Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

На правах рукописи

АСТРАХАНОВА ТАТЬЯНА АЛЕКСАНДРОВНА

МЕХАНИЗМЫ BDNF-ОПОСРЕДОВАННОЙ АДАПТАЦИИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ К ДЕЙСТВИЮ ГИПОКСИИ

03.03.01 - физиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук Мария Валерьевна Ведунова

Нижний Новгород

Оглавление

Список сокращений 4
Введение
Глава 1. Обзор литературы 13
1.1. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) 13
1.2. Особенности влияния нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на энергетические процессы в клетке
1.3. Особенности патохимического действия гипоксии на 27
функциональное состояние митохондрий
1.3.1. Виды гипоксии
1.3.2. Особенности патохимического действия гипоксии на функциональное состояние митохондрий
1.4. Особенности энергетического метаболизма в развивающемся мозге 35
2. Материалы и методы исследования
2.1. Объект исследования
2.2. Схема экспериментов
2.3. Методы исследования <i>in vivo</i>
2.3.1. Моделирование острой гипобарической гипоксии 50
2.3.2. Получение изолированных митохондрий мозга
2.3.3. Метод регистрации потребления кислорода
2.3.4. Определение белка по методу Брэдфорда 54
2.4. Методы исследования <i>in vitro</i>
2.4.1. Метод культивирования первичных культур клеток головного мозга. 55
2.4.2. Оценка выживаемости клеток после моделирования нормобарической гипоксии in vitro
2.4.3. Моделирование нормобарической гипоксии in vitro
2.4.4. Метод визуализации и регистрации спонтанной кальциевой активности культур клеток гиппокампа
2.4.5. Метод прижизненной детекции мРНК при помощи РНК-детекторных зондов
Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Влияние ОГБГ на функциональное состояние митохондрий головного
мозга в постнатальном периоде61
3.2. Влияние нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на функциональное состоящие митохондрий головного мозга (67
функциональное состояние митохондрии толовного мозга
3.3. Влияние нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на функциональное состояние митохондрий первичных диссоциированных
культур70
3.4. Влияние вирусной трансдукции BDNF на функциональное состояние митохондрий головного мозга72
3.5. Влияние BDNF на жизнеспособность клеток первичной культуры гиппокампа при моделировании нормобарической гипоксии in vitro
3.6. Влияние нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на функциональную кальциевую активность диссоцированных культур гиппокампа in vitro
Заключение
Выводы
Список литературы91

Список сокращений

Akt (protein kinase В -РКВ) - протеинкиназа В

AMPK (AMP activated proteinkinase) – 5'AM Φ -активируемая протеинкиназа

APP (Amyloid precursorprotein) – белок-предшественник β-амилоида

ART (Artemin) – артемин

Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) – внутриклеточный белковый фактор, регулятор апоптоза, «ген выживаемости» проапоптотический ген

Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large) - «ген выживаемости»

BDNF (Brain - derived neurotrophic factor) – нейротрофический фактор головного мозга

BHLHB (member of the basic helix - loop - helix) – фактор транскрипции суперсемейства димеризующихся факторов

CaMK2 (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2) - кальций

/кальмодулин-зависимая протеин-киназа 2

CaRE 1/2/3(calcium-responsive elements) – кальций - чувствительные последовательности ДНК 1/2/3

Cdk 5 (Cyclin-dependent kinase 5) – циклинзависимая киназа-5

сGMP (Cyclic guanosine monophosphate) – циклический гуанозинмонофосфат

CNTF (Ciliary neurotrophic factor) – цилиарный фактор

CRE (cAMP response elements) – последовательностьДНК, с которой связывается CREB

СREВ (cAMP response elements-binding protein) – цАМФ-зависимый транскрипционный фактор

с-fos – ген раннего ответа

с-jun – ген раннего ответа

CaRF (Calcium-responsive transcription factor) – кальций - чувствительный фактор транскрипции

DAG (Diacylglycerol) – диацилглицерол

DJ-1 – белок сенсор оксидативного стресса

Drp1 (Dynamin-1-like protein) – диамин-подобный белок 1

GSH (Glutathione) – глутатион

GPR 91, 99 (G Protein-coupled Receptor 99) – рецептор, связанный с G белком

HIF-1 (Hypoxia-inducible factor) – фактор, индуцируемый гипоксией

HIF-1α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) – фактор, индуцируемый гипоксией 1α

Htt (Huntingtin) – белок хантингтин

IkB (inhibitor of kB) – ингибиторный белок;

IL - 6 (Interleukin - 6) – интерлейкин – 6;

IL-1β – провоспалительный интерлейкин;

Jun-киназы (с-Jun N-terminal kinase) – стресс-активируемые протеинкиназы;

LIF (Leukemia inhibitory factor) – ингибирующий фактор лейкемии

MAPK (Mitogen-activated protein kinase) – митоген-активированная протеинкиназа

mTORC (mammalian target of rapamycin complex) – белок-активатор факторов клеточного роста и пролиферации

MUC (Mucin 1, cell surface asso-ciated) – муцин, кодируемый геном MUC 1

NFkB (Nuclear factor kappa - light - chain - enhancer of activated B cells) – транскрипционный ядерный фактор каппа-В легкой цепи

NGF (Nerve growth factor) - фактор роста нервов

NLRP3 (Cryopyrin) – цитозольный белок (или криопирин), Nod-подобный рецептор семейства NALP

NMDAR (N - methyl – D - aspartate receptor) – N-метил-D-аспартат-рецептор

NO – оксид азота

Nrf 2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) – эритроидный ядерный фактор, кодируемый геном NFE2L2

NT-3 (Neurotrophin - 3) - нейротрофин-3

NT4/5 (Neurotrophin - 4/5) - нейротрофин-4/5

NTR (Neurturin) – неуртурин

р75 или LNGFR (Low-affinity nerve growth factor receptor) – низкоафинный рецептор факторов роста нервов

PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase) – фосфоинозитол-3-киназа

PINK1 (PTEN-induced kinase 1) – РТЕN-индуцированная киназа 1

РКС (Protein kinase C) – протеинкиназа С

РКG (Protein Kinase G) – цГМФ-зависимая протеинкиназа

PLCү (Phospholipase Сү) – фосфолипаза Сү

pre-proBDNF – пронейротрофин - белок-предшественник зрелой молекулы BDNF

PSP (Persephin) – персефин

PS1 – белок пресенилин-1

PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) – фосфатаза с двойной субстратной специфичностью

RCI (Respiratory control index) – респираторный контрольный индекс

Sestrin 2 (SESN2) – стресс-индуцируемый метаболический белок

Тrк (Tropomyosin - related kinase) - тирозинкиназный рецептор

TrkB (Tropomyosin-related kinase B) - тирозинкиназный рецептор В

TrkB full-length (TrkB-FL) – полноцепочечная последовательность тирозинкиназного рецептора

TrkB-T1, T2 (TrkB truncated-1,2) – укороченные формы тирозинкиназного рецептора

USF (Upstream stimulatory factor) 1/2 –стимулирующий фактор 1/2

XIAP X (X – linked inhibitor of apoptosis protein) – сцепленный ингибитор белка апоптоза

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВУ – высокоустойчивая особь

НУ – низкоустойчивая особь

ОГБГ – острая гипобарическая гипоксия

ПЭИ – полиэтиленимин

СУ – среднеустойчивая особь

Тж - время жизни на «высоте»

ЦНС – центральная нервная система

3-NP – 3- нитропропионовая кислота

Введение

Исследование нервной адаптации системы К повреждающему действию гипоксии является актуальной проблемой современной биологии и медицины. Гипоксия, обусловленная кислородной недостаточностью, служит причиной множественных патологических процессов И критических состояний организма. В частности, на снижение кислорода остро реагируют клетки головного мозга, поскольку характеризуются высокой энергетической потребностью. При нехватке кислорода снижается частота циклов окислительного фосфорилирования – основного механизма синтеза АТФ и, происходит дисрегуляция синаптической как следствие передачи, разрушение нейронных сетей, гибель клетки.

Актуальным вопрос поиска веществ, способных является контролировать метаболизм клеток головного мозга в условиях стресса, в том числе и при гипоксии. Научный интерес сегодня отводится молекулам эндогенного происхождения, и в частности нейротрофическому фактору головного мозга BDNF (англ. Brain-derived Neurotrophic Factor). В частности, было установлено, что BDNF оказывает влияние на показатель дыхательного контроля митохондрий головного мозга посредством увеличения скорости окислительного фосфорилирования. Этот эффект опосредуется работой магистрального пути TrkB-сигнализации (сигнальный каскад, работающий при связывании BDNF с TrkB через митоген-активированную протеинкиназу MAP) (Sheng et al., 2018; Xu et al., 2018).

Особый интерес представляет изучение механизмов защитного действия нейротрофического фактора на уровне нейронных сетей. Патологическое действие гипоксии развивается поэтапно и характеризуется клеточно-молекулярными нарушениями. Для этой цели наиболее адекватной и легко воспроизводимой моделью служат первичные культуры клеток головного мозга, позволяющие исследовать функциональные характеристики в хроническом эксперименте. Одним из ключевых функциональных событий являются ионные токи и, в частности, кальциевая сигнализация. Кальций выступает в роли сигнальной молекулы при взаимодействии BDNF с TrkB, что обеспечивает активацию киназ (например, кальций-кальмодулин зависимая протеинкиназа, протеинкиназа С), которые в свою очередь активируют транскрипционные факторы, в том числе ядерный фактор кВ (NFкB), регулирующего экспрессию генов выживаемости (Гуляева, 2017).

Таким образом, исследование механизмов антигипоксического действия BDNF даст возможность разработки новых лекарственных средств, способных к коррекции гипоксических повреждений.

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 нейронглиальной 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 NFkB1.

Научная новизна.

Впервые осуществлено комплексное изучение действия BDNF на митохондрии в условиях гипоксии. 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.

BDNF может являться корректором энергетического метаболизма клеток головного мозга как в условиях нормоксии, так и 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» (Пущино, 2015, 2017); 20 – й международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (Пущино, 2016, 2018); 21-м двухгодичном симпозиуме международного общества по нейронауке от стволовых клеток до поведения в норме и ЦНС патологии (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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF)

Нейротрофины являются полипептидными факторами и служат молекулами. Синтезируются сигнальными В виде предшественников (пронейротрофинов) в эндоплазматическом нейронов ретикулуме И глиальных клеток (прежде всего в неокортексе и гиппокампе), далее клеточному процессингу. подвергаются сложному Данные факторы регулируют развитие нервной системы и многочисленные нейронные пролиферацию, процессы, среди которых выделяют клеточную дифференциацию выживаемость нейронов, аксонов, рост дендритов, синаптическую передачу, также влияют на высшую нервную деятельность (обучение, память). Реализация функций нейротрофинов обеспечивается различными типами трансмембранных рецепторов. Зрелые молекулы взаимодействуют с высокоаффинным тирозинкиназным рецептором (Trk), обеспечивает фосфорилирование регуляторных белков что И запуск транскрипции генов, контролирующих кальциевый гомеостаз, синаптические функции и выживание нейронов. Пронейротрофины в большей степени связываются с низкоаффинным рецептором р75 (в меньшей степени зрелые Нейроны поддерживает строгий баланс молекулы). зрелых молекул пронейротрофинов. Нарушение нейротрофинов И баланса ведет к перераспределению сигналов между рецепторами Trk и p75, что может например, К инициации апоптоза. Также показано, приводить, что дисрегуляция сигналов на уровне нейротрофинов является патогенным нейродегенеративных заболеваний (болезнь механизмом при ряде Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона). Нейротрофическая сигнализация имеет решающее значение в регулировании работы мозга как в пренатальный, так и постнатальный периоды развития организма (Белецкий

и др., 2002; Шишкина с соавт., 2015; Клюшников и др., 2017; Ершова и др., 2018; Gonzalez et al., 2016; Ginsberg et al., 2018; Du et al., 2018, Tiernanet al., 2018, Levy et al., 2018; Giannopoulou et al., 2018; Tecuatl et al., 2018; Moya-Alvarado et al., 2018).

Нейротрофины разделяют на три подсемейства. Первое подсемейство включает фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF), нейротрофический головного (brain-derived фактор мозга neurotrophic factor. BDNF). нейротрофин - 3 (NT - 3), нейротрофин - 4/5 (NT - 4/5). В состав второго подсемейства входит глиальный фактор (glial cell derived neurotrophic factor, GDNF), неуртурин (NTR), артемин (ART), персефин (PSP). К третьему подсемейству относят цилиарный фактор (ciliary neurotrophic factor, CNTF), ингибирующий фактор лейкемии (1eukemia inhibitory factor, LIF) и интерлейкин - 6 (interleukin - 6, IL - 6). Особое внимание следует уделить нейротрофическому фактору BDNF. В отличие от других факторов BDNF наиболее широко представлен в мозге (Гомазков, 2011; Попова, 2017; Sasi et al., 2017).

Ген BDNF состоит из восьми 5' - некодирующих экзонов с соответствующими промоторами, и одного 3' - кодирующего экзона (рис. 1). Использование разных промоторов в транскрипции BDNF позволяет получать адекватные ответы на внутриклеточные процессы и различные внеклеточные сигналы. Отмечена тканеспецифичность транскриптов данного фактора. Например, транскрипты BDNF, содержащие экзоны II, III, IV, V и VII, в основном, специфичны для мозга, тогда как другие, кроме мозга, обнаруживаются в ненейрональных тканях. Мембранная деполяризация участвует в регуляции транскрипции BDNF в нейронах, а также активация глутаматных рецепторов, в результате чего увеличивается содержание Кальций-зависимая внутриклеточного кальция. транскрипция осуществляется преимущественно в IV экзоне. Промотор IV экзона содержит последовательности CaRE 1/2/3 (calcium-responsive elements), связывающие специфические факторы транскрипции (CaRF, USF 1/2.CREB), активирующие экспрессию гена BDNF. Все транскрипты имеют общую часть IX Он содержит последовательность ЭКЗОН. полную молекулы предшественника proBDNF лва сайта И В его составе имеются полиаденилирования, в результате чего синтезируются мРНК с короткой и длинной 3' - нетранслируемой областью.



Рисунок 1. Схематическая иллюстрация транскрипции гена нейротрофического фактора головного мозга: I – IX – кзоны, CaRE 1/2/3 – кальций – чувствительные последовательности ДНК (calcium-responsive elements), CRE –последовательность ДНК, с которой связывается CREB (cAMP response elements), CREB –цАМФ-зависимый транскрипционный response elements-binding protein), CaRF фактор (cAMP -кальцийчувствительный фактор транскрипции (calcium-responsive transcription factor), USF 1/2 –стимулирующий фактор 1/2 (upstream stimulatory factor), BHLHB – фактор транскрипции суперсемейства димеризующихся факторов (member of the basic helix -loop - helix), NFkB-транскрипционный ядерный фактор каппа-B (nuclear factor kappa - light - chain - enhancer of activated B cells) (Adachi et al., 2014)

Эта особенность имеет функциональное значение, так как мРНК с длинной областью характерна для шипиков дендритов и синтезируется при активации нейронов, а мРНК с короткой областью локализуется в телах нейронов и

связана с поддержанием базального уровня белка BDNF. Показано, что на уровень экспрессии влияют различные стресс-факторы. Например при повреждении ткани в результате нарушения кислородного обеспечения экспрессия гена BDNF изменяется не только в очаге поражения, но и в контрлатеральных областях (Дмитриева и др., 2016; Попова, 2017; Adachi et al., 2014; Benarroch, 2015; Vilar, Mira, 2016; Singer et al., 2018).

Нейротрофический фактор секретируется при помощи регулируемого пути. Белок – предшественник BDNF массой 32 кДа (pre-pro-BDNF) транслируется в эндоплазматическом ретикулуме, а затем протеолитически расщепляется для получения формы proBDNF в аппарате Гольджи и сортируется в мембранные везикулы. Далее нейротрофический фактор может функционировать в виде proBDNF или зрелой молекулой BDNF. Зрелая молекула образуется при расщеплении proBDNF (Попова, 2017; Foltran, Diaz, 2016; Kowianski et al. 2018).

Молекула нейротрофического фактора головного мозга связывается с двумя различными по структуре типами рецепторов: TrkB и p75 (рис. 2).



Рисунок 2. BDNF и его рецепторы (Bath, 2011)

Варианты экспрессии TrkB – рецепторов: а) полноразмерная форма рецептора TrkB - FL (TrkB full-length), имеющая внутриклеточный тирозинкиназный домен; б) укороченная форма рецептора двух типов: TrkB -T1, TrkB - T2 (TrkB truncated - 1, TrkB truncated - 2), характеризующиеся отсутствием тирозинкиназной активности. Рецептор р75 состоит из трех основных частей. Это богатый цистеиновыми остатками внеклеточный домен четырьмя лиганд-связывающими сайтами, трансмембранный домен, С регулирующий внутримембранный протеолиз и внутриклеточный домен смерти. Связывание с рецептором p75 приводит к активации Jun-киназ которые инициируют транскрипцию генов раннего ответа c-fos и c-jun, запускающих апоптоз. Показано, что тирозинкиназная активность TrkB-FL может оказывать ингбирующий эффект в отношении рецептора р75. Таким образом, при активации TrkB-рецептора активность рецептора p75 и инициация апоптоза в клетке подавлена (Сахарнова и др. 2012; Острова и др., 2018; Фоминова и др., 2018; Diarra et al., 2009; Bath, 2011; Ishii et al., 2018).

Уровень нейротрофического фактора головного мозга и экспрессия его рецепторов в процессе развития динамичны (рис. 3). Так в пренатальном развитии уровень BDNF достаточно низок (во время пренатального развития преобладает форма proBDNF), затем в течение первых недель жизни наблюдается его увеличение, достигая пика к 30 дню, далее на протяжении всей жизни его уровень остается неизменным. Также из рисунка 3 видно, что высокий уровень экспрессии p75 отмечается в пренатальном развитии, затем подавляется в большинстве областей головного мозга. Полноразмерная форма рецептора TrkB - FL стабильна на протяжении всего развития, в отличие от укороченных форм рецептора (TrkB - T) (Phillips 2017).



Рисунок 3. Динамика нейротрофического фактора головного мозга и его рецепторов

При связывании молекулы BDNF с рецепторами запускается ряд сигнальных каскадов (рис. 4). При связывании с рецептором TrkB-FLзапускается несколько сигнальных каскадов. PLC_γ- сигнальный путь активации фосфолипазы Су и образованию вторичных приводит к переносчиков –диацилглицерола (DAG) и инозитолтрифосфата (IP3). IP3 обеспечивает высвобождение кальция, активирующего кальций кальмодулин зависимую протеинкиназу - 2, которая в свою очередь фосфорилирует цАМФ - зависимый транскрипционный фактор (CREB), влияющий на физиологическую активность нервных клеток, в том числе на модуляцию синаптической пластичности, индукцию ранней фазы МАРК долговременной потенциации. Сигнальный ПУТЬ киназы обеспечивает индукцию поздней фазы долговременной потенциации. Этот активационный путь участвует в росте отростков и дифференциации нейронов. PI3 - киназный путь запускает Akt-киназу, которая в ядре клетки фосфорилирует транскрипционные факторы, ответственные за выживание, а совместно с PLC_γ - сигнальным механизмом снижает ветвление дендритов и модифицирует актиновую и микротубулиновую динамику. Также показано, что связывание молекулы нейротрофического фактора с укороченными формами рецептора (TrkB - T1, TrkB - T2) влияет на выделение кислых метаболитов, передачу сигналов, рост и развитие нервной клетки. Установлено повышение экспрессии укороченных форм рецептора в астроцитах при травме мозга, что обеспечивает накопление BDNF в астроцитах. Отмечено, что быстрая активация PLC и IP3 - зависимого высвобождения кальция обеспечивается сигналами через укороченные формы рецептора (Сахарнова, 2012; Zaletel et al., 2017; Zhao et al., 2017).



Рисунок 4. Сигнальные пути молекулы нейротрофического фактора аффинный тирозинкиназный рецептор головного мозга: TrkB-высоко (Tropomyosin receptor kinase B), р75 –низкоафинный рецептор (low-affinity nerve growth factor receptor, РІЗК-фосфоинозитол-3-киназа, Akt протеинкиназа В, МАРК –митоген-активирующаяся протеинкиназа, ERK 1/2 - внеклеточная сигнально-регулируемая киназа, PLCу-фосфолипаза Су, IP3 инозитолтрифосфат, DAG-диацилглицерол, CaMKкальцийкальмодулинзависимая протеинканаза, Jun-киназы – стресс-активируемые протеинкиназы, NF-kB- транскрипционный ядерный фактор каппа-В, IkBцитозольный ингибиторный белок

Молекула нейротрофического фактора способна инициировать активацию транскрипционного ядерного фактора каппа-В (NFkB). Этот путь является атипичным, так как фосфорилирование ингибиторного белка IкВ осуществляется в области 42 аминокислотного остатка – тирозина (рис. 5).



Рисунок 5. Взаимодействие BDNF/NFkB

Существуют двойственные данные о функционировании NFkB, поскольку он может участвовать и в механизмах повреждения, и в механизмах защиты нервных клеток, посредством регуляции генов клеточного цикла. Так форма

proBDNF (рис. 5) предпочтительно связывается с рецептором p75, запуская внутриклеточные механизмы, которые, приводят к активации NFkB путем фосфорилирования ингибиторного белка IkB, его убиквитинирования и формируются расшепления. В результате активные димеры NFkB. инициирующие апоптоз. Связывание же BDNF с рецептором TrkB активирует NFkB, который в этом случае регулирует нейрогенез и выживание клеток. При этом показана положительная обратная связь. Так NFkB может связываться с I, III и IV промотором гена BDNF инициируя тем самым синтез нейротрофического фактора (Caviedes et al., 2017).

NFkB – зависимая регуляция нейротрофического фактора может осуществляться с помощью Х – сцепленного ингибитора белка апоптоза (Х – linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP). XIAP относится к семейству белков – ингибиторов апоптоза, подавляющих ключевые каспазы, которые участвуют в регуляции гибели клеток. Показано, что мыши с повышенной экспрессией XIAP в нейронах головного мозга более устойчивы к кровоснабжению С недостаточному мозга. одной стороны нейропротекторный эффект XIAP обусловлен подавлением каспазы – 3 (один из ферментов, индуцирующих апоптоз), с другой стороны, активацией ядерного фактора каппа-В, опосредующего инициацию синтеза BDNF. В результате анализ экспрессии генов показал, что мРНК BDNF активируется в тканях мозга при избыточной экспрессии XIAP и, в частности, отмечено увеличение мРНК Іи ІУэкзонов гена BDNF. Также показано увеличение количества TrkB – рецепторов. Блокирование NFkB снижает экспрессию мРНК I и IV экзонов. В тоже время зафиксировано, что повышенные концентрации нейротрофического фактора головного мозга активируют NFkB. Таким образом, BDNF–сигнализация обеспечивает активацию NFkB и сам NFkB регулирует синтез нейротрофического фактора BDNF. Такая взаимная регуляция является одной из фундаментальных связей при функционировании клеток головного мозга (Caviedes et al., 2017).

1.2. Особенности влияния нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на энергетические процессы в клетке

Особое внимание отводится изучению влияния нейротрофического фактора (BDNF) на энергетические процессы клетки. Относительно недавно **BDNF** участвует показано, что антиоксидантном В механизме. Окислительный стресс характеризуется ОДНИМ ИЗ этапов нарушения физиологической функции нервной ткани, который включает образование активных форм кислорода (АФК) и окислительное повреждение клетки на молекулярном уровне. Отмечается что при окислительном стрессе дендриты наиболее чувствительны относительно тела нейрона. Специфическая роль отводится повреждению митохондрий, в результате которого усиливается генерация ими АФК (Hacioglu et al., 2016; Grimm et al., 2018).

Показано, что нейротрофический фактор головного мозга в условиях окислительного стресса способен увеличивать синтез стресс-индуцируемого метаболического белка Sestrin 2 (SESN2), который подавляет активные формы кислорода и обеспечивает защиту на молекулярно-клеточном уровне при гипоксии. Sestrin 2 реализует нейропротективный эффект путем активации протеинкиназы AMФК (AMP activated proteinkinase, AMPK), контролирующей энергетический баланс клетки и в условиях его дефицита служащей главным модулятором белка mTORC (mammalian target of гаратусіп complex), являющегося активатором факторов клеточного роста и пролиферации. В условиях энергетического дефицита сигнализация mTORC подавляется (Pasha et al., 2017; Chenetal., 2017; Liu et al., 2018).

Активация Sestrin2 также инициирует путь, который включает оксид азота (NO), циклическую гуанозинмонофосфат (cGMP, cyclic guanosine monophosphate) – зависимую протеинкиназу (PKG, Protein Kinase G) и ядерный фактор-кВ (NFкВ). Кроме того, BDNF запускает множество механизмов для обеспечения устойчивости нейронов к 3- нитропропионовой кислоте (3-NP), индуцирующей митохондриальную дисфункцию путем необратимого ингибирования дегидрогеназы янтарной кислоты (комплекс II). Защита от 3-NP обуславливается активацией каспазы-3 и конденсацией хроматина за счет уменьшения как общего, так и митохондриального уровней Bim (белок семейства Bcl-2, которые регулируют проницаемость наружной мембраны митохондрий) (Nishimuraetal., 2008, Chenetal., 2017).

Нейротрофический фактор головного мозга участвует В митохондриальном метаболизме ряде нейродегенеративных при заболеваний. Наиболее распространенные нейродегенеративных заболевания: болезнь Паркинсона, Хантингдона Альцгеймера, И депрессивные расстройства имеют различные патологические этологии, митохондриальной компоненты которых связаны с дисфункцией. В результате митохондриальной дисфункции, возникающей при нарушении продукции АТФ, увеличивается концентрация внутриклеточного кальция, продукция активных форм кислорода, изменяются функции нейронов с точки зрения синаптической пластичности, энергетического метаболизма, переноса высвобождения нейротрансмиттеров. В ионов И дополнение К вышеуказанным эффектам относятся данные о дисфункции органелл, вызванной изменениями в генетическом материале, например, генами, кодирующими ключевые митохондриальные белки, которые также приводят к инициированию и развитию нейродегенеративных заболеваний (Cali et al., 2012; Duclot, Kabbaj, 2015; Legge et al. 2015; Polyakova et al. 2015; Liu et al. 2016).

Болезнь Паркинсона характеризуется прогрессирующей дегенерацией дофаминергических и норадренергических нейронов, которые контролируют моторную и вегетативную нервную функцию соответственно. Исследования, проведенные еще в начале 1990-х годов, доказали, что митохондриальная дисфункция имеет решающее значение для возникновения и развития заболевания из-за изменений в синтезе АТФ, селективного ингибирования комплекса I токсинами или наследственных мутаций генов, кодирующих

белки, участвующие в работе органеллы. Мутации в митохондриальных renax Parkin, DJ-1 и Pink 1 приводят к изменениям структуры митохондрий посредством измененного синтеза, снижения активности I комплекса и пластичности посредством подавления высвобождения синаптической нейротрансмиттеров. Поэтому предполагается, что развитие болезни Паркинсона зависит, частности, изменений В OT цитозольного уровня кальция, что, в свою очередь, может инициировать митохондриальную дисфункцию. Многофункциональный белок DJ-1. участвующий в антиоксидантной активности, также играет важную роль в контроле базального цитозольного уровня кальция, взаимосвязи между L-типа митохондриальным кальциевым током и каналами дофаминергических нейронов (Saha etal., 2009; Nuytemans et al., 2010).

Эксперименты с использованием нокаутных моделей подтвердили роль DJ-1 в защите дофаминергических нейронов от митохондриальной кальциевой дисфункции и продукции активных форм кислорода при стрессе. Исследования связанные с митохондриальной окислительном киназой PINK1 (PTEN-induced kinase 1), также свидетельствовали о связи между гомеостазом кальция, дисфункцией митохондрий И болезнью Паркинсона. Потеря мембранного потенциала, увеличение размера митохондрий, реорганизация крист и снижение уровня АТФ наблюдались в исследовании, включающем ингибирование MUC (Mucin 1, cell surface associated; муцин, кодируемый геном MUC1), регулирующего поглощение митохондриального кальция (Guzman et al., 2010; Marongiu et al., 2009).

Из литературных данных следует, что в черной субстанции при болезни Паркинсона наблюдается более низкий уровень BDNF. Поскольку BDNF является нейротрофическим фактором, обеспечивающим трофическую поддержку дофаминергических нейронов черной субстанции, это дает возможность предположить, что вышеупомянутые нарушения возникают в результате неадекватной трофической поддержки, которая сама

по себе может быть результатом нарушенной BDNF–сигнализации (Ершова и др., 2018;Hernandez-Chanetal., 2015; Kang et al., 2017; Geisler et al., 2017).

При болезни Альцгеймера, характеризуемой наличием внеклеточных амилоидных бляшек, было обнаружено, что олигомеры **В**-амилоида индуцируют массивную передачу кальция между эндоплазматическим ретикулумом и митохондриями, в результате которой формируются условия ДЛЯ генерации активных форм кислорода, молекул, отвечающих 3a митохондриальную проницаемость И выделения цитохрома С. Обнаруженные ранние значительные изменения в окислительном метаболизме показали, что уровни митохондриального β-амилоида связаны с распространенностью митохондриальной дисфункции в разных областях мозга и степенью когнитивных нарушений у 12-месячных мышей на модели болезни Альцгеймера с повышенной экспрессией белка-предшественника βамилоида (Amyloid precursorprotein, APP), причем гиппокампальные и кортикальные нейроны являются наиболее чувствительными и показыют нарушение баланса деления и синтеза митохондрий. Показано, что нарушение метаболизма глюкозы, возможно, из-за изменения передачи сигналов инсулина и изменения метаболизма тиамина, что привело к нарушениям в цикле Кребса. BDNF может увеличивать эффективность дыхания митохондрий головного мозга, в то время как воспалительные цитокины блокируют это увеличение. Это может объяснять некоторые изменения в метаболизме, поскольку во время болезни Альцгеймера BDNF снижается, а воспалительные цитокины увеличиваются. **В-амилоид** активирует воспаление и цитозольный белок NLRP3, который вовлечен в необходимых активацию каспаз. для синтеза провоспалительного интерлейкина IL-1β. Этот каскад является основным фактором, способствующим развитию патологии у мышей с повышенной экспрессией белка-предшественника β-амилоида APP / PS1. Возможно, что по мере прогрессирования заболевания и снижения уровня BDNF, отсутствие трофической поддержки В сочетании повышенным воспалением С

способствует прогрессированию метаболической недостаточности и атрофии нейронов. Таким образом, возможность ЭТО дает предполагать, ЧТО энергетического метаболизма нарушение мозга является основной особенностью болезни Альцгеймера (Bateman et al., 2012; Markham et al., 2012; Heneka et al., 2013; Bisht et al., 2018).

Митохондриальная дисфункция также лежит в основе нарушений синаптической пластичности, двигательного и когнитивного дефицита, болезнью Хангтинтона Известно, болезнь связанных С вызывается мутационным **(**B результате рекомбинации) увеличением числа полиглутаминовых повторов в белке хантингтин (Htt). Поэтому мутантные белки хантингтина могут способствовать развитию нейродегенеративных изменений в центральной нервной системе. Ранней мишенью для этих белков, по-видимому, служат митохондрии, вызывая нарушение синтеза АТФ и кальциевый дисбаланс. В других исследованиях, включающих мутацию белка хантингтина, было показано увеличение активности кальциневрина и связанного с ним белка Drp1, необходимого для деления Исследования по токсичности глутамата показали, что митохондрий. некоторые глюкокортикоиды могут защищать клетки от кальциевой перегрузки путем активации кальциевой АТФазы. Вновь эти данные указывают на взаимосвязь между кальциевым гомеостазом, дисфункцией митохондрий и трофической поддержкой, однако роль BDNF в этом вопросе менее ясна и может иметь косвенный характер. На примере культуры нейронов показано, что транспорт молекул BDNF и митохондрий в аксонах имеют противоположные скорости (Oliveira, 2010; Costa et al., 2010; Suwanjang et al., 2013; Moutaux et al., 2018)

При исследовании влияния BDNF на кислородный метаболизм в митохондриях мозга мышей проводились эксперименты по инкубированию нейротрофического фактора с синаптосомами. Действие BDNF характеризовалось в концентрационно-зависимом увеличении

респираторного контрольного индекса (англ. – Respiratory control index, RCI), который является индикатором эффективности дыхательной цепи, в том числе синтеза АТФ и отсутствия повреждения органелл. Однако на выделенных митохондриях BDNF не проявлял данный эффект и усиливал окисление только при наличии субстратов I комплекса. При использовании ингибиторов BDNF, было показано, что митохондриальный эффект BDNF опосредован MAPK сигнальным путем. Эффект положительного влияния BDNF на процессы метаболизма в мозге посредством MAPK сигнального механизма. Активация проапоптотического гена Bcl-2 по типу MAPK сигнального механизма свидетельствует об особенной роли BDNF в нейропротективной защите (Wiedemann et al., 2006; Markham et al., 2012; Chen et al., 2013).

1.3. Особенности патохимического действия гипоксии на функциональное состояние митохондрий

1.3.1. Виды гипоксии

Существует множество определений гипоксии, но наиболее удачное определение дал А.И. Чарный (1961): «Патологическое состояние, наступающее в организме при неадекватном снабжении тканей и органов кислородом или при нарушении утилизации в них кислорода» (Чарный, 1961; Литвицкий, 2016; Lucchi et al., 2015; Kim et al., 2015).

Степень насыщения ткани кислородом и запускаемый каскад патобиохимических реакций определяют этиологию и патогенез гипоксии. Существует множество классификаций гипоксических состояний (рис. 6). В зависимости от генеза выделяют 2 типа гипоксии: экзогенную и эндогенную. При воздействии факторов внешней среды формируется экзогенный тип гипоксии. К ее разновидностям относятся гипоксическая гипоксия, гипероксическая гипоксия и экологическая гипоксия. Наиболее распространенной является гипоксическая гипоксия. Этот тип гипоксии характеризуется снижением содержания кислорода в крови вследствие чего, гемоглобин насыщается кислородом не полностью. Один из вариантов данного типа – гипобарическая гипоксия.

Гипобарическая гипоксия характеризуется сниженным парциальным напряжением кислорода в артериальной крови, а также напряжением углекислого газа вследствие гипервентиляции возникающей легких, рефлекторно в ответ на раздражение хеморецепторовв аорте и каротидных синусах недостатком кислорода. В дыхательном центре увеличивается чувствительность к углекислому газу. Усиленное выведение углекислого газа инициирует дыхательный алкалоз и нарастание гипокапнии, ведущей к сужению сосудов мозга и сердца. Поэтому в настоящее время имеется большое работ, посвященных изучению число различных аспектов кислородного голодания мозга. При кислородном голодании, особенно для головного мозга установлена различная степень ранимости нейронов разных отделов головного мозга. При гипоксии клетки в организме млекопитающих нарушается энергетическое обеспечение систем, транспортирующих ионы, что ведет к истощению субстратов ферментов, разрушению клеточных мембран и, как следствие, гибели клеток (Coimbra-Costa et al. 2018; Nalivaeva et al. 2018).



Рисунок 6. Классификация гипоксических состояний

1.3.2. Особенности патохимического действия гипоксии на функциональное состояние митохондрий

Течение и исход многих заболеваний характеризуется особенностями метаболических нарушений, степенью дестабилизации клеточных мембран, а также нарушением энергетического баланса. Согласно литературным данным, при недостаточном поступлении кислорода к клетке и к митохондриям происходит поэтапное нарушение активности ферментов дыхательной цепи, которое начинается на субстратном участке дыхательной цепи, которое начинается на субстратном участке дыхательной повреждения (Лукьянова Л.Д., 1982-1997).

Снижение концентрации кислорода в клетке нарушает аэробный синтез, и, как следствие, снижается содержание АТФ, мембранный потенциал. Это обуславливает подавление ряда энергозатратных процессов, обеспечивающих транспорт ионов, рецепторную функции клетки, мышечные сокращения, дыхания и так далее. Пример нарушения - деполяризация мембраны, безконтрольный вход ионов Ca²⁺ посредством потенциалзависимых кальциевых каналов, активация кальций-зависимых протеаз, неконтролируемое разбухание клеток, гидролиз большинства клеточных компонентов (Lukyanova, Kirova, 2015).

При гипоксии в нервных клетках, как правило, наблюдается набухание митохондрий с разрушением крист и внутренних мембран. У некоторых митохондрий внутренняя мембрана не выявляется, и органелла превращается в вакуоль. Нередко в митохондриях наблюдаются лишь фрагментация и распад крист, при этом степень повреждения митохондрий варьирует не только в различных клетках, но и в пределах одной клетки. Распад крист и набухание митохондрий при гипоксии нередко сочетаются с повышением осмиофилии цитоплазмы, перераспределением полисом и другими изменениями (Боголепов, 1979).

Кислород, являющийся субстратом терминального фермента дыхательной цепи – цитохромоксидазы, принимает участие в реакциях аэробного синтеза. Следовательно, его дефицит в окружающей клетку среде нарушает аэробный синтез и снижать количество макроэргических соединений и мембранный потенциал. И, как следствие, угнетается большинство энергозависимых реакций.

Ответ организма на гипоксию включает различные адаптивные способствующие устранению функционально-метаболических реакции, нарушений, и направленных, прежде всего, на сохранение функции митохондрий. При этом используются 2 типа механизмов: 1) срочный компенсаторный, цель которого – предотвращение последствий острой гипоксии и быстрое восстановление в постгипоксический период, и 2) долгосрочные механизмы адаптации к гипоксии, которые формируются в более И способствуют течение длительного периода увеличению неспецифической резистентности к дефициту кислорода. Эти механизмы базируются репрограммировании на регуляторном активности митохондриальных ферментных комплексов (Лукьянова, 2013).

Как показано на рисунке 7, гипоксия индуцирует изменение функции дыхательной цепи и её программы: переход от окисления НАД-зависимых субстратов (комплекс I) к окислению сукцината (комплекс II). За обратимым подавлением электронно-транспортной функции I комплекса следует кратковременная, обратимая, компенсаторная активация дыхательной цепи комплекса II, необходимая для синтеза энергии на основе сукцината в условиях недостатка кислорода, – это основной механизм незамедлительной адаптации к гипоксии и формирования необходимой устойчивости организма.



Рисунок 7.Схема работы митохондриальной дыхательной цепи (ЦТК – цикл трикарбоновых кислот, I, II, III, VI – митохондриальные ферментные комплексы, НАDH – НАД-зависимые субстраты), А – в условиях нормоксии, Б – в условиях гипоксии (Астраханова и др., 2018)

Этот механизм принимает участие в обеспечении как минимум четырех важных регуляторных функций. Во-первых, это сенсорная функция, связанная с изменением кинетических свойств комплексов I и II в ответ на постепенное снижение концентрации кислорода во внешней среде. Эта функция необходима для подбора наиболее эффективного способа окисления субстрата в условиях гипоксии. Во-вторых, это компенсаторная функция, обеспечивающая формирование незамедлительного адаптивного ответа и необходимой защиты организма в условиях гипоксии. В-третьих, это транскрипционная функция, которая обеспечивает активацию экспрессии HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) и других генов, обеспечивающих долгосрочную адаптацию к низкому парциальному давлению кислорода. И наконец, рецепторная функция, обеспечивающая участие митохондрий во внутриклеточной сигнальной системе вместе с сукцинат-зависимым рецептором, GPR91 (G Protein-coupledReceptor 91) (Lukyanova, Kirova, 2015).

При активации Икомплекса резко возрастает содержание сукцината в крови и тканях. Вклад сукцинатоксидазного окисления в общее дыхание может достигать 70-80 %. Кроме того, имеются многочисленные данные, свидетельствующие об особой роли сукцината в окислительном метаболизме ткани на ранней стадии гипоксии. Установлено, что его содержание в тканях и в крови уже в первые 30 минут гипоксии возрастает на порядок, достигая 4-7 ммоль/л, и продолжает увеличиваться в ранний период реоксигенации. При гипоксии активируется сукцинатдегидрогеназа и сукцинат-зависимого окисления. Пути образования эндогенного сукцината при этом могут различаться. Однако в их основе лежат аспартат- и глутамат зависимые аминотрансферазные реакции. При гипоксии мощным источником глутамата в мозге может быть специфическая для него активация в этих условиях Увеличение глутаматергической системы. содержания эндогенного сукцината при гипоксии в цитозоле и в крови говорит о его способности проникать из матрикса митохондрий через плазматические мембраны. При гипоксии увеличивается пассивная проницаемость мембран для сукцината, его анионного антипорта с малатом, а также транспорта ПО концентрационному градиенту с использованием различных переносчиков. Возможен и обратный процесс – транспорт экзогенного сукцината в клетку. Таким образом, необходимый результат достигается путём активации сукцинат-зависимого пути окисления, что позволяет рассматривать сукцинат как сигнальную и маркерную молекулу (Лукьянова, 2013, Kushnir et al., 2001, Correa et al., 2007, Sekine et al., 2006, Sadagopan et al., 2007, Lukyanova, Kirova, 2015).

Обратимое подавление электронно-транспортной функции I комплекса при кислородной недостаточности является одной из трех стадий развития нарушений митохондриального метаболизма при гипоксии. Имеются данные о нарушениях электронно-транспортной функции I комплекса в условиях гипоксии, которая сохраняется и даже усиливается в постгипоксический период (первые 30 минут – 2 часа реоксигенации) (Лукьянова, 2013, Aganietal., 2002, Sadeketal., 2004).

Таким образом, переключение путей субстратов окисления дыхательной цепи при разных кислородной недостаточности компенсирует характерные для гипоксии нарушения синтеза АТФ и По данным Л. Лукьяновой (2013), переключение путей окисления субстратов дыхательной цепи, а именно изменение кинетических показателей основных ферментов I и II комплексов происходит очень быстро – уже через 30 минут после различных гипоксических воздействий. Однако если данное переключение не запускается, то наблюдается более ранняя деэнергизация клеток, которая более выраженными функционально-метаболическими характеризуется нарушениями (Weinberg et al., 2000).

формировании Ведущая роль В молекулярных механизмов долгосрочной адаптации к гипоксии отводится белковому фактору, который индуцируется при гипоксии – HIF-1. Мишенями HIF-1 являются около 180 генов, которые экспрессируют специфические белки, необходимые в условиях сниженного снабжения О₂ для активации альтернативных компенсаторных аэробных и анаэробных реакций, ответственных за синтез энергии и сохранение функциональной активности. Регуляция активности НІГ-1 определяется преимущественно субъединицей НІГ-1α, её экспрессия (или подавление экспрессии) определяются состоянием митохондриальной дыхательной цепи. По данным Л. Лукьяновой (2013) было показано, что дефицит активности Ι комплекса приводил К резкому снижению гипоксической индукции HIF-1а, однако в присутствии сукцината она

восстанавливалась. Иными словами, индукция HIF-1α усиливается в условиях низкой активности I комплекса и высокой активности II комплекса. В то же время показано, что HIF-1α может влиять на работу дыхательной цепи: он способствует ингибированию пируватдегидрогеназы и тем самым подавляет окисление пирувата, что может быть одной из причин инактивации I комплекса (Kimetal., 2006, Semenza, 2007).

Промежуточные компоненты цикла Кребса – сукцинат и α кетоглутарат, помимо их участия в электронно-транспортной функции митохондриальной дыхательной цепи, являются специфическими лигандами двух G-белок-сопряженных рецепторов: GPR91 и GPR99 (G Protein-coupled Receptor 99) соответственно. Поступая из клеток в кровь, в которой эти субстраты обнаруживаются В микромолярных концентрациях, ОНИ выполняют регуляторную функцию сигнальных молекул, ответственных в конечном счете за поддержание метаболического гомеостаза на системном уровне. Помимо этого, с усилением сукцинатоксидазного окисления при гипоксии связывают увеличение содержания Ca²⁺ в цитозоле и матриксе и сопряженный процесс активации фосфолипазы А2, набухание митохондрий, снижение постгипоксического ацидоза, активацию митохондриального К_{атф}зависимого канала (Лукьянова, 2013, Hakak et al., 2009, Vargas et al., 2009).

1.4. Особенности энергетического метаболизма в развивающемся мозге

нейронов Активность митохондрий И глии В совокупности характеризует энергетический метаболизм мозга. Нейрональная активность определяется аэробным гликолизом, а процессы, при недостаточном кровоснабжении - анаэробным гликолизом. В метаболическом обеспечении мозга важнейшую роль также несут и астроциты. Гликолиз в астроцитах находится в тесном взаимодействии с энергетическими потребностями нейронов, y которых В качестве субстрата выступает лактат.

Биоэнергетические и окислительно-восстановительные программы астроцитов адаптированы для поддержания активности нейронов, выживания, а также нейротрансмиссии (Schurr et al., 1999; Schurr 2002; Allen, Barres 2009).



Рисунок 8. Окислительно-восстановительная адаптация астроцитов в нейротрансмиссии (Bolanos, 2016)

Синаптический щелевой глутамат (Glu), который высвобождается пресинаптическим нейроном, действует на глутаматные рецепторы (Glu-R), находящиеся постсинаптическиом нейроне, как В так И В астроцитах. Частично в постсинаптических нейронах кальций удаляется из цитозоля В митохондрии, ЧТО ведет к митохондриально-зависимому активных форм кислорода. Синаптический расщепленный образованию глутамат взаимодействует со своими рецепторами на астроцитах, вызывая каскад реакций посредством циклинзависимой киназы-5 (cyclin-dependent kinase 5 - Cdk5), а именно фосфорилирование ядерного фактора Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), который поступает в ядро и связывается с антиоксидантными элементами, что инициирует экспрессию антиоксидантных генов. Этот путь приводит к биосинтезу и высвобождению (GSH), необходимого глутатиона детоксикации форм для активных
кислорода. Таким образом, через этот астроцит-нейронный глютатионный шаттл астроциты поддерживают окислительно-восстановительный статус нейронов (Bolanos, 2016).

Глюкоза служит основным источником энергии в головном мозге. Метаболизм глюкозы в головном мозге новорожденного отличается от метаболизма во взрослом мозге. Известно, что уровень энергетического метаболизма коррелирует со степенью развития отдельных структур головного мозга и активностью созревающих синапсов. Помимо глюкозы энергетическим субстратом нейронов в развивающемся головном мозге могут быть лактат и кетоновые тела, при этом в раннем постнатальном периоде способность утилизировать лактат снижена (Салмина, 2008, Vannucci, Vannucci, 2000).

При повреждающем действии гипоксии отмечается разная чувствительность нейронов и астроцитов. Также решающее значение имеют сроки онтагенеза. В целом считается, что астроциты – более устойчивые к гипоксическому повреждению клетки. Несмотря на то, что повреждение астроцитов и олигодендроцитов наблюдается уже в начальном периоде повреждения мозга при недостатке кислорода, особенности функционирования митохондрий нейронов и глиальных клеток способствуют большей устойчивости последних к повреждающему действию гипоксии: степень подавления активности дыхательной цепи В глиальных митохондриях значительно меньше, чем в митохондриях нейронального Отмечено, повышенный метаболизм происхождения. что глюкозы соответствует наиболее чувствительным к гипоксии областям мозга. Например, обнаружено локальное усиление метаболизма глюкозы в участке коры головного мозга и базальном ганглии у новорожденных, которые впоследствии демонстрировали тяжелый неврологический дефицит. Такого изменения обмена глюкозы не было обнаружено у новорожденных,

имеющих благоприятный исход после гипоксии (Салмина, 2008; Уразов и др., 2018; Bambrick et al., 2004; Zovein et al., 2004).

В перисинаптичеких астроцитах в результате анаэробного гликолиза образуются молекулы АТФ, которые расходуются на захват глутамата из синапса в астроцит и его конверсию в глутамин. Считают, что при низких концентрациях глутамата происходят энергозависимые процессы – захват и конверсия астроцитами глутамата в глутамин при высоких концентрациях, таким образом, глутамат сам выступает в качестве дополнительного источника энергии. Локальный гиперметаболизм глюкозы в головном мозге у новорожденных с гипоксически-ишемической энцефалопатией после асфиксии высокий высвобождения отражает уровень глутамата В гиперактивные возбудимые синапсы В участках С избирательной чувствительностью (Brekke et al., 2015).

2. Материалы и методы исследования

2.1. Объект исследования

Объектом исследований *in vitro* служили первичные культуры клеток гиппокампа, полученные от мышиных эмбрионов 18 дня гестации линии CBA. Культивирование клеток гиппокампа осуществлялось на покровных стеклах размером 18х18 мм с целью регистрации кальциевой активности культур, скорости потребления кислорода митохондриями, определения экспрессии мPHK BDNF и мPHK NFkB1, моделирования нормобарической Опыты *in vivo* проводились на половозрелых самцах мышей линии C57BL/6, CBA (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 Careand Use of Laboratory Animals» и отвечали требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и были согласованы с биоэтической комиссией ННГУ.

2.2. Схема экспериментов

Эксперименты *in vivo* заключалась в исследовании влияния ОГБГ на функциональное состояние митохондрий головного мозга в постнатальном периоде (табл. 1). На первом этапе проводилось моделирование ОГБГ и регистрация скорости потребления кислорода митохондриями головного могза. На следующем этапе проводилось распределение животных по устойчивости к действию ОГБГ по критерию времени жизни (Тж, мин) на «высоте» и регистрация скорости потребления кислорода митохондриями головного мозга. 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.

Таблица 1

Распределение экспериментальных групп в исследованиях in	vivo
--	------

Этап			Название метода	Количество животных в группах	
Влияние ОГБГ на функциональное	состояние митохондрий головного	мозга в постнатальном периоде	развития	Моделирование ОГБГ Регистрация потребления кислорода митохондриями ИФА	Мыши линии C57BL/6: интактные (n = 18); гипоксия (n = 16).

пределение устойчивости мышей линии C57BL/6 к ОГБП	Моделирование ОГБГ Регистрация потребления кислорода митохондриями ИФА Корреляция	Мыши линии C57BL/6: интактные (n = 18); высокоустойчивые (n = 7); среднеустойчивые (n = 6); низкоустойчивые (n = 3).
0		
		Мыши линии СВА:
ЪГ	Моделирование ОГБГ	интактные (n = 10);
I OI		гипоксия (n =3);
ании	Регистрация	гипоксия + ANA-12 (0,5
рова	потребления кислорода	мг/кг) (n = 3);
фун цели	митохондриями	гипоксия + BDNF (4 мкг/кг)
^न на мо <i>ј</i>		(n = 6).
3DNI	ИФА	
pa H 10372		Мыши линии C57BL/6:
aktc ro m	Трансфекция	интактные (n = 3);
го ф		гипоксия (n= 5);
LOJICO LOJIC	Моделирование ОГБГ	гипоксия + PBS (n= 8);
риче		вирусный вектор AAV-Syn-
онд	Регистрация	BDNF-eGFP (1,7 µl на одно
йрог	потребления кислорода	полушарие) (n = 3);
e He e MI	митохондриями	гипоксия+ вирусный вектор
ИНК		AAV-Syn-BDNF-eGFP (1,7
BJI	ИФА	µl на одно полушарие)
C		(n = 6).

42

На этапе изучения влияния нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на функциональное состояние митохондрий первой опытной группе за 40 мин до подъема «высоту» предварительно вводили (внутрибрюшинно) селективный блокатор TrkB – рецепторов ANA-12 в концентрации 0,5 мг/кг. Второй опытной группе интраназально вводили BDNF в дозе 4 мкг/кг (рис. 9).



Рисунок 9. Схема эксперимента

На следующем этапе исследований внесение BDNF опытной группе осуществляли с помощью аденоассоциированного вирусного вектора AAV-

Syn-BDNF-eGFP (рис. 10) (1,7 µl на одно полушарие) под специфичным нейрональным промотором, несущего в своей последовательности гены нейротрофического фактора BDNF и флуоресцентного белка eGFP.



Рисунок 10. Карта плазмиды AAV-Syn-BDNF-EFFP-kid2 (Mitroshina E.V. et al., 2018)

Был выбран метод прямой внутричерепной, а именно интравентрикулярной доставки вирусного вектора в мозг неонатальной мыши (рис. 11), основанный на способности аденоассоциированного вируса свободно перемещаться среди клеток. В первые часы жизни эпендимальная выстилка желудочков еще не полностью сформирована и не препятствует трансдукции нейронов во всем мозге.



Рисунок 11. Внешний вид мозга после иньекции (Ji- Yoen et al., 2013)

В первые часы жизни производились инъекции в латеральные желудочки головного мозга мышей, затем их возвращали в «материнское гнездо», где они выращивались и вскармливались до 1.5 месяцев, что является оптимальным сроком для экспрессии гена интереса. Далее производился анализ эффективности трансдукции. Оценка экспрессии производилась по наличию флуоресцентного белка eGFP. В качестве материала выступали переживающие срезы головного мозга. Схема эксперимента по оценке влияния нейротрофического фактора BDNF на функциональное состояние митохондрий головного мозга при моделировании ОГБГ представлена на рисунке 12.



Рисунок 12. Схема эксперимента

Регистрация скорости потребления кислорода митохондриями на всех этапах проводилась через сутки после моделирования ОГБГ.

Заключительным этапом данного исследования стала серия экспериментов *in vitro* по изучению влияние BDNF на функциональное состояние митохондрий (рис. 13) и на функциональную кальциевую активность первичных диссоциированных культур, а также влияния экзогенного BDNF на синтез собственного внутриклеточного BDNF и синтез антиапоптотического фактора NFkB1.



- развитие диссоциированной культуры клеток головного мозга при хроническом введении селективного блокатора TrkB-рецепторов ANA-12, дни (DIV)

Рисунок 13. Схема эксперимента

Схема эксперимента по изучению влияния нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на функциональную кальциевую активность диссоцированных культур гиппокампа представлена на рисунке 14.



14 DIV 15 DIV

- период развития диссоциированной культуры гиппокампа без воздействия, дни (DIV)

- период развития диссоциированной культуры гиппокампа после моделирования нормобарической гипоксии, дни (DIV)

Рисунок 14. Схема эксперимента

Изучение влияния экзогенного BDNF на синтез собственного внутриклеточного BDNF и синтез антиапоптотического фактора NFkB1 осуществлялось при помощи детекции мPHK в живых клетках (рис. 15).



Рисунок 15. Схема эксперимента

Детекция мРНК в живых функционирующих клетках позволяет на молекулярном уровне оценить механизмы реализуемого нейропротекторного действия нейротрофического фактора головного мозга.

Таблица 2

Этап	Название метода	Количество клеточных культур
Влияние	Культивирование	
нейротрофического	первичных	
фактора головного	диссоциированных	интактные (n = 5);
мозга (BDNF) на	культур клеток	ANA-12, 10 мкМ (n = 5);
функциональное	головного мозга мышей	BDNF, 1 нг/мл (n = 5).
состояние	линии СВА	

Распределение экспериментальных групп в исследованиях in vitro

48

Регистрация	
потребления кислорода	
митохондриями	
Культивирование	
первичных	
диссоциированных	интактные (n = 21);
культур клеток	гипоксия (n = 18);
головного мозга мышей	BDNF + гипоксия (n =
линии СВА	19).
Регистрация	
функциональной	
кальциевой активности	
Культивирование	
первичных	
диссоциированных	интактные (n = 10);
культур клеток	BDNF (n = 12).
головного мозга мышей	
линии СВА	
Прижизненная детекция	
мРНК	
Культивирование	
первичных	интактные (n = 10);
диссоциированных	гипоксия (n = 8);
культур клеток	BDNF (n = 12);
	Регистрация потребления киторода митохондриями Культивирование первичных диссоциирование культур Культивировано учкциональной учкциональной кальциевой актич Культивирование первичных диссоциирование культур клеток парвичных диссоциирование культур клеток головного мозга меток культирование культур клеток головного мозга меток культур клеток первичных меток культирование культивирование культур культирование культивирование культирование культирование культирование культирование культирование культирование культур клеток

головного мозга мышей	BDNF + гипоксия (n =
линии СВА	11).
Прижизненная детекция мРНК	

2.3. Методы исследования in vivo

2.3.1. Моделирование острой гипобарической гипоксии

Для моделирования острой гипобарической гипоксии использовалась вакуумная проточная барокамера. Внешняя температура воздуха составляла 20-22°С. Все животные были разделены на следующие группы: 1-я группа интактные, 2-я группа — контрольные животные, подвергшиеся острой гипобарической гипоксии, 3-я группа — животные с острой гипобарической гипоксией и превентивным введением (внутрибрюшинно) селективного блокатора TrkB - рецепторов ANA-12 в концентрации 0,5 мг/кг; 4-я группа — животные с острой гипобарической гипоксией и превентивным введением (интраназально) нейротрофического фактора головного мозга BDNF в концентрации 4 мкг/кг. Выбор дозы используемых веществ был основан на результатах предшествующих исследований (Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых ДЛЯ клинического изучения в качестве антигипоксических средств, 1990). Введение препаратов осуществляли за 45 минут до моделирования острой гипобарической гипоксии.

Затем мыши помещались в герметичную камеру, в которой подвергались условиям, соответствующие подъему на высоту «смертельной площадки» 10000 м (220-240 мм рт. ст.) со скоростью 183 м/с (Ведунова и др., 2014, Методические рекомендации по экспериментальному изучению

препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств, 1990). Особи находились на «высоте» в течение 10 минут либо до появления второго агонального вдоха, после чего животных подвергали немедленному «спуску» с моделируемой высоты.

2.3.2. Получение изолированных митохондрий мозга

Изолированные митохондрии с хорошо сопряженной электроннотранспортной цепью являются удобным объектом, позволяющим моделировать различные метаболические состояния. Они позволяют изучать влияние различных химических соединений на компоненты электроннотранспортной цепи.

Выделение митохондрий осуществляли стандартным дифференциальным центрифугированием. Все манипуляции выполняли на льду. Оборудование и среды выделения были охлаждены. После декапитации животных быстро вскрывали черепную коробку, иссекали головной мозг (не более 20 с), помещали его в предварительно охлажденную фарфоровую ступку и промывали ледяной средой выделения следующего состава: 70 мМ сахароза, 210 мМ маннитол, 30 мМ Hepes, 0,1 мМ ЭДТА (pH=7,4), после чего удаляли мозжечок. Большие полушария и стволовую часть мозга подвергали гомогенизации в среде выделения в стеклянной гомогенизаторной пробирке, помещенной в лед. Тефлоновый пестик гомогенизатора с клиренсом, исключавшим разрушение митохондрий, приводили В лвижение электромотором. Соотношение массы ткани и среды выделения — 1:7. Полученный гомогенат подвергали предварительному мозга центрифугированию при 2700 об./мин (температура 0°С, 10 мин). Супернатант сливали в пробирку и подвергали центрифугированию в течение 15 мин при 8500 g. Осажденные митохондрии промывали холодной (+4°C) средой выделения и ресуспендировали в среде, содержавшей 210 мМманнитола, 70 мМ сахарозы, 0,1 мМ ЭГТА, 10 мМНерез (pH=7,4) и вновь

центрифугировали в течение 15 мин при 8500 g. Полученную суспензию митохондрий хранили на льду, не допуская замораживания (не более 1 часа). Определение параметров дыхания митохондрий мозга проводили по оценке скорости поглощения ими кислорода. Скорость потребления кислорода митохондриями регистрировали при помощи респирометра высокого разрешения Охуgraph-2k (Oroboros, Австрия) в закрытой ячейке объемом 2 мл при постоянном перемешивании и термостатировании (28°C). Среда инкубации митохондрий содержала 120 мМКСl, 5 мМ NaH2PO4, 10 мМ Нереs, 5 мМ глутамата, 5 мМ малата и 14 мМ MgCl2 (pH=7,4). Объем суспензии митохондрий в ячейке составлял 50 мкл (0,02 мг/мл белка).

2.3.3. Метод регистрации потребления кислорода

Кислород является конечным акцептором электронов в дыхательной цепи митохондрий. Анализ скорости потребления кислорода остается одним из самых информативных показателей при оценке функционального состояния митохондрий. Изучение потребления кислорода позволяет обнаружить нарушения в дыхательной цепи митохондрий в процессе синтеза АТФ, что позволяет оценить метаболический путь в целом и выявить нарушения, не обнаруживаемые другими методами (Фрелих и др., 2013).

Метод респирометрии с высоким разрешением позволяет позволяет проводить измерения кислорода в небольшом количестве биологического материала при низком парциальном давлении кислорода. Данный метод основан на работе полярографического датчика кислорода (рис. 16).



Рисунок 16. Полярографический датчик кислорода (Gnaiger, 2018)

Кислород диффундирует из образца к поверхности катода через неперемешиваемый слой образца на внешней поверхности мембраны, через мембрану и слой электролита. На катоде давление кислорода эффективно удерживается на нуле. В стационарных условиях, поток кислорода к катоду зависит от внешнего давления кислорода, и от скорости электрохимического восстановления кислорода, которая преобразуется в электрический сигнал. Реакции на катоде и аноде:

$$O_2 + 2 H_2O + 4e^- \rightarrow 4 OH^-$$

- $4 \text{ Ag} \longrightarrow 4 \text{ Ag}^+ + 4e^-$
- $4 \operatorname{Ag}^+ + \operatorname{Cl}^- \longrightarrow 4 \operatorname{AgCl}$

В качестве электролита используется раствор хлорида калия.

Запись трека скорости потребления кислорода и начальный этап обработки полученных результатов производилась в программе DatLab (рис. 17).



скорость потребления кислорода концентрация кислорода

Рисунок 17. Характерный пример зарегистрированной скорости потребления кислорода митохондриями (ось ординат слева – скорость потребления кислорода митохондриями (пмоль/(с*мл), ось абцисс – точки добавления компонентов в экспериментальную среду)

Согласно классификации Чанса проведена оценка состояния V4 – дыхание на экзогенных субстратах (5 мМ глутамат, 5 мМ малат или 10 мМ сукцинат), но в отсутствии АДФ. V3 – скорость дыхания митохондрий при окислительном фосфорилировании, т.е. в присутствии субстратов окисления и АДФ.

2.3.4. Определение белка по методу Брэдфорда

Метод основан на связывании с белками красителя Coomassie Brilliant Blue G-250. После связывания с белком и изменения окраски максимум поглощения находится при длине волны 595 нм.

2.4. Методы исследования in vitro

2.4.1. Метод культивирования первичных культур клеток головного мозга

Беременная мышь умерщвлялась путем дислокации шейных позвонков. Далее осуществлялось препарирование животного с извлечением матки с эмбрионами. Матка с эмбрионами помещалась в стерильную чашку Петри с раствором Хенкса. Дальнейшие манипуляции выполнялись в стерильных условиях.

Эмбрионы извлекались из матки и проводилось выделение мозга из черепных коробок эмбрионов. В зависимости от цели эксперимента из каждого полушария выделялся гиппокамп или кора. Полученная ткань подвергалась механическому измельчению и ферментативной обработке 0,25% раствором трипсина (Gibco) в течение 20 минут для разрушения связей между клетками. Затем клетки тщательно промывались раствором фосфатносолевого буфера (PBS, Gibco), суспензировилась в питательной среде, состоящей из 92,75% нейробазальной среды (Neurobasal, TM) (Invitrogen), 5% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS) (ПанЭко), 2% биоактивной добавки В27 (Invitrogen), 0,25% глутамина (L-glutamin, Invitrogen) и центрифугировались в течение 3 мин при 1000 об/мин. Далее удалялся супернатант и осажденные клетки ресуспендировали в питательной среде. Культивирование клеток осуществлялось на покровных стеклах. Исходная плотность клеток составляла 9000 кл/мм².

На следующий день после посадки 30% культуральной среды заменялись на среду с малым содержанием сыворотки (93,5% Neurobasal, 1% B27, 0,5% L-glutamin, 5% FCS). В дальнейшем смена питательной среды производилось по мере закисления среды в культуре. Обеспечение жизнеспособности клеточных культур производилось в условиях CO₂ инкубатора при температуре 35,5°C, и газовой смеси, содержащей 95% воздуха и 5% CO, 100% влажности. Антибиотики и противогрибковые препараты не использовались. Развитие глии не подавлялось, поскольку глиальные клетки необходимы для длительного сохранения жизнеспособности культуры в условиях in vitro. (Мухина и др., 2009; Vedunova et al., 2013).

2.4.2. Оценка выживаемости клеток после моделирования нормобарической гипоксии in vitro

Оценка жизнеспособности клеток первичной культуры (рис. 19) проводилась на 1 – й день после моделирования нормобарической гипоксии. Осуществлялась окраска клеточных культур флуоресцентными красителями - пропидий йодидом (Sigma), окрашивающим ядра мертвых клеток и бисбензимидом (Sigma), окрашивающим ядра всех клеток, с целью обнаружения погибших клеточных ядер из общего числа клеток в культуре. Пропидий йодид возбуждается светом длиной волны 488 нм, флуоресцирует на длинах волн 562-588 нм. Максимум поглощения бис-бензимида составляет 350 нм и испускаемое свечение детектируется в диапазоне 510-540 нм.

Визуализация и подсчет окрашенных клеток проводились с помощью инвертированного микроскопа DMIL HC (Leica, Германия). Доля мертвых клеток рассчитывалась как отношение числа мертвых клеток, окрашенных пропидий йодидом, к общему числу клеток, окрашенных бис-бензимидом, в процентном соотношении.



Рисунок 19. Пример окрашивания клеток первичных культур гиппокампа для оценки жизнеспособности при моделировании гипоксии in vitro. А – широкопольная микроскопия; Б – бис-бензимид-позитивные клетки; В – пропидиум йодид-позитивные клетки

2.4.3. Моделирование нормобарической гипоксии in vitro

Моделирование гипоксии осуществлялось путем 10-минутной замены нормоксической культуральной среды на среду со сниженным (в 10 раз) содержанием кислорода. Вытеснение кислорода из среды проводилось в герметичной камере с использованием инертного газа (аргон). Аргон в 1,38 раз тяжелее воздуха, обладает хорошей растворимостью, благодаря своей высокой растворимости он способен вытеснять кислород из жидкостей. 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 и др., 2014). Гипоксическое повреждение контрольной группе моделировалось без добавления нейротрофического фактора. Интактной группе моделирование гипоксии не проводилось.

2.4.4. Метод визуализации и регистрации спонтанной кальциевой активности культур клеток гиппокампа

В работе был использован лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Carl Zeiss LSM 510 DuoScan (Германия). Регистрировались временные серии изображений (рис. 19) поля флуоресценции красителя (зонда Oregon Green 488 BAPTA-1 AM). Для возбуждения использовался аргоновый лазер С длиной волны 488 нм. Флуоресценция зонда диапазоне 500-530 HM. Выделение регистрировалась В 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).



Рисунок 20. Характерный пример зарегистрированной спонтанной кальциевой активности в культуре первичных диссоциированных клеток гиппокампа (ось ординат - интенсивность флуоресценции, F%, ось абсцисс - время T, c)

Интенсивность флуоресценции показывала зависимость внутриклеточной концентрации ионов кальция от времени, свидетельствующую о метаболической активности клеток (Митрошина и др., 2011, Захаров и др., 2012).

2.4.5. Метод прижизненной детекции мРНК при помощи РНКдетекторных зондов

Детектирование мРНК РНКосуществлялось при помощи детекторных зондов SmartFlare TM (MerckMillipore), которые позволяют проводить прижизненные исследования без повреждения клеток. Каждый зонд SmartFlare состоит из золотой наночастицы, коньюгированной с многочисленными копиями двунитевого олигонуклеотида (рис. 21), в флюорофор, («репортерная нить») включает котором одна нить

блокированный золотой наночастицей. Когда наночастица вступает в контакт со своей РНК-мишенью, такая РНК связывается со своей комплементарной «захватывающей» нитью и заменяет репортерную нить. Репортерная нить, флюорофор в которой теперь разблокирован, флюоресцирует и может быть идентифицирована. Инкубация культуры с мРНК-детекторным зондом составляет 72 часа.



Рисунок 21. Принцип работы мРНК детекторного зонда Smart Flare

Визуализация мРНК-зондов, ассоциированных с флуорохромом Су5, осуществляется на конфокальном микроскопе при помощи гелий-неонового лазера, с $\lambda = 633$ нм, светофильтр с полосой пропускания 650-710 нм (детекция мРНК NFkB), визуализация мРНК-зондов, ассоциированных с флуорохромом Су3 с $\lambda = 543$ уточнить нм, светофильтр с полосой пропускания 550-570 нм (детекция мРНК BDNF).

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Влияние ОГБГ на функциональное состояние митохондрий головного мозга в постнатальном периоде

Для особенностей выявления активности дыхательной цепи митохондрий В условиях гипоксии И изменения концентрации нейротрофического фактора головного мозга в ответ на стресс-фактор проведен анализ функционального состояния митохондрий у мышей линии C57BL/6 через 1 сутки после моделирования ОГБГ. Особенность метаболизма головного мозга в значительной степени энергетического объемом потребляемого кислорода (порядка 50% предопределена В пренатальном развитии и 25 % в постнатальном развитии организма). В связи с этим, головной мозг обладает высокой чувствительностью к недостатку кислорода и, в частности, к острой гипоксии. Гипоксическое повреждение мозга в основном проявляется тотальным нарушением энергетического гомеостаза мозговой ткани (фазное изменение активности митохондриальных ферментных комплексов) (Абиева 2015; Сосин и др., 2015).

В результате проведенных исследований не выявлено достоверных отличий в скорости потребления кислорода митохондриями головного мозга в состоянии V4 (при окислении глутамата и малата) через сутки после моделирования гипоксии (значения Интактной группы и группы Гипоксия составили соответственно 227,18 ± 11,16 нмоль O2/мин/мг белка и 213,56 ± 10,29 нмоль O2/мин/мг белка (рис. 22А). Также не установлено достоверных изменений в показателях окислительного фосфорилирования (состояние V3 при окислении глутамата и малата в присутствии АДФ). Значения Интактной группы составили 1332,6 ± 82,27 нмоль O2/мин/мг белка, группы Гипоксия 1258,53 ± 44,49 нмоль O2/мин/мг белка (рис. 22Б). Однако

зафиксировано достоверное (р≤0,01, критерий Манна-Уитни) снижение на 38% показателей в состоянии V4 при окислении сукцината (762,14 ± 47,04 нмоль О2/мин/мг белка в Интактной группе, 630,11 ± 48,3 нмоль О2/мин/мг белка в группе Гипоксия) (рис. 22В).



Рисунок 22. Показатели состояния дыхательной цепи митохондрий клеток головного мозга мышей после эпизода ОГБГ (1 сутки после гипоксии) * - достоверные отличия от показателей интактной группы

р≤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)

Согласно традиционным представлениям (Лукьянова и др., 2013) при гипоксии реализуется переключение окисление НАД-зависимых субстратов на сукцинатоксидазный путь. Отсутствие достоверного изменения активности I комплекса дыхательной цепи в ответ на кислородную недостаточность в данном исследовании объясняется разной устойчивостью животных к действию ОГБГ, так как животные с различной устойчивостью к ОГБГ имеют принципиальные отличия по биохимическим свойствам крови и особенностям функционирования центральной нервной системы. На данном этапе эксперимента в опытной группе «Гипоксия» не проводилось разбиение животных по устойчивости к ОГБГ.

При оценке концентрации нейротрофического фактора BDNF мышей линии C57BL/6, также не выявлено достоверных отличий в Интактной группе и группе Гипоксия (рис. 23).



Рисунок 23. Концентрация нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) мышей после эпизода ОГБП (1 сутки после гипоксии)

В связи с характерными физиологическими особенностями у

животных с разной устойчивостью к ОГБГ и прямой связью между типом нервной системы и потерей макроэргических соединений, на следующем этапе осуществлен анализ метаболизма митохондрий у высоко-, средне- и низкоустойчивых животных (рис.24).

В результате проведенных исследований показано, что в группах среднеустойчивых (С.У.) и низкоустойчивых (Н.У.) животных скорость потребления кислорода митохондриями головного мозга в состоянии V4 при окислении субстратов глутамата и малата достоверно (p≤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. 24А). Скорость потребления кислорода митохондриями головного мозга в состоянии V4 при окислении сукцината (рис. 24В) достоверно снижается только в группе Н.У. животных.

Также отмечено, что значения состояния V3 (рис. 24Б) достоверно (р≤0,01, критерий Манна-Уитни) снижаются только в группе Н.У. животных и составляют 940,74 ± 42,14 нмоль О2/мин/мг белка, что на 29% ниже значений Интактной, на 23 % В.У. и на 27 % С.У. групп животных.



Рисунок 24. 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

р≤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)

65

Таким образом, в группе среднеустойчивых животных запускаются регуляторной срочной механизмы адаптации И происходит репрограмирование дыхательной цепи (переключение НАДН - зависимого пути окисления субстратов на сукцинатоксидазный путь). Данный механизм направлен на компенсацию характерных для гипоксии нарушений синтеза ATΦ, нормализации параметров аденилатного пула И устранение гипоксического ацидоза, реализуемых формировании срочной при резистентности.

Однако, нами показано, что в группе низкоустойчивых животных на 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 деэнегизация клеток, которая характеризуется более выраженными функционально-метаболическими нарушениями. Компенсаторные механизмы оказываются недостаточными, так как при гипоксии снижается парциальное давление кислорода в крови и артериально – венозная разница.

Также нами была выявлена зависимость между концентрацией нейротрофического фактора и устойчивостью животных к ОГБГ. Показано, что группе низкоустойчивых животных значимо снижается концентрация BDNF, тогда как у высоко – и среднеустойчивых животных показатели остаются в пределах интактных значений (рис. 25).



Рисунок 25. Концентрация нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) мышей после эпизода ОГБП * - отличие относительно интактной группы # - отличие относительно группы высокоустойчивых животных ## - отличие относительно группы среднеустойчивых животных р≤0,01, критерий Манна-Уитни

Можно предположить, что устойчивость животных зависит от состояния митохондриального аппарата, поскольку у низкоустойчивых животных даже через сутки после перенесенного эпизода ОГБГ фиксируется снижение показателей функционирования дыхательной цепи митохондрий.

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

Для более детального изучения роли BDNF в адаптации ЦНС к гипоксии на следующем этапе проведена оценка TrkB-опосредованного действия BDNF на выживаемость мышей и активность дыхательной цепи митохондрий при моделировании ОГБГ. Показано, что 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. 26). 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.





Также показано, что в условиях гипоксии снижение сопряжения окисления и фосфорилирования обусловлено BDNF-TrkB-сигнализацией.

При оценке степени сопряжения окислительного фосфорилирования (табл. 3) показано, что в условиях гипоксии коэффициент дыхательного контроля V3/V4 достоверно снижается до 3,81±0,31 по сравнению с интактными значениями (6,31±0,38).

Показатели состояния дыхательной цепи митохондрий клеток головного мозга мышей после эпизода ОГБГ

Группа	V3/V4
Интактные	6,31±0,38
Гипоксия	3,81±0,31*
Гипоксия+ BDNF	6,09±0,48 [#]
Гипоксия+ANA-12	4,13±0,29 *,#,##

* - отличие относительно интактной группы, # - отличие от группы Гипоксия,
- отличие от группы Гипоксия+BDNF (p≤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±0,29. Уменьшение значений дыхательного контроля свидетельствует о снижении степени сопряжения окисления и фосфорилирования.

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

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

Результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы в статье Астраханова и др. BDNF – опосредованная регуляция функционального состояния митохондрий клеток головного мозга в условиях гипоксии // Современные технологии в медицине. – 2018. – Т. 10. – № 3. – С. 88 -94.

69

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.

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

С целью изучения влияния на показатели функциональной активности митохондрий долговременного накопления BDNF, проведен анализ показателей состояния дыхательной цепи митохондрий при хроническом введении нейротрофического фактора головного мозга.

Оптимальной моделью для данного эксперимента стала диссоциированная культура клеток головного мозга (рис. 27).



Рисунок 27. Пример диссоциированной культуры клеток головного

мозга

(А – интактная, Б – хроническое добавление ANA-12, В – хроническое добавление BDNF)

Анализ морфологических изменений не выявил различий между

интактной группой и группами с хроническим введением блокатора TrkBрецепторов ANA-12 и нейротрофического фактора головного мозга (BDNF).

Анализ функционального состояния митохондрий показал, что в условиях нормоксии BDNF стимулирует дыхание в состоянии V4 при окислении глутамата и малата (рис. 28А). Значения V4 при ежедневном введении BDNF (1 нг/мл) увеличиваются в 2 раза по сравнению с интактной группой и составляют 13,02 ± 0,69 нмоль O2/мин/мг белка (14 день развития культуры, 14DIV). Однако изменение дыхания в состоянии V4 при окислении сукцината не зафиксировано (рис. 28В). При этом установлено, что хроническая блокада TrkB-рецепторов приводит к достоверному снижению дыхания в состоянии V3. (рис. 28Б).



Рисунок 28. Показатели состояния дыхательной цепи митохондрий первичной диссоциированной культуры клеток головного мозга, 14 DIV

- * отличие от интактной группы
- # отличие от группы ANA-12
- р≤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)

Результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы в статье 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

Особый интерес представляет изучение влияния хронического накопления нейротрофического фактора BDNF на метаболизм митохондрий. Для этого на следующем этапе проведен анализ состояния дыхательной цепи митохондрий при хроническом накоплении BDNF.

3.4. Влияние вирусной трансдукции BDNF на функциональное состояние митохондрий головного мозга

С целью хронического, но уже эндогенного накопления 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 хроническое накопление BDNF в течение 1,5 месяцев не влияет на показатель V4 при окислении глутамата и малата (рис. 29А). Показатели группы BDNF (203,06 ± 44,09 нмоль O2/мин/мг белка)
значимо не отличались от интактных значений (174,98 ± 14,79 нмоль O2/мин/мг белка). В группе Гипоксия+BDNF отмечена тенденция к увеличению показателей V4, однако данные изменения не достоверны.



Рисунок 29. Показатели состояния дыхательной цепи мышей, трансфецированных вирусным вектором AAV-Syn-BDNF-eGFP

* - отличие от интактной группы

▲ - отличие от группы BDNF

- отличие от группы Гипоксия

- отличие от группы Гипоксия + PBS

р≤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 этом установлено, что BDNF в условиях ОГБГ проявляет нейропротекторный эффект, поскольку поддерживает дыхание в состоянии V4 при окислении сукцината.

Значения состояния V3 (рис. 29Б) в группе Гипоксия составили 586,98 \pm 94,03 нмоль O2/мин/мг белка, что достоверно (р \leq 0,01, критерий Манна-Уитни) ниже на 37% интактных показателей (926,92 \pm 11,52 нмоль O2/мин/мг белка. При хроническом эндогенном накоплении нейротрофического фактора показатели группы Гипоксия+ BDNF в 2 раза выше (1211,88 \pm 168,21 нмоль O2/мин/мг белка) по сравнению с группой Гипоксия. В условиях нормоксии BDNF также стимулирует окислительное фосфорилирование - значения группы BDNF (1365,7 \pm 251,66 нмоль O2/мин/мг белка) на 47 % достоверно выше интактных показателей (р \leq 0,01, критерий Манна-Уитни).

При оценке состояния V4 (окисление сукцината) (рис. 29В) также показано, что BDNF проявляет нейропротективные свойства. Значения в группе Гипоксия составили $326,88 \pm 576$ пмоль/(с*мл) на 1 мг белка, что на 35 % достоверно ниже (p≤0,01, критерий Манна-Уитни) Интактной группы (8349,66 ± 38,69 нмоль O2/мин/мг белка. Хроническое накопление BDNF восстанавливает скорость потребления кислорода митохондриями после эпизода ОГБГ (группа Гипоксия+BDNF) (627,2 ± 66,77 нмоль O2/мин/мг белка) и сохраняет ее в пределах интактных значений (500,98 ± 20,82 нмоль O2/мин/мг белка).

Кроме того, нами показано, что нейротрофический фактор головного мозга реализует нейропротективный эффект на уровне сохранения дыхательного контроля (табл. 4). Эпизод ОГБГ приводил с снижению V/3V4 до 3,72±0,34, что на 30% ниже интактных значений (5,30±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).

Показатель дыхательного контроля мышей, трансфецированных 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 (р≤0,01, критерий Манна-Уитни)

Интересно отметить, что в норме нейротрофический фактор головного мозга достоверно увеличивает значения дыхательного контроля (6,90±0,77).

На рисунке 30 представлен характерный пример изменения профиля кривой при регистрации скорости потребления кислорода митохондриями.



Рисунок 30. Характерный пример скорости потребления кислорода митохондриями. А – интактная группа, Б – гипоксия, В – BDNF+гипоксия Г– BDNF (М – митохондрии, Д – АДФ, Р – ротенон, С – сукцинат)

При оценке концентрации нейротрофического фактора головного мозга (рис. 31) показано, что в группе Гипоксия+BDNF содержание нейротрофического фактора увеличивается по сравнению с группой Гипоксия.



Рисунок 31. Концентрация нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) трансфецированных мышей линии C57BL/6 после эпизода ОГБП (1,5 месяца после иньекции вирусного вектора AAV-Syn-BDNF-eGFP) * -отличие от интактной группы

- # отличие от группы Гипоксия
- ## отличие от группы Гипоксия + PBS
- р≤0,01, критерий Манна-Уитни

На следующем этапе для выявления потенциального нейропротекторного действия нейротрофического фактора головного мозга проводилась оценка его защитного действия на уровне нейрон-глиальной сети при моделировании нормобарической гипоксии.

3.5. Влияние BDNF на жизнеспособность клеток первичной культуры гиппокампа при моделировании нормобарической гипоксии in vitro

Исследование жизнеспособности клеток проводилось на 1-е сутки после моделирования эпизода нормобарической гипоксии.

Морфологические изменения в группе, подвергшейся повреждающему действию гипоксии, характеризовались наличием некротизированных клеток (рис. 32).



Рисунок 32. Морфологические изменения первичной культуры клеток головного мозга. А – интактная культура, Б – контрольная культура на через

1 сутки после моделирования нормобарической гипоксии

В интактной группе отсутствовали как морфологические изменения, так и изменение числа мертвых клеток (рис. 33).





Процент мертвых клеток в Интактной группе составил 4,95±0,83 %. Оценка жизнеспособности клеток первичной культуры при моделировании эпизода нормобарической гипоксии выявила, что уже через 1 сутки количество мертвых клеток достоверно (p<0,05) увеличивается на 20 %. Применение нейротрофического фактора (1 нг/мл) нивелирует повреждающий эффект (группа Гипоксия+BDNF). На первые сутки после моделирования гипоксии количество мертвых клеток составляло 6,78±2,7, что в 3,6 раза меньше по сравнению с группой Гипоксия.

Результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы в статье Ведунова и др. 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.

Митохондрии наряду с другими буферными системами клетки аккумулируют кальций и, как, следствие, контролируют клеточную кальциевую сигнализацию, обеспечивающую жизнедеятельность клетки, в том числе на нейросетевом уровне.

3.6. Влияние нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на функциональную кальциевую активность диссоцированных культур гиппокампа in vitro

Ha следующем этапе исследования проведена оценка нейропротекторных свойств нейротрофического фактора BDNF по показателям функциональной кальциевой активности диссоциированных культур гиппокампа. Кальциевая сигнализация участвует в регуляции фундаментальных процессов функционирования нейронной сети, регулирует обеспечивающие функциональные реакции, работу множества внутриклеточных сигнальных путей. Буферные системы клетки формируют кальциевый гомеостаз и обеспечивают сигнальную систему с определенной амплитудой. Нейрональные кальциевые осцилляции характеризуются входом кальция через электро – и лиганд – зависимые каналы и этот вход кальция создает короткоживущие кальциевые осцилляции.

На рисунке 34 представлен пример спонтанной кальциевой активности диссоциированной культуры гиппокампа.



Рисунок 34. Характерный пример спонтанной кальциевой активности диссоциированной культуры гиппокампа на 15 день развития (через сутки после гипоксии)

а – интактная группа, б – гипоксия, в – группа с применением BDNF при моделировании гипоксии

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. 35). В группе, которая была подвергнута гипоксическому воздействию, выявлено очень небольшое число клеток, проявляющих кальциевую активность (3,9 ± 1,2 %) относительно интактных показателей (77 ± 1,3 %). Применение BDNF (1 нг/мл) частично нивелирует негативное действие нормобарической гипоксии, что выражается

80

в достоверном (р≤0,05, ANOVA) увеличении процента клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность (35 ± 1,2%).



Рисунок 35. Процент клеток, проявляющих кальциевую активность на 15 день развития (через сутки после гипоксии)

* - различия достоверны относительно интактной группы (р≤0,05, ANOVA)

- различия достоверны относительно контрольной группы (р≤0,05, ANOVA)

Превентивное введение BDNF в концентрации 1 нг/мл в культуры, перенесших эпизод нормобарической гипоксии, оказывает положительное действие, которое выражается в достоверном увеличении частоты (рис. 36) и длительности (рис. 37) кальциевых осцилляций.



Рисунок 36. Частота кальциевых осцилляций на 15 день развития (через сутки после гипоксии)

* - различия достоверны относительно интактной группы (p≤0,05, ANOVA)
- различия достоверны относительно группы гипоксия (p≤0,05, ANOVA)

Однако, превентивное введение BDNF, способствующее нормализации показателей кальциевой активности после эпизода нормобарической гипоксии, также характеризуется достоверными отличиями (p≤0,05, ANOVA) от интактных значений, что, вероятно, обуславливает повреждающее действие гипоксии.



Рисунок 37. Длительность кальциевых осцилляций на 15 день развития (через сутки после гипоксии)

* - различия достоверны относительно интактной группы (р≤0,05, ANOVA)

- различия достоверны относительно группы гипоксия (р≤0,05, ANOVA)

Механизмы нейропротекторного и антигипоксического действия BDNF на сегодняшний день полностью не изучены. Различные уровни экспрессии BDNF имеют решающее значение для функционирования нейрон-глиальной сети. В ряде исследований показано, различные уровни экспрессии BDNF имеют решающее значение для функционирования нейрон-глиальной сети, именно для регуляции синаптической a аксональной и дендритной арборизации, пластичности, формирования определения числа и размера дендритных шипиков. Кроме того, существенно важно локальное распределение мРНК BDNF в теле клетки и ее отростках. При этом 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.

В развитии диссоциированной культуры гиппокампа выделяют несколько стадий. На 7 день развития образуются первые химические синапсы, регистрируется биоэлектрическая активность в виде случайных спайков и синхронизированных пачек импульсов. Именно этот период характеризуется увеличением кальциевой активности. К 14 дню развития наблюдается усложнение химических синапсов, появляются зрелые формируются перфорированные аксошипиковые контакты, синапсы, нейронные сети имеют одинаковые паттерны кальциевой активности. На 21й день развития в культуре формируется полноценная нейрон-глиальная сеть, которая генерирует «суперосцилляции» (временное повышение базового уровня флуоресценции, период которого происходит несколько В событий). Происходит спонтанных кальциевых полное созревание синаптических контактов (Широкова и др., 2013).

На рисунке 38 представлен характерный пример клетки диссоциированной культуры, в которой детектировна мРНК нейротрофического фактора головного мозга (BDNF).

83



Рисунок 38. мРНК BDNF – позитивная клетка первичной диссоциированной культуры гиппокампа

При анализе изменения мРНК BDNF – позитивных клеток в процессе развития нейрон-глиальной сети в первичной культуре клеток гиппокампа (рис. 39), выявлено, что доля мРНК BDNF – позитивных клеток достоверно ($p \le 0,05$) выросла к 14 дню развития. Далее (21 день развития культуры) зафиксировано достоверное ($p \le 0,05$) снижение процента мРНК BDNF – позитивных клеток. Статистических различий между 7 и 21 днями развития первичной диссоциированной культуры не обнаружено. Полученные данные свидетельствуют о том, что концентрация эндогенного BDNF наиболее значима в период активного синаптогенеза (10-14 день развития).



Рисунок 39. Доля мРНК BDNF – позитивных клеток в первичных диссоциированных культурах гиппокампа на разных сроках развития * - различия достоверны относительно интактной группы # - различия достоверны относительно группы 7 дня развития p≤0,05, ANOVA

TrkB Согласно литературным данным, опосредованные нейропротекторные свойства BDNF могут осуществляться путем активации (NFkB) ядерного фактора kВ счёт ассоциации между RIP2 за (взаимодействующая с рецептором серинтреонинкиназа 2. Receptorserine/threonine-protein kinase 2) interacting И TRAF6 (фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей, TNF receptorassociated factor 6). При активации белкового NF-kB комплекса экспрессируются антиапоптотические белки семейств Bcl2 и IAP. Данный эффект наряду с активацией других факторов (например, c-jun, cIAP1) служит основным тормозящим апоптоз агентом (Рудницкая и др., 2016; Астраханова и др., 2018).

Нами проведен анализ экспрессии мРНК NFkB1 в условиях нормоксии и гипоксии при аппликации нейротрофического фактора головного мозга (BDNF). На рисунке 40 представлен характерный пример диссоциированной культуры с детектированием мРНК NFkB1.



Рисунок 40. мРНК NFkB1 – позитивная клетка первичной диссоциированной культуры гиппокампа

В результате проведенных исследований показано, что BDNF оказывает достоверное (p≤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 (рис. 41).



Рисунок 41. Процент NFkB1 - положительных клеток в первичной диссоциированной культуре культуре гиппокампа через сутки после гипоксии * - различия достоверны относительно контрольной группы р≤0,05, ANOVA

Отсутствие активации синтеза мРНК NFkB1 может быть связано с подавлением синтетических процессов в клетке.

Результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы в статье Мищенко и др. 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; Мищенко и др. 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.

87

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 BDNF влияния на кальциевый гомеостаз нейрон-глиальной сети. **BDNF** Установлено, что превентивная аппликация способствовала функциональной кальциевой первичной сохранению активности 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. 42) участия нейротрофического фактора головного мозга в реализации антигипоксического действия в клетках головного мозга.



Рисунок 42. 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.

89

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 мPHK BDNF.

5. Отсутствует взаимосвязь между антигипоксическим действием BDNF и синтезом мPHK антиапоптотического фактора NFkB1.

Список литературы

1. Adachi N., Numakawa T., Richards M., Nakajima S., Kunugi H. New insight in expression, transport, and secretion of brain-derived neurotrophic factor: Implications in brain-related diseases // World J Biol Chem. 2014. V. 5, № 4. P. 409-428.

2. Allen N. J. and Barres B. A. Neuroscience: Glia more than just brain glue. Nature. 2009. № 457. P. 675–677.

3. Allen S.J., Dawbarn D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. Clin. Science. 2006. № 110. P. 175-191.

4. Bambrick L., Kristian T., Fiskum G. Astrocyte mitochondrial mechanisms of ischemic brain injury and neuroprotection. Neurochemical Res. 2004. № 29: P. 601–608.

5. Benarroch EE. Brainderived neurotrophic factor: Regulation, effects, and potential clinical relevance. Neurology. 2015. V. 84, № 16. P. 1693–1694.

6. Bickler P., Feiner J., Rollins M., Meng L. Tissue Oximetry and Clinical Outcomes // AnesthAnalg. 2017. V. 124, № 1. P. 72-82.

7. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor // Growth Factors 2004. V. 22, № 3. P. 123-31.

8. Bisht K., Kaushik Sharma K., Tremblay M.E. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: Roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress // Neurobiol Stress. 2018. № 9. P. 9–21.

9. Brekke E, Morken TS, Sonnewald U Glucose metabolism and astrocyteneuron interactions in the neonatal brain // Neurochem Int. 2015. № 82. P. 33-41.

10. CaviedesA., LafourcadeC., Soto C., Wyneken U. BDNF/NF-κB Signaling in the Neurobiology of Depression // Bentham Science. 2017. № 23. P. 3154-3163.

11. Chen R., Lai U.H., Zhu L., Singh A., Ahmed M., Forsyth N.R. Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors // Front Cell Dev Biol. 2018. V. 6, № 132. P. 1-12.

12. Chen S.D, Wu C.L., Hwang W.C., Yang D.I. More Insight into BDNF against Neurodegeneration: Anti-Apoptosis, Anti-Oxidation, and Suppression of Autophagy // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18, № 3. P. 545.

13. Coimbra-Costa D., Alva N., Duran M., Carbonell T., Rama R. Oxidative stress and apoptosis after acute respiratory hypoxia and reoxygenation in rat brain // Redox Biol. 2017. № 12. P. 216–225.

14. Du Y, Wu HT, Qin XY, Cao C, Liu Y, Cao ZZ, Cheng Y Postmortem Brain, Cerebrospinal Fluid, and Blood Neurotrophic Factor Levels in Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis // J. Mol. Neurosci. 2018. V. 65, № 3. P. 289-300.

15. Duclot M., Kabbaj M. Epigenetic mechanisms underlying the role of brainderived neurotrophic factor in depression and response to antidepressants // J. Exp. Biol. 2015. V. 218, № 1. P. 21–31.

16. Fletcher J.L., Murray S.S., Xiao J. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Central Nervous System Myelination: A New Mechanism to Promote Myelin Plasticity and Repair // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19, № 12. P. 1-16.

17. Foltran R.B., Diaz S.L. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? // J. Neurochem. 2016. V. 138, № 2. P. 204–221.

 Geisler J., Marosi K., Halpern J., Mattson M.P. DNP, Mitochondrial Uncoupling and Neuroprotection: A Little Dab'll Do Ya // Alzheimers Dement.
 2017. V. 13, № 5. P. 582–591.

19. Giannopoulou I., Pagida M.A., Briana D.D., Panayotacopoulou M.T. Perinatal hypoxia as a risk factor for psychopathology later in life: the role of dopamine and neurotrophins // Send toHormones (Athens). 2018. V. 17, N 1. P. 25-32.

20. Ginsberg S.D., Malek-Ahmadi M.H., Alldred M.J., Che S., Elarova I., Chen Y., Jeanneteau F., Kranz T.M., Chao M.V., Counts S.E., Mufson E.J. Selective decline of neurotrophin and neurotrophin receptor genes within CA1 pyramidal neurons and hippocampus proper: Correlation with cognitive performance and

neuropathology in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease // Hippocampus. 2017. № 9. P. 1-9.

21. Gnaiger E. O2k Quality Control 1: Polarographic oxygen sensors and accuracy of calibration // Mitochondrial Physiology Network. 2018. №17. P. 1-20.

22. Gonzalez A, Moya-Alvarado G, Gonzalez-Billaut C, et al. Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) // Cytoskeleton (Hoboken). 2016. V. 73, № 10. P. 612–28.

23. Grimm A., Cummin N., Götz J. Local Oxidative Damage in the Soma and Dendrites Quarantines Neuronal Mitochondria at the Site of Insult // iScience. № 6.
P. 114-127.

24. Hacioglu G., Senturk A., Ince I., Alver A. Assessment of oxidative stress parameters of brain-derived neurotrophic factor heterozygous mice in acute stress model // Iran J. Basic. Med. Sci. 2016. V.19, № 4. P. 388–393.

25. Hernandez-Chan N.G., Bannon M.J., Orozco-Barrios C.E., Escobedo L., Zamudio S., Cruz F.D., Gongora-Alfaro J.L., Armendáriz-Borunda J., Corona D.R., Espadas-Alvarez A.J., Flores-Martínez Y.M., Ayala-Davila J., Hernandez-Gutierrez M.E., Pavon L., Garcia-Villegas R., Nadella R., Martinez-Fong D. Neurotensin-polyplex-mediated brain-derived neurotrophic factor gene delivery into nigral dopamine neurons prevents nigrostriatal degeneration in a rat model of early Parkinson's disease // J Biomed Sci. 2015. V. 22, № 1. P. 59.

26. Hirsch M.A., Wegen E.H., Newman M. A., Heyn P.C. Exercise-induced increase in brain-derived neurotrophic factor in human Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis // Transl Neurodegener. 2018. V. 7, № 7. P. 1-12.

27. Kang S.S., Zhang Z., Liu X., Manfredsson F.P., Benskey M.J., Cao X., Xu J., Sun Y.E., Ye K. TrkB neurotrophic activities are blocked by α -synuclein, triggering dopaminergic cell death in Parkinson's disease // 2017. V. 114, No40. P. 10773–10778.

28. Kevin G. Bath, Michael R. Akins, Francis S. Lee BDNF control of adult SVZ neurogenesis // Developmental Psychobiology. 2011. №54. P. 579-589.

29. Kowiański P., Lietzau G., Czuba E., Waśkow M., Steliga A., Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity // Cell Mol Neurobiol. 2018. V. 38, № 3. P. 579-593.

30. Lee R., Kermani P., Teng K.K., Hempstead B.L. Regulation of cell survival by secreted proneurotropjins. Science. 2001. № 294. P. 1945-1948.

31. Legge R. M., Sendi S., Cole J. H. et al. Modulatory effects of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism on prefrontal regions in major depressive disorder // The British Journal of Psychiatry. 2015. V. 206, N_{2} 5. P. 379–384.

32. Levy MJF, Boulle F, Steinbusch HW, van den Hove DLA, Kenis G, Lanfumey L. Neurotrophic factors and neuroplasticity pathways in the pathophysiology and treatment of depression // Psychopharmacology (Berl). 2018 V. 235, N_{2} 8. P. 2195-2220.

33. Liu C., Chan C.B., Ye K. 7,8-dihydroxyflavone, a small molecular TrkB agonist, is useful for treating various BDNF-implicated human disorders // Transl. Neurodegener. 2016. V. 5, № 9. P. 1-9.

34. Liu J., Amar F., Corona C., So W. L., Andrews S.J., Nagy P.L., Shelanski M.L., Greene L.A. Brain-Derived Neurotrophic Factor Elevates Activating Transcription Factor 4 (ATF4) in Neurons and Promotes ATF4-Dependent Induction of Sesn2 // Front Mol Neurosci. 2018. № 11. P. 62.

35. Lou H., Kim S.K., Zaitsev E., Snaell C.R., Lu B., Loh Y.P. Sorting and activitydependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase E. // Neuron. 2005. № 45. P. 245-255.

36. Lu B., Pang P.T., Woo N.H. The yin and yang of neurotrophin action. Nature Rev. Neurosci. 2005. №.6. P. 603-614.

37. M. Polyakova, K. Stuke, K. Schuemberg, K. Mueller, P. Schoenknecht, and
M. L. Schroeter. BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders:
a systematic & quantitative meta-analysis // Journal of Affective Disorders. 2015.
V. 174. P. 432–440.

38. Moutaux E., Christaller W., Scaramuzzino C., Genoux A., Charlot B., Cazorla M., Saudou F. Neuronal network maturation differently affects secretory vesicles and mitochondria transport in axons // Sci Rep. 2018. V. 8, № 13429. P. 1-14.

39. Moya-Alvarado G., Gonzalez A., Stuardo N., Bronfman F.C. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Regulates Rab5-Positive Early Endosomes in Hippocampal Neurons to Induce Dendritic Branching // Front Cell Neurosci. 2018. №12. P. 493.

40. Nalivaeva N.N., Turner A.J., Zhuravin I.A. Role of Prenatal Hypoxia in Brain Development, Cognitive Functions, and Neurodegeneration // Front Neurosci. 2018. № 12. P. 825.

41. Park H., Poo M.M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. Nature Rev. Neurosci. 2013. № 14. P.7-23.

42. Pasha M, Eid A.H., Eid A. A., Gorin Y., Munusamy S. Sestrin2 as a Novel Biomarker and Therapeutic Target for Various Diseases // Oxid Med Cell Longev. 2017. P. 1-10.

43. Pereira, D. B., Rebola, N., Rodrigues, R. J., Cunha, R. A., Carvalho, A. P., & Duarte, C. B. Trkb receptors modulation of glutamate release is limited to a subset of nerve terminals in the adult rat hippocampus // Journal of Neuroscience Research. № 83. P. 832–844.

44. Phillips C. Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Physical Activity: Making the Neuroplastic Connection // Neural Plast. 2017. V. 2017, № 7260130. P. 1-17.

45. Poo M.M. 2001. Neurotrophins as synaptic modulators // Nat Rev Neurosci V. 2, № 1. P. 24-32.

46. Ryou M.G., Mallet R.T. An In Vitro Oxygen-Glucose Deprivation Model for Studying Ischemia-Reperfusion Injury of Neuronal Cells // Methods Mol Biol. 2018. № 1717. P. 229-235.

47. Sasi M, Vignoli B, Canossa M, et al. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling // Pflugers Arch Eur J Physiol. 2017. № 469. P. 593–610.

48. Schindowski K., Belarbi K., Buee L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport // Genes, Brain and Behavior. 2008. V 7, № 1. P. 43-56.

49. Schurr A. Lactate, glucose and energy metabolism in the ischemic brain // Int. J. Molecul. Med. 2002. № 10. P. 131–136.

50. Schurr A., Miller J.J., Payne R.S. et al. An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons // J. Neurosci. 1999. № 19. P. 34–39.

51. ScvreK., BendzB., Hanko E. et al. Reduced autonomic activity during stepwise exposure to high altitude // Acta Physiol. Scand. 2001. V. 173, № 4. P. 409-417.

52. Sheng S., Huang J., Ren Y., Zhi F., Tian X., Wen G., Ding G., Xia T.C., Hua F., Xia Y. Neuroprotection Against Hypoxic/Ischemic Injury: δ-Opioid Receptors and BDNF-TrkB Pathway // Cell PhysiolBiochem. 2018. V. 47, № 1. P. 302-315.

53. Singer W., Manthey M., Panford-Walsh R., Matt L., Geisler H.S., Passeri E., Baj G., Tongiorgi E., Leal G, Duarte C.B., . Salazar I.L, Eckert P.,Rohbock K, Hu J., Strotmann J., Ruth P., Zimmermann U., Rüttiger L., Ott T., Schimmang T., Knipper M. BDNF-Live-Exon-Visualization (BLEV) Allows Differential Detection of BDNF Transcripts in vitro and in vivo // Front Mol Neurosci. 2018. V. 11, № 325. P. 1-19.

54. Tecuatl C., Herrrera-López G., Martín-Ávila A., Yin B., Weber S., Barrionuevo G., Galván E.J. TrkB-mediated activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt cascade reduces the damage inflicted by oxygen-glucose deprivation in area CA3 of the rat hippocampus // Eur. J. Neurosci. 2018. V. 47, N_{2} 9. P. 1096–1109.

55. Tiernan C.T., Ginsberg S.D., He B., Ward S.M., Guillozet-Bongaarts A.L., Kanaan N.M., Mufson E.J., Counts S.E. Pretangle pathology within cholinergic nucleus basalis neurons coincides with neurotrophic and

neurotransmitter receptor gene dysregulation during the progression of Alzheimer's disease // Neurobiol Dis. 2018. № 117. P. 125-136.

56. Tomas K., Davis A. Neurotrophins: a ticket to ride for BDNF. Curr. Biology. 2005. V. 15, № 7. P. 262-264.

57. Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning // Learn Mem. 2002. V. 9, № 5. P. 224-37.

58. Vannucci R.C., Vannucci S.J. Glucose metabolism in the developing brain // SeminPerinatol. 2000. V. 24, № 2. P. 107-15.

59. Vedunova M., Sakharnova T., Mitroshina E., Perminova M., Pimashkin A., Zakharov Yu., Dityatev A., Mukhina I. Seizure-like activity in hyaluronidase-treated dissociated hippocampal cultures // Frontiers in cellular neuroscience. 2013. T. 7. C. 149.

60. Vilar M., Mira H. Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood: expected and unexpected roles // Front Neurosci. 2016. V. 10, № 26. P. 220-235.

61. Watts M.E., Pocock R., Claudianos C. Brain Energy and Oxygen Metabolism: Emerging Role in Normal Function and Disease // Front Mol Neurosci. 2018. V. 11, № 216. P. 1-13.

62. Wolf M. Physiological consequences of rapid or prolonged aircraft decompression: evaluation using a human respiratory model //Aviat. Space Environ. Med. 2014. V. 85, №4. P. 466-472.

63. Yang J., Siao C.J., Nagappan G., Marinic T., Jing D., Mc Grath K., Chen Z.Y., Mark W., Tessarollo L., Lee F.S., Lu B., Hempstead B.L. Neuronal release of proBDNF // Nat Neurosci. 2009. V. 12, № 2. P. 113-115.

64. Zhao H., Alam A., San C.Y., Eguchi S., Chen Q., Lian Q., Ma D. Molecular mechanisms of brain-derived neurotrophic factor in neuro-protection: recent developments // Brain Res. 2017. № 1665. P. 1–21.

65. Zhao L., Mason N. A., Morrell N. W. et al. Sildenafil inhibits Hypoxiainduced pulmonary hypertension // Circulation. 2001. V. 104. № 4. P. 424-428. 66. Zovein A., Flowers-Ziegler J., Thamotharan S. et al. Postnatal hypoxicischemia brain injury alters mechanisms mediating neuronal glucose transport // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2004. № 286: R273–R282.

67. Абиева Э.Ш. Влияние гипоксии, перенесенной в период органогенеза на динамику активности сукцинатдегидрогеназы головного мозга крыс // Department of Biological Sciences of ANAS. 2015. V. 70, №1, P. 55-60.

68. Балыкин М. В., Антипов И. В., Каркобатов Х. Д. Системные и органные механизмы адаптации при физических нагрузках в горах // Патогенез. 2011. Т. 9, № 3. С. 17.

69. Балыкин М. В., Каркобатов Х. Д. Системные и органные механизмы кислородного обеспечения организма в условиях высокогорья // Рос. физиол. журнал. 2012. № 1. С. 127-136.

70. Белецкий И.П., Мошникова А.Б., Прусакова О.В. Пути передачи цитотоксического сигнала рецепторами семейства TNF-Rs // Биохимия 2002.
Т. 67, № 3. С. 377-95.

71. Белова А.Н., Шейко Г.Е., Клюев Е.А., Дунаев М.Г. Возможности магнитно-резонансной томографии головного мозга при детском церебральном параличе // Вопросы современной педиатрии. 2018. Т. 17, № 4. С. 272-278.

72. Бобылева О.В., Глазачев О. С. Динамика показателей вегетативной реактивности и устойчивости к острой дозированной гипоксии в курсе интервальной гипоксической тренировки // Физиол. человека. 2007. Т. 33. № 2. С. 199.

73. Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., 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.

74. Грек О. Р., Ефремов А. В., Шарапов В. А. Гипобарическая гипоксия и метаболизм ксенобиотиков. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 120 с.

75. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. Мозговой нейротрофический фактор и его низкомолекулярные миметики // Фармакокинетика и фармокодинамика. 2017. № 3. С. 3-11.

76. Гусейнов А.Г., Азимова А.М., Султанова М.С. Влияние пренатальной и постнатальной гипоксии на электрическую активность коры головного мозга // Национальный журнал неврологии. 2018. Т. 1, № 13. С. 45-49.

77. Дмитриева В.Г., Ставчанский В.В., Поварова О.В., Скворцова В.И., Лимборская С.А., Дергунова Л.В. Влияние ишемии на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в структурах мозга крыс вне очага повреждения, включая противоположное полушарие // Молекулярная биология. 2016. Т. 50, № 5. С. 775–784.

78. Ершова М.В., Иванова Е.О., Иллариошкин С.Н. Болезнь Паркинсона и нейротрофический гомеостаз // Актуальные вопросы неврологии. 2018. №1.
С. 3-9.

79. Ершова М.В., Иванова Е.О., Иллариошкин С.Н. Болезнь Паркинсона и нейротрофический гомеостаз // Медицина и здравоохранение. 2018. № 1. С. 3–9.

80. Захаров Ю.Н., Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Коротченко С.А., Калинцева Я.И., Потанина А.В., Мухина И.В. Флуоресцентный анализ паттернов метаболической активности нейрон-глиальной сети // Оптический журнал. 2012. Т. 79, № 6. С. 47–51.

Клюшников С.А., Вереютина И.А., Иллариошкин С.Н.
 Нейродегенеративные заболевания и регуляторные пептиды // Клинический опыт. 2017. №1. С. 41 – 46.

82. T.B., A.B. Кухарчик Ю.В., Русина Шишова И.В., Русина Интранатальная гипоксия при плацентарных нарушениях плода || Актуальные вопросы педиатрии. Сборник материалов межрегиональной научно-практической конференции с международным участием. 2018. С. 146-150.

83. Лукьянова Л.Д. Сигнальная роль митохондрий при адаптации к гипоксии // Фізіол. журн.. 2013. Т. 59, № 6. С. 141-154.

84. Маркелова Е.В., Зенина А.А., Кадыров Р.В. Нейропептиды как маркеры повреждения головного мозга // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 5. С. 1-13.

85. Митрошина Е.В., Ведунова М.В. Калинцева Я.И. Кальциевый имиджинг в клеточных культурах и тканях: Учебно-методическое пособие.-Нижний Новгород. 2011. С. 1–26.

86. Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Широкова О.М., Захаров Ю.Н, Калинцева Я.И., Мухина И.В. Оценка динамики функционального состояния диссоциированной культуры клеток гиппокампа in vitro // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. 2011. № 2. С. 283-286.

87. Мухина И.В., Казанцев В.Б., Хапеков Л.Г., Захаров Ю.Н., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Коротченко С.А., Корягина Е.А. Мультиэлектродные матрицы - новые возможности в исследовании пластичности нейрональной сети // Современные технологии в медицине. 2009. № 1. С. 8-15.

88. Острова И. В., Аврущенко М. Ш., Голубев А. М., Голубева Н. В.Р оль мозгового нейротрофического фактора BDNF и его рецептора TrkB в устойчивости нейронов гиппокампа к ишемии-реперфузии (экспериментальное исследование) // Общая реаниматология. Т. 14, № 6. С. 41 – 50.

89. Отеллин В.А., Хожай Л. И., Ватаева Л.А. Влияние гипоксии в раннем пренатальном онтогенезе на поведение и структурные характеристики головного мозга // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2012. Т. 48, № 5. С. 467-473.

90. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ватаева Л.А. Влияние гипоксии в раннем перинатальном онтогенезе на поведение и структурные характеристики головного мозга крыс // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2012. № 5. С. 467- 473.

91. Патофизиология: учебник: в 2-х томах / под ред. П. Ф. Литвицкого. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2015. Т. 1. 792 с.

92. Пимашкин А.С., Лебединский А.А., Семьянов А.В. Использование математических моделей для определения достоверности различий параметров в динамических биологических системах // Вестник ННГУ. Биология. 2010. № 2. С. 51–59

93. Попова Н.К., Ильчибаева Т.В., Науменко В.С. Нейротрофические факторы (BDNF, GDNF) и серотонинергическая система мозга // Биохимия. 2017, Т. 82, №. 3. С. 449 – 459.

94. Попова Н.К., Ильчибаева Т.В., Науменко В.С. Нейротрофические факторы (BDNF, GDNF) и серотонинергическая система мозга // Биохимия 2017. Т. 82, № 3. С. 449 – 459

95. Рудницкая Е.А., Колосова Н.Г., Стефанова Н.А. Нейротрофическое обеспечение головного мозга в онтогенезе и при развитии нейродегенеративных заболеваний // Физиология. 2016. Т.16, № 4. С. 72-82.

96. Салмина А.Б., Окунева О.С., Таранушенко Т.Е., Фурсов А.А., Прокопенко С.В., Михуткина С.В., Малиновская Н.А., Тагаева Г.А. Роль нейрон-астроглиальных взаимодействий в дизрегуляции энергетического метаболизма при ишемическом перинатальном поражении головного мозга // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2008. Т 2, №3. С. 44-51.

97. Сосин Д.В., Шалаева О.Е., Евсеев А.В., Шабанов П.Д. Механизмы формирования острой экзогенной гипоксии и возможности ее фармакологической коррекции антигипоксантами // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2015. Т. 13, № 1. С. 3-22.

98. Фоминова У.Н., Гурина О.И., Шепелева И.И., Попова Т.Н., Кекелидзе З.И., Чехонин В.П. Нейротрофический фактор головного мозга: структура и взаимодействие с рецепторами. // Российский психиатрический журнал. 2018. №4. С. 64-72.

101

99. Фрелих Г.А., Поломеева Н.Ю., Васильев А.С., Удут В.В. Современные методы оценки функционального состояния митохондрий // Сибирский медицинский журнал, 2013, Том 28, № 3

100. Хожай, Л.И. Распределение ГАМК-ергических нейронов в неокортексе у крыс в постнатальном периоде перинатальной гипоксии // Морфология. 2014. № 4. С. 7-10.

101. Шишкина, Т.В. Роль глиального нейротрофического фактора в функционировании нервной системы (обзор) // Современные технологии в медицине. 2015. Т. 7, № 4. С. 211 – 220.