.**, Vedunova M. Role of Brain–Derived Neurotrophic Factor (BDNF) In Compensation for Negative Consequences of Chronic Prenatal Hypoxia // Brain Injury Across the Age Spectrum: Improving Outcomes for Children, Adolescents, and Adults in this issue of the Journal of Head Trauma Rehabilitation, USA. – 2018. – V. 33. – № 3. – P. E96.

Учебно–методические работы

32. **Астраханова Т.А.**, Щелчкова Н.А., Пчелин П.В., Мухина И.В., Ведунова М.В. Биоэнергетика клетки при нормоксии и гипоксии // Учебно–методическое пособие. Нижний Новгород: ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2016. 38 с.