Федеральное Государственное Бюджетное Образовательное

Учреждение Высшего Образования

«Санкт-Петербургский Государственный Университет»

На правах рукописи

Ветровой Олег Васильевич

РОЛЬ HIF1-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ В ОБЕСПЕЧЕНИИ РЕАКЦИЙ МОЗГА НА ГИПОКСИЮ

03.01.04 – Биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Ещенко Наталья Дмитриевна

Санкт-Петербург

2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Введение……5
1.01. Актуальность темы исследования……5
1.02. Степень разработанности темы исследования……6
1.03. Цель работы…...……..7
1.04. Методология и методы исследования……...8
1.05. Научная новизна……..9
1.06. Теоретическая и практическая значимость работы……..9
1.07. Основные положения, выносимые на защиту……10
1.08. Апробация результатов……11
1.09. Личное участие автора в получении результатов……...16
1.10. Структура и объем диссертации……..16
1.11. Финансовая поддержка и благодарности……16
2. Обзор литературы……18
2.01. История изучения гипоксии……18
2.02. Понятие о гипоксии и механизмах ее негативного действия на мозг……..19
2.03. Молекулярно-клеточные механизмы нейропротекции, индуцируемой умеренной гипобарической гипоксией……...23
2.04. Гипоксическое/ишемическое постконди ционирование……26
2.04.01. Нейропротективные механизмы, активируемые ишемическим постконди ционированием……...28
2.04.02. Неинвазивные способы постконди ционирования……...31
2.04.02.01. Гипоксическое постконди ционирование умеренной гипобарической гипоксией……..32
2.04.02.02. Механизмы нейропротективных эффектов нормобарического гипоксического постконди ционирования…….33
2.05. Предполагаемые эффекторы нейропротекции, индуцируемой гипоксическим постконди ционированием умеренной гипобарической гипоксией……...35
2.05.01. Гипоксия-индуцируемый фактор (HIF1)……..35
2.05.02. Цитокин эритропоэтин……..38
2.05.03. Bcl-2 и регуляция апоптоза, опосредуемого митохондриями……40
2.05.04. Нейротропный фактор мозга (BDNF)……...42
2.06. Пентозофосфатный путь как ключевой регулятор антиоксидантных функций…..46

3. Материалы и методы исследования……48
3.01. Материалы……48
3.02. Модель гипобарической гипоксии……48
3.02.01. Режим тяжелой повреждающей гипоксии……...49
3.02.02. Режим посткондиционирования умеренной гипобарической гипоксией…….50
3.02.03. Режим трехкратной умеренной гипобарической гипоксии……50
3.03. Постановка экспериментов с использованием ингибитора HIF1……51
3.04. Гистохимические методы……51
3.04.01. Гистологическая обработка ткани и изготовление парафинизированных срезов мозга……..51
3.04.02. Иммуногистохимический метод детекции белков……..52
3.04.02.01. Иммуногистохимическое окрашивание срезов мозга……52
3.04.02.02. Количественная обработка результатов иммуногистохимического окрашивания с использованием системы компьютерного анализа изображений……..54
3.04.03. Детекция апоптотических клеток методом TUNEL……55
3.05. Иммуноблоттинг……...56
3.05.01. Пробоподготовка……56
3.05.02. Определение концентрации белка по методу Бредфорда……...57
3.05.03. Электрофорез белков в ПААГ по методу Лэммли……...57
3.05.04. Электроперенос белков с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану……...58
3.05.05. Иммунодетекция белков на мембране……..58
3.06. Выделение и электрофоретический анализ фрагментации ДНК для определения интенсивности процессов клеточной гибели……...60
3.07. Спектрофотометрический метод определения содержания общего белка……..60
3.08. Определение активности Г6ФДГ……61
3.09. Определение количества НАДФН……...62
3.10. Экстракция цитозольной фракции из гиппокампа и неокортекса крыс……...63
3.11. Измерение содержания восстановленных тиоловых групп и общего глутатиона...63
3.11.01. Измерение содержания тиоловых групп……..64
3.11.02. Определение содержания общего глутатиона……65
3.12. Измерение количества продуктов перекисного окисления липидов……66
3.12.01. Анализ диеновых, триеновых конъюгатов и коэффициента Клейна……66
3.12.02. Измерение количества оснований Шиффа……...66
3.12.03. Определение количества фосфора общих фосфолипидов……..67
3.12.04. Определение количества ТБК-активных продуктов……...67

3.13. Количественный анализ транскрипции Г6ФДГ методом ПЦР в реальном времени….68
3.14. Статистическая обработка результатов……69
4. Результаты и обсуждение……70
4.01. Эффекты тяжелой гипоксии и тяжелой гипоксии в сочетании с посткондиционированием умеренной гипобарической гипоксией на гиппокамп и неокортекс крыс…….70
4.01.01. Анализ процессов клеточной гибели……70
4.01.01.01. Изучение динамики фрагментации ДНК…….70
4.01.01.02. Изучение количества TUNEL позитивных клеток…….71
4.01.02. Содержание проадаптивных белков Bcl-2 и BDNF…….73
4.01.03. Иммуногистохимический анализ содержания HIF1a и Г6ФДГ…….78
4.01.03.01. Содержание HIF1a в CA1 поле гиппокампа и втором слое неокортекса…..78
4.01.03.02. Содержание Г6ФДГ в CA1 поле гиппокампа и втором слое неокортекса…81
4.01.04. Анализ активности Г6ФДГ и количества НАДФН……..82
4.01.05. Анализ окислительно-восстановительного статуса и количества общего глутатиона……84
4.01.06. Определение интенсивности процессов перекисного окисления липидов…...87
4.02. Изучение роли HIF1 в реализации эффектов тяжелой гипоксии в гиппокампе крыс…….89
4.02.01. Количество TUNEL позитивных клеток в CA1 поле гиппокампа……..89
4.02.02. Содержание HIF1a, эритропоэтина и Г6ФДГ в CA1 поле гиппокампа……..91
4.02.03. Анализ активности Г6ФДГ и количества НАДФН……..96
4.02.04. Анализ окислительно-восстановительного статуса, количества общего глутатиона и оснований Шиффа…….97
4.03. Использование модели трехкратной умеренной гипобарической гипоксии для анализа роли HIF1 в регуляции транскрипции мРНК Г6ФДГ…….....99
5. Заключение……101
6. Выводы……...104
7. Список сокращений……...105
8. Список литературы……106

1. ВВЕДЕНИЕ

1.01. Актуальность темы исследования

Нарушение кислородного снабжения мозга рассматривается в настоящее время как ключевой фактор в развитии множества неврологических заболеваний. Тяжелые формы гипоксического стресса, такие как ишемический инсульт, представляют собой одну из самых распространенных причин смерти и снижения качества жизни. Поэтому поиск путей повышения устойчивости мозга к гипоксии/ишемии представляет собой одну из важнейших задач современной биологии и медицины. Основные подходы для решения этой задачи включают не только разработку новых лекарственных средств, но и использование немедикаментозных методов мобилизации эндогенных защитных механизмов (Самойлов и др., 2012). Особого внимания среди таких немедикаментозных методов заслуживает посткондиционирование (ПостК) - предъявление экстремальных воздействий умеренной интенсивности особям, пережившим тяжелое повреждающее воздействие (Zhao et al., 2003).

Настоящее исследование направлено на изучение механизмов нейропротективного действия гипоксического посткондиционирования, а также на расширение представлений о механизмах метаболических перстроек мозга, лежащих в основе патологических и адаптивных реакций на гипоксию и реоксигенацию. В фокусе нашего внимания была роль гипоксия-индуцируемого фактора-1 (HIF1) в регуляции пентозофосфатного пути (ПФП) метаболизма глюкозы – основного источника НАДФН в мозге. В связи с тем, что без НАДФН невозможно восстановление таких антиоксидантов как тиоредоксины и глутатион, ПФП представляет собой ключевой регулятор эффективности антиоксидантных систем мозга. Поскольку опосредованная гипоксией гибель нейронов осуществляется с участием активных форм кислорода (АФК), изучение вопроса о возможной взаимосвязи между гипоксией/реоксигенацией в различных режимах, ключевым регулятором клеточного ответа на гипоксию, HIF1, пентозофосфатным путем и опосредованными им функциями является крайне важным как для понимания эндогенных механизмов адаптации мозга, так и для разработки подходов к таргетной терапии постгипоксических состояний.

1.02. Степень разработанности темы исследования

Ранее в лаборатории регуляции функций нейронов мозга Института физиологии им. И.П.Павлова РАН был разработан неинвазивный способ коррекции последствий тяжелой повреждающей гипоксии мозга сеансами умеренной гипобарической гипоксии (УГГ) - воздействия на организм пониженным атмосферным давлением, приводящим к ослаблению кислородного снабжения (патент РФ №2437164.). В моделях на крысах показано, что посткондиционирование (ПостК) трехкратной УГГ эффективно предотвращает индуцируемую тяжелой гипоксией гибель нейронов гиппокампа и неокортекса, способствует функциональной реабилитации после тяжелой гипобарической гипоксии (ТГ) или психоэмоциональных стрессов, нормализуя активность гипоталамо-гипофизарно адренокортикальной системы и поведение у крыс (Rybnikova et al., 2012). При этом в отличие от ишемических моделей (Gao et al., 2008), нейропротекция наблюдается даже в тех случаях, когда посткондиционирование производится в отдаленный период после повреждающего воздействия (1-3 дня). Однако, помимо описательных данных, информации о конкретных механизмах реализации протективного действия ПостК УГГ на сегодняшний день недостаточно.

Роль ключевого регулятора адаптации к гипоксии отводится гипоксия-индуцируемому фактору-1 (HIF1), в связи с чем в мировой литературе активно обсуждается возможность фармакологической активации HIF1 с целью терапии, в частности, постинсультных состояний. Однако, патогенез относительно непродолжительных острых форм гипоксии/ишемии в первую очередь реализуется в период реоксигенации (Nita et al., 2001), когда неконтролируемая активация данного фактора транскрипции на фоне дефицита активности киназ, ответственных за обеспечение правильного патттерна пост-трансляционных модификаций HIF1 (Chen et al., 2003, Vetrovoy et al., 2015), потенциально способна оказывать дезадаптивный эффект, что может вносить неблагоприятный вклад в формирование постгипоксических патологий (Sun Y. et al., 2017). Поэтому вопрос о конкретной роли HIF1 в реализации эффектов тяжелых форм гипоксии также остается открытым.

1.03. Цель работы

Целью данной работы было изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе нейропротективного действия гипоксического посткондиционирования при компенсации последствий тяжелой гипоксии мозга крыс, и оценить роль HIF1 в реализации эффектов тяжелой гипоксии.

Задачи:

1. Исследовать влияние гипоксического посткондиционирования на развитие процессов клеточной гибели в гиппокампе и неокортексе крыс, переживших тяжелую гипоксию.
2. Провести сравнительный анализ содержания нейропротективных белков Bcl-2 и BDNF в гиппокампе и неокортексе крыс, переживших тяжелую гипоксию и тяжелую гипоксию в сочетании с гипоксическим посткондиционированием.
3. Сравнить эффекты тяжелой гипоксии и гипоксического посткондиционирования на активность пентозофосфатного пути и связанные с пентозофосфатным путем процессы регуляции окислительно-восстановительного статуса и свободнорадикального окисления в гиппокампе и неокортексе крыс.
4. Изучить роль HIF1 в реализации процессов клеточной гибели в гиппокампе крыс, переживших тяжелую гипоксию.
5. Определить влияние HIF1 на активность пентозофосфатного пути и связанные с пентозофосфатным путем процессы регуляции окислительно-восстановительного статуса и свободнорадикального окисления в гиппокампе крыс, переживших тяжелую гипоксию.
6. В модели трехкратной умеренной гипобарической гипоксии проанализировать взаимосвязь между активностью HIF1 и транскрипцией ключевого фермента пентозофосфатного пути, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы.

1.04. Методология и методы исследования

Исследование молекулярных механизмов адаптивных и патологических реакций мозга на гипоксию и реоксигенацию проведено с использованием разработанной в лаборатории регуляции функций нейронов мозга Института физиологии им. И.П.Павлова РАН модели гипобарической гипоксии in vivo на взрослых самцах крыс линии Wistar весом 200-250г в трех режимах: тяжелая повреждающая гипоксия, тяжелая гипоксия в сочетании с посткондиционированием трехкратной умеренной гипобарической гипоксией, а также трехкратная умеренная гипобарическая гипоксия.

Решение поставленных задач требовало применения ряда гистохимических, биохимических и молекулярно-биологических методов. Для проверки гипотезы о HIF1-зависимой регуляции экспрессии мРНК глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г6ФДГ), ключевого фермента пентозофосфатного пути, использовали HIF1-позитивную модель трехкратной умеренной гипобарической гипоксии (Samoilov et al., 2015) с последующим анализом количества мРНК Г6ФДГ, нормированной на количество мРНК актина-бета, методом ПЦР в реальном времени. Для оценки количества и локализации белков интереса (Bcl-2, BDNF, HIF1a, эритропоэтина, Г6ФДГ) был применен непрямой ABC иммуногистохимический метод, а для проверки качества антител - метод иммуноблоттинг. Для оценки активности Г6ФДГ и измерения количества продукта ПФП, НАДФН, в гиппокампе и неокортексе крыс были использованы коммерческие наборы для энзиматического колориметрического анализа в 96-луночных планшетах (Sigma Ald.). Для определения интенсивности процессов свободнорадикального окисления производили измерения концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), а именно диеновых коньюгатов, триеновых коньюгатов, коэффициента Клейна, ТБК-активных продуктов, основным представителем которых является малоновый диальдегид (МДА), спектрофотометрическими методами и оснований Шиффа, маркеров взаимодействия МДА с белками, флуориметрическим методом. Количество восстановленных тиоловых групп, свидетельствующее об общем окислительно-восстановительном статусе, определяли при помощи красителя дитионитробензола колориметрическим методом. Количество общего глутатиона измеряли энзиматическим колориметрическим методом с применением глутатион редуктазы дрожжей и красителя дитионитробензола. Для выявления интенсивности процессов апоптотической клеточной гибели выделяли ДНК из клеток гиппокампа и производили анализ наличия фрагментации методом электрофореза, а также использовали гистохимический TUNEL метод для подсчета апоптотических клеток. С

целью оценки вклада HIF1 в изучаемые процессы был использован ингибитор HIF1, топотекан, вводимый внутрибрюшинно за 10 минут до гипоксического сеанса.

1.05. Научная новизна

В результате проведенных исследований с применением модели умеренной гипобарической гипоксии (УГГ) in vivo в гиппокампе крыс впервые показана обратная связь между активностью HIF1 и транскрипцией Г6ФДГ – первого скорость-лимитирующего фермента пентозофосфатного пути (ПФП).

Впервые установлено, что тяжелая гипоксия (ТГ) и последующая реоксигенация, вызывающие краткосрочную гиперэкспрессию регуляторной альфа субъединицы HIF1 (HIF1a) в СА1 поле гиппокампа, индуцирует снижение количества и активности Г6ФДГ, а также количества НАДФН, что сопровождается окислительным стрессом и запуском процессов апоптотической клеточной гибели.

Приорететными являются результаты, доказывающие, что воздействие на крыс, переживших ТГ, УГГ в режиме ПостК либо инъекция ингибитора HIF1 топотекана непосредственно перед ТГ предотвращают отсроченное уменьшение количества и активности Г6ФДГ, увеличивая уровень НАДФН, что сопровождается нормализацией окислительно-восстановительного статуса и снижением свободнорадикального окисления в гиппокампе, а также предотвращением апоптотических процессов.

1.06. Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные расширяют современные представления о молекулярно-биологических процессах, приводящих к развитию постгипоксических патологий, и способствуют пониманию механизмов антиапоптотического и антиоксидантного действия гипоксического посткондиционирования.

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные нами результаты могут лечь в основу разработки нейропротективных стратегий при лечении инсультов и других патологий, вызванных кислородной недостаточностью.

1.07. Основные положения, выносимые на защиту

1. Посткондиционирование умеренной гипобарической гипоксией оказывает выраженное нейропротективное действие, предотвращая развитие вызванных тяжелой гипоксией апоптотических процессов и способствуя увеличению содержания противоапоптотического белка Bcl-2 и нейротрофина BDNF в гиппокампе и неокортексе.
2. Нарушение функционирования пентозофосфатного пути метаболизма глюкозы вносит существенный вклад в развитие индуцируемого тяжелой гипоксией окислительного стресса. Посткондиционирование умеренной гипобарической гипоксией способствует нормализации активности пентозофосфатного пути, предотвращая развитие состояния окислительного стресса и снижая интенсивность процессов свободнорадикального окисления в гиппокампе.
3. Ингибирование HIF1 перед тяжелой гипоксией способствует предотвращению развития состояния окислительного стресса и процессов клеточной гибели, что сопровождается увеличением эффективности пентозофосфатного пути в гиппокампе.
4. Транскрипционный фактор HIF1 выполняет функцию отрицательного регулятора экспрессии гена ключевого фермента пентозофосфатного пути, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы. Трехкратная умеренная гипобарическая гипоксия вызывает увеличение транскрипции мРНК глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы в гиппокампе.

1.08. Апробация результатов

Результаты получены с помощью современных биохимических и молекулярно-биологических методов. Объем выборок и число независимых экспериментов позволили оценить значимость результатов после обработки с помощью адекватных методов статистического анализа. Результаты работы были представлены на следующих конференциях:

1) 16я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология - наука XXI века", г. Пущино, 16-21.04.2012;

2) Всероссийская конференция молодых ученых «Актуальные вопросы биологии и химии», г. Пущино, 30.07-3.08.2012

3) 17я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология - наука XXI века ", г. Пущино, 22-26.04.2013

4) III Научно-практическая конференция молодых ученых РАН «Фундаментальная и прикладная наука глазами молодых ученых. Успехи, перспективы, проблемы и пути их решения», г. Санкт-Петербург, 5-7.06.13

5) XXII съезд физиологического общества им. И.П. Павлова, г. Волгоград, 16-20.09.2013

6) XVII научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, г. Москва, 21-23.10.13

7) Международный симпозиум «Биохимия – основа наук о жизни», г. Казань, 21-23.11.13

8) Всероссийская медико-биологическая научная конференция молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина», г. Санкт-Петербург, 19.04.2014

9) 18я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых "биология - наука XXI века", г. Пущино, 21-26.04.2014

10) Всероссийская конференция с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга», г. Санкт-Петербург, 24-26.06.2014

11) Международная конференция молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика», г.Пущино, 27-29.10.2014

12) XVIII научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, г.Москва, 28-29.10.2014

13) Всероссийская медико-биологическая научная конференция молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина», г. Санкт-Петербург, 18.04.2015

14) 19я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых "биология - наука XXI века", г. Пущино, 20-24.04.2015

15) Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов - 2015», г.Москва, 13-17.04.2015

16) ESN Conference on Molecular Mechanisms of Regulation in the Nervous System, Tartu, Estonia, 14-17.06.15

17) IX Всероссийская конференция «Нейроэндокринология – 2015», г.Санкт-Петербург, 27-29.10.15

18) Международная конференция молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика», г.Пущино, 2-3.11.2015

19) Международная научная конференция Научного Парка СПбГУ «трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину», г.Санкт-Петербург, 10-12.11.2015.

20) Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем», г.Санкт-Петербург, 8-10.12.2015

21) Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов - 2016», г.Москва, 11-15.04.2016

22) 20я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология - наука XXI века", г. Пущино, 22.04.2016

243) Международная медико-биологическая научная конференция молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина», г. Санкт-Петербург, 23.04.2016

24) IX Научно-практическая конференция. Проблемы изучения резистентности организма к действию экстремальных факторов внешней среды, г. Санкт-Петербург, 27.05.2016.

25) FENS Forum of Neuroscience, Copenhagen, Denmark, 2-6.07.2016

26) XV Всероссийское совещание с международным участием и VIII школа по эволюционной физиологии, г. Санкт-Петербург, 17-22.10.2016

27) Всероссийская конференция с международным участием «окислительный стресс в психиатрии и неврологии», г. Санкт-Петербург, 20-21.10.2016

28) XX Школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, г. Москва, 31.10-1.11.2016

29) Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов - 2017», г.Москва, 10-15.04.2017

30) 21я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология - наука XXI века", г. Пущино, 16-21.04.2017

31) Санкт-Петербургский научный форум, посвященный 100-летию Физиологического общества им. И.П. Павлова. г. Санкт-Петербург, 17–19.04.2017

32) XX Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей "фундаментальная наука и клиническая медицина. человек и его здоровье". г. Санкт-Петербург, 22.04.2017

33) International Symposium on Metabolic and redox interactions between neurons and astrocytes in health and disease. Salamanca, Spain, 26-28.06.2017

34) ISN-ESN Meeting, Paris, France, 20-24.08.2017

35) 23й съезд физиологического общества имени И.П.Павлова, г.Воронеж, 18-22.09.2017

36) Всероссийский симпозиум с международным участием «Стресс: физиологические эффекты, патологические последствия и способы их предотвращения» (Посвящается памяти профессора А.А. Филаретова). г. Санкт-Петербург, 10–12.10.2017

37) XXI Школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, г. Москва, 30.10-31.10.201

Публикации

По теме диссертации опубликовано 67 работ, из них 10 статей в рецензируемых журналах, 7 из которых – статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, 50 тезисов конференций.

Список статей в рецензируемых журналах:

1) О.В. Ветровой, Е.А. Рыбникова, Т.С. Глущенко, К.А. Баранова, М.О. Самойлов «Умеренная гипобарическая гипоксия в режиме посткондиционирования повышает

экспрессию HIF-1a и эритропоэтина в CA1 поле гиппокампа крыс, переживших тяжелую гипоксию», Нейрохимия, том 31, номер 2, 2014, стр. 134-139.

(переводная версия: O. V. Vetrovoy, E. A. Rybnikova, T. S. Glushchenko, K. A. Baranova, M. O. Samoilov "Mild Hypobaric Hypoxic Postconditioning Increases the Expression of HIF1α and Erythropoietin in the CA1 Field of the Hippocampus of Rats That Survive after Severe Hypoxia," Neurochemical Journal, vol. 8, no. 2, 2014, pp. 103-108. (DOI: 10.1134/S1819712414020123; IF 0,303)).

2) О.В. Ветровой, Е.А. Рыбникова, Т.С. Глущенко, М.О. Самойлов «Влияние гипоксического посткондиционирования на экспрессию противоапоптотического белка Bcl-2 и нейротрофина BDNF в CA1 поле гиппокампа крыс, переживших тяжелую гипоксию», Морфология, том 145, номер 2, 2014, стр. 16-20.

(переводная версия: O. V. Vetrovoi, E. A. Rybnikova, T. S. Glushchenko, M. O. Samoilov "Effects of Hypoxic Postconditioning on the Expression of Antiapoptotic Protein Bcl-2 and Neurotrophin BDNF in Hippocampal Field CA1 in Rats Subjected to Severe Hypoxia," Neuroscience and Behavioral Physiology, vol. 45, no. 4, 2015, pp. 367-370. (DOI: 10.1007/s11055-015-0083-y)).

3) Е.А.Рыбникова, К.А.Баранова, Т.С.Глущенко, О.В.Ветровой, М.В.Сидорова. «Участие транскрипционного фактора HIF-1 в нейрональных механизмах адаптации к психоэмоциональному и гипоксическому стрессу». Фізіологічний журнал НАН Украіни,том 59, номер 6, 2013, стр. 88-97.

(переводная версия: E.A. Rybnikova, K.A. Baranova, T.S. Gluschenko, O.V. Vetrovoy, M.A. Sidorova,V.I. Portnichenko "Role of HIF-1 in Neuronal Mechanisms of Adaptation to Psychoemotional and Hypoxic Stress," International Journal of Physiology and Pathophysiology, vol. 6, no. 1, 2015, pp. 1-11. (DOI: 10.1615/IntJPhysPathophys.v6.i1.10)).

4) К.А.Баранова, Е.А.Рыбникова, А.В.Чурилова, О.В.Ветровой, М.О.Самойлов. «Проадаптивная роль нейрональных транскрипционных факторов CREB и NF-κB в моделях постстрессовых психопатологий на крысах», Нейрохимия, том 31, номер 1, 2014, стр. 23-30.

(переводная версия: K. A. Baranova, E. A. Rybnikova, A. V. Churilova, O. V. Vetrovoy, M. O. Samoilov., "The Adaptive Role of the CREB and NFκB Neuronal Transcription Factors in Post_Stress Psychopathology Models in Rats," Neurochemical Journal, vol. 8, no. 1, 2014, pp. 17-23. (DOI: 10.1134/S1819712414010048; IF 0,303)).

5) Е.И.Тюлькова, Л.И.Ватаева, О.В.Ветровой. «Пренатальная гипоксия модифицирует рабочую память и активность полифосфоинозитидной системы гиппокампа крыс», Журнал эволюционной физиологии и биохимии, том 51, номер 2, 2015, стр. 115-121.

(переводная версия: E.I. Tyulkova, L.A. Vataeva, O.V. Vetrovoi, and D.Yu. Romanovsky, "Prenatal hypoxia modifies working memory and the activity of hippocampal polyphosphoinositide system in rats," Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, vol. 51, no. 2, 2015, pp. 131-138. (DOI: 10.1134/S0022093015020064; IF 0,371)).

6) О.В. Ветровой, Е.А. Рыбникова, Т.С. Глущенко, М.О. Самойлов. «Влияние различных режимов гипобарической гипоксии на экспрессию маркера нейрогенеза NeuroD2 в зубчатой извилине гиппокампа крыс», Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, том 160, номер 10, 2015.

(переводная версия: O. V. Vetrovoy, E. A. Rybnikova, T. S. Glushenko, M. O. Samoilov "Effect of a various modes of hypobaric hypoxia on the neurogenesis marker NeuroD2 expression in a dentate gyrus of a rat's hippocampus" Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 160 (4), pp. 510-513, 2016 (IF 0,366)).

7) M. Samoilov, A. Churilova, T. Gluschenko, O. Vetrovoy, N. Dyuzhikova and E. Rybnikova "Acetylation of histones in neocortex and hippocampus of rats exposed to different modes of hypobaric hypoxia: implications for brain hypoxic injury and tolerance," Acta Histochemica, 118, no. 2, 2016, pp. 80-89. (DOI: 10.1016/j.acthis.2015.11.008; IF 1,714).

8) O. Vetrovoy, E. Tulkova, K. Sarieva, E. Kotryahova, M. Zenko, E. Rybnikova "Neuroprotective effect of hypobaric hypoxic postconditioning is accompanied by dna protection and lipid peroxidation changes in rat hippocampus", Neuroscience Letters, vol. 639, 2017, pp. 49–52. (IF 2,23).

9) О.В. Ветровой, Е.А. Рыбникова, М.О. Самойлов. «Церебральные механизмы гипоксического/ишемического посткондиционирования», Биохимия, том 82, номер 3, стр. 542-551, 2017 (IF 1,421).

(переводная версия: O. V. Vetrovoy, E. A. Rybnikova, M. O. Samoilov "Cerebral mechanisms of hypoxic/ischemic postconditioning" Biochemistry (Moscow), 82 (3), pp. 392-400, 2017 (IF 1,421)).

10) Е. И. Тюлькова, О. В. Ветровой, К. В. Сариева, Л. А. Ватаева, Т. С. Глущенко. Особенности ацетилирования гистона H3 по Lys24 в гиппокампе и неокортексе крыс,

переживших гипоксический стресс в различные сроки пренатального развития, Нейрохимия, том 34, номер 4, 2017, стр. 310-316 (IF 0,642).

(переводная версия: E. I. Tyulkova, O. V. Vetrovoy, K. V. Sarieva, L. A. Vataeva, and T. S. Glushchenko "The Characteristics of Acetylation of Histone H3 at Lys24 in the Hippocampus and Neocortex of Rats That Were Exposed to Hypoxic Stress at Different Stages of Prenatal Development" Neurochemical Journal, vol. 34, no 4, 2017, pp. 310-316 (IF 0,340)).

1.09. Личное участие автора в получении результатов

Личный вклад автора состоял в анализе литературы по проблеме исследования, разработке гипотезы, планировании экспериментов и их выполнении, статистической обработке полученных результатов, обсуждении результатов, подготовке публикаций по теме диссертации. Участие автора в анализе литературы – 90%, статистической обработке результатов – 80%, подготовке статей и тезисов докладов – 95%, написании диссертации и автореферата – 95-100%.

1.10. Структура и объем диссертации

Диссертация построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение» «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», включающий 154 источников, из них 22 – отечественных. Диссертация изложена на 118 страницах. Результаты и обсуждение представлены на одной таблице и иллюстрированы 34 рисунками.

1.11. Финансовая поддержка и благодарности

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 13-04-00532, 16-04-00987, 16-34-00027.

В первую очередь автор выражает свою благодарность своему научному руководителю (Ещенко Н.Д.) и научным наставникам (Рыбникова Е.А., Тюлькова Е.И.) за неоценимый вклад в осуществление данной работы, конструктивные дискуссии и концептуальный анализ полученных результатов, а также за бесценные своветы по улучшению диссертации.

Также хотелось бы поблагодарить сотрудников лаборатории регуляции функций нейронов мозга Института Физиологии им. И.П. Павлова РАН, совместно с которыми были проведены эксперименты на животных (Аксеновой Е.В., Зенько М.Ю.), иммуногистохимические эксперименты (Глущенко Т.С.), анализ продуктов перекисного окисления липидов (Тюлькова Е.И.), сотрудников кафедры биохимии и ресурсного центра «Обсерватория экологической безопасности» Санкт-Петербургского Государственного Университета, совместно с которыми были проведены работы по анализу фрагментации ДНК (Прияткина Т.Н.), проанализирован ряд метаболитов и энзиматических активностей (Галкина О.В., Зорина И.И.), и произведен статистический анализ (Лянгузов А.Ю.).

Автор хотел бы выразить особую благодарность сотруднице Института цитологии РАН Ломерт Е.В., благодаря которой был осуществлен транскрипционный анализ методом ПЦР в реальном времени, и студентке бакалавриата Биологического факультета Санкт-Петербургского Государственного Университета Сариевой К.В., внесшей значительный вклад в реализацию исследования на всех его этапах.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Гипоксия – патологическое или физиологическое состояние, связанное с недостаточностью снабжения тканей кислородом. Хорошо известно, что тяжелые формы гипоксии подавляют процессы нейропластичности, вызывают нарушения обучения и памяти и оказывают деструктивный эффект на нейроны уязвимых структур мозга, в наибольшей степени гиппокампа (Kumar et al., 2016). Вместе с тем, умеренные формы гипоксии оказывают противоположный эффект, и это свойство используется для разработки превентивных способов повышения устойчивости мозга к гипоксии (интервальные гипоксические тренировки, гипоксическое и ишемическое прекондиционирование) или реабилитации после уже перенесенных повреждающих воздействий (раннее, отсроченное и дистантное ишемическое посткондиционирование, нормобарическое и гипобарическое гипоксическое посткондиционирование). Ниже будет представлена краткий обзор основных исторических вех изучения гипоксии, изложены накопленные к настоящему времени сведения о церебральных механизмах повреждающей гипоксии мозга и протективных эффектах различных видов ишемического и гипоксического посткондиционирования, а также приведены аргументы, свидетельствующие о том, что наиболее перспективными с точки зрения дальнейшего внедрения в медицинскую практику следует признать неинвазивные способы гипоксического ПостК.

2.01. История изучения гипоксии

История изучения гипоксии насчитывает тысячелетия. Еще Гиппократ первым в античной культуре Европы дал описание транзиторной ишемической атаки в каротидном бассейне: "Необычные атаки оцепенения и анестезии являются знаками грозящей апоплексии". Гиппократом описаны также паралич и нарушения чувствительности в конечностях на стороне, противоположной травме мозга. Много позже, в 17 веке, подобное описание дал Гален. Интенсивно заниматься изучением проблемы эффектов гипоксии на организм стали только в 19 веке.

Большая заслуга в изучении гипоксии принадлежит представителям русской медицинской школы. Я.Д.Захаров в 1804 году по заданию Академии наук поднимался на воздушном шаре с целью изучения влияния разряженной атмосферы на орган слуха (Захаров, 1991). В 1865 году З. Сабинский в экспериментах на животных показал, что селезенка, являющаяся депо крови, рефлекторно сокращается при остром кислородном

голодании (гипоксии). В 70-х годах 19 века физиолог Н. Соковнин впервые исследовал влияние гипоксии на пищеварение. Н. Строганов в 1876 году опубликовал работу о действии острого кислородного голодания на животный организм.

Толчком для дальнейшего изучения гипоксии было освоение неба,космоса и водных глубин. На базе авиационной медицины исследовались научно-практические аспекты гипоксии применительно к условиям полетов на самолете и стратостате (высотная устойчивость человека и способы ее повышения, моделирование гипоксии на Земле, влияние гипоксии на работоспособность, средства защиты от гипоксии, использование гипоксии в экспертизе, адаптации, профилактике и лечении). Результаты этих исследований позже были широко использованы при создании средств жизнеобеспечения животных в полетах на ракетах в верхние слои атмосферы и при создании обитаемых отсеков космических кораблей и скафандров космонавтов. Основной фундамент для этих исследований был заложен И.М. Сеченовым и Д.И. Менделеевым (Сеченов, 1907). Большая заслуга в изучении патогенеза кислородного голодания на высоте принадлежит В.В. Пашутину, П.М. Альбицкому, Е.А Карташевскому, Л.А. Орбели, М.П. Бресткину, Н.Н. Сиротинину, И.Р. Петрову, Г.Е. Владимирову, А.Г. Кузнецову и др (Владимиров, 1939, Стредьцов, 1940, Сиротинин, 1955, 1960, 1966, 1968).

2.02. Понятие о гипоксии и механизмах ее негативного действия на мозг

Гипоксия - состояние кислородного голодания как всего организма, так и отдельных органов, и тканей. Организм может оказаться в состоянии гипоксии в результате действия внешних факторов, в частности при повышенных физических нагрузках, в условиях высокогорья, в космосе, при нахождении в непроветриваемом помещении. Также возможны случаи гипоксии как результата внутренних неблагоприятных событий, например, при закупорке/ишемии кровеносных сосудов, анемиях, легочных заболеваниях. Гипоксия является важным компонентом патогенеза многих заболеваний.

Выделяют следующие виды гипоксии (Ван Лир и др., 1967):

1. Гипоксическая гипоксия (гипоксемия). Основной признак - низкое парциальное давление кислорода в артериальной крови и, как следствие, понижение содержания кислорода во всем организме.

2. Анемическая гипоксия (гемическая) – гипоксия, возникающая в условиях недостатка гемоглобина и/или эритроцитов при нормальном напряжении кислорода в артериальной крови.

3. Застойная гипоксия (циркуляторная), при которой в артериальной крови имеется достаточное количество гемоглобина и нормальное напряжение кислорода, но количество поступающей в ткани крови не обеспечивает кислородный «запрос», например, по причине закупорки или разрыва сосудов.

4. Гистотоксическая гипоксия (гипоксидоз) – возникает вследствие нарушения функции ферментов дыхательной цепи, и потому поступающий к тканям кислород не может использоваться в процессах окисления.

Для всех форм гипоксии имеется одно сходство - дефицит доставки кислорода, приводящий к развитию необратимых изменений в жизненно важных органах. К наиболее распространенным заболеваниям, связанным с гипоксическим состоянием, относятся ишемическая болезнь сердца и инсульт головного мозга, являющийся третьей по распространенности причиной смерти среди всех заболеваний после инфаркта миокарда и онкологических заболеваний.

Ишемия представляет собой частный случай циркуляторной гипоксии, при котором частично или полностью прекращается поступление крови в определенный участок ткани или органа. Принципиальное различие в ответе организма на неишемическую и ишемическую гипоксию заключается в том, что в первом случае сохраняются или значительно возрастают кровоток, снабжение ткани субстратами и удаление продуктов окислительного метаболизма. При неишемической гипоксии убыль высокоэнергетических соединений, ацидоз и другие нарушения метаболизма нарастают не столь стремительно, как при ишемии.

В результате гипоксии/ишемии головного мозга в случаях инсульта у пациентов фиксируются нарушения двигательных, чувствительных и визуальных рефлексов, а также может наблюдаться афазия и апатия. После ишемии (в период реоксигенации) могут возникать нейрофизиологические расстройства, такие как снижение интеллекта, апраксия, ухудшение пространственной ориентации и снижение памяти (Bokura et al., 1997). Гипоксия/ишемия головного мозга может быть не только результатом инсульта, но и следствием других повреждающих воздействий, в частности, остановки сердца, эмболии сосудов головного мозга или ярко выраженной гипотонии, особенно во время хирургических операций. Кроме того, гипоксия мозга может возникать в результате

действия внешних повреждающих факторов, например, гипобарической гипоксии (разгерметизация самолета, пребывание в условиях высокогорья). Независимо от причины церебральной гипоксии в результате всегда развивается известная как «ишемический каскад» цепочка патобиохимических изменений, приводящая к повреждению нервной ткани и гибели нейронов мозга по типу некроза или апоптоза, стойким нарушениям нейрональной пластичности, в частности подавлению активности адаптивных факторов транскрипции и, как следствие, нарушения экспрессии протективных белков (Федин, 2004, Rybnikova et al., 2015).

Начальным этапом в запуске гипоксического/ишемического каскада является снижение количества кислорода, поступающего в мозг, что неизбежно ведет к дефициту макроэргических соединений. Снижение скорости аэробного окисления в митохондриях приводит к уменьшению запасов АТФ и возрастанию содержания АДФ и АМФ. При низком соотношении АТФ/АДФ+АМФ активируется фермент фосфофруктокиназа, что позволяет резко увеличить скорость реакций анаэробного гликолиза, которые имеют низкую энергетическую эффективность и протекают с накоплением лактата (Федин, 2004). На ранних этапах еще может идти адаптация к гипоксии и стабилизация энергообмена, так как лактат образуется благодаря НАДН-зависимому восстановлению пирувата, а удаление излишков НАДН способствует поддержанию процессивности гликолиза. Кроме того, для лактата показана важная роль в обеспечении защиты от глутаматной эксайтотоксичности посредством модулирования активности глутаматных NMDA рецепторов (Jourdain et al., 2015). Однако такая стабилизация обычно бывает недолгой и сопровождается достаточно быстрым истощением запасов гликогена (Федин, 2004, Гусев и др., 1996). Из-за избытка митохондриального НАДН, в связи с отсутствием терминального окислителя не имеющего возможности передать электроны на создание протонного градиента, происходит подавление активности ферментов цитратного цикла и отток альфа-кетоглутарата на синтез глутамата - основного возбуждающего медиатора ЦНС. Увеличение количества лактата, продуцируемого в результате гликолиза, провоцирует внутриклеточный ацидоз. Прогрессирующее закисление вызывает денатурацию некоторых белков.

На этой стадии гипоксии в клетке формируется истинный дефицит АТФ, поскольку аэробный механизм не работает из-за нехватки кислорода, а анаэробный — из-за ацидоза (Федин, 2004). Нехватка АТФ неизбежно сказывается на наиболее энергозатратном ферменте нейронов, Na^+/K^+ АТФазе, приводя к снижению его активности, что в свою очередь проявляется в потере способности поддержания градиента калия и натрия на мембранах нейронов. Важнейшим из прямых последствий снижения активности Na^+/K^+

насоса является проникновение в клетку избытка натрия, вызывающего гипергидратацию и церебральный отек. Чрезмерное поступление натрия в нейроны приводит также к деполяризации мембран, входу Ca^{2+} и Ca^{2+}-зависимому выбросу глутамата из пресинапса с развитием глутаматной эксайтотоксичности в постсинапсе.

Глутамат служит основным возбуждающим медиатором центральной нервной системы, участвует в осуществлении когнитивных функций, наряду с ацетилхолином поддерживает уровень бодрствования, но в высоких концентрациях токсичен для нейронов. Эксайтоксический эффект глутамата обусловлен не только резким и значительным выбросом глутамата, но и нарушением механизмов его обратного захвата (Benveniste et al., 1984*)*. Если на ранних сроках ишемии произвести реперфузию, то концентрация глутамата вернется к нормальным значениям.

Глутамат реализует свои эффекты через группу ионотропных мембранных рецепторов: NMDA, AMPA, каинатных рецепторов, а также через метаботропные рецепторы (mGluR). Возбуждение глутаматных NMDA-рецепторов на фоне связанной с дефицитом АТФ деполяризации клеточных мембран вызывает усиленное поступление в клетку внеклеточного Ca^{2+}, активация mGluR - высвобождение внутриклеточного Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (Hartley et al., 1993*)*. В умеренных концентрациях Ca^{2+} выступает в роли ключевого внутриклеточного модулятора синаптической пластичности, в частности за счет изменения количества рецепторов на мембранах, активации киназ, регулирующих рост отростков и формирования новых синапсов, однако его избыточное накопление в цитозоле приводит к модификации активности ряда ферментов (протеиназ, фосфолипаз, NO-синтазы и тд.), которые в конечном счете опосредуют повреждение мембран, ядер и других клеточных органелл (Kristian et al., 1998).

Данный этап «ишемического каскада» сопровождается генерацией активных форм кислорода. Как известно, головной мозг является органом, наиболее чувствительным и предрасположенным к индукции свободнорадикальных процессов, особенно на фоне ишемии. Это связано с высоким содержанием в тканях мозга полиненасыщенных жирных кислот, малым количеством витамина А, крайне низкой активностью глутатионпероксидазы, практически полным отсутствием каталазы, высоким содержанием ионов двухвалентного железа и низким содержанием трансферрина и церулоплазмина *(*Siesjo et al., 1989). Эта стадия развития «ишемического каскада» уже необратима и не может быть скорректирована восстановлением притока кислорода.

Далее возникают «отдаленные» последствия гипоксии, такие как реакции местного воспаления, микроваскулярные нарушения, повреждение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и др. Нарушения ГЭБ присутствуют с первых минут острой фокальной ишемии, однако наиболее выраженными они становятся через несколько часов. Воспалительные реакции характеризуются миграцией нейтрофилов из сосудов в ткань, активацией микроглиальных клеток и секрецией ими потенциально цитотоксичных соединений, таких как провоспалительные цитокины IL-1β и TNF-α. Введение противовоспалительных цитокинов или веществ, уменьшающих синтез провоспалительных цитокинов, значительно снижает степень повреждения нейронов после ишемии *(*Block et al., 1996). Таким образом, воспалительные реакции вовлечены в патогенез постгипоксических состояний и способствуют нейрональной гибели.

Характерным последствием тяжелых форм гипоксии мозга является запуск программы отсроченной клеточной гибели по типу апоптоза. Апоптотические изменения можно наблюдать в CA1 поле гиппокампа и неокортексе через 3-4-дня после транзиторной глобальной церебральной ишемии *(*Nitatori et al., 1993). Применение ингибиторов белкового синтеза или ростовых факторов, противодействующих апоптозу и способствующих нормализации адекватной сигнальной трансдукции мозга, снижает уровень ишемического поражения (Goto et al., 1990).

Таким образом, молекулярно-биологические нарушения, вызванные гипоксией/ишемией мозга, имеют крайне неблагоприятные последствия для организма. Введение антиоксидантов или препаратов, стимулирующих экспрессию ростовых факторов, стабилизирующих ионные градиенты, хотя и способно в некоторой степени облегчить последствия гипоксии, но все же оказывается недостаточным для того, чтобы обеспечить комплексную нейропротекцию от гипоксии и ишемии во время острого инсульта, поскольку оказывает эффект только на какой-то отдельный этап патологического каскада *(*Fisher et al.,2005).

2.03. Молекулярно-клеточные механизмы нейропротекции, индуцируемой умеренной гипобарической гипоксией

В результате исследований, проводимых в лаборатории регуляции функций нейронов мозга, Института физиологии имени И.П.Павлова РАН на протяжении последних трех десятилетий, были выявлены множественные протективные эффекты трехкратной умеренной гипобарической гипоксии в режиме прекондиционирования.

Гипобарическая гипоксия — сочетанное воздействие на организм пониженного атмосферного давления и кислородного снабжения. В зависимости от режима может вызывать тяжелые функциональные нарушения деятельности мозга либо повышать адаптивные возможности организма. Гипобарическая гипоксия является одной из наиболее адекватных физиологических моделей, она легко управляема, пригодна для изучения как повреждающего (Тяжелая Гипоксия, ТГ), так и протективного воздействия (Умеренная гипобарическая гипоксия, УГГ), без оперативного вмешательства.

Гипоксическое прекондиционирование (ПреК) – предъявление особям гипоксии умеренной интенсивности в преддверии тяжелого повреждающего воздействия. По современным представлениям, процесс формирования протективных эффектов гипоксического/ишемического ПреК включает две стадии: раннюю (индукция толерантности) и позднюю (развитие толерантности).

Согласно результатам исследований, выполненных на переживающих срезах пириформной коры (Самойлов и др., 2001), фаза индукции гипоксической толерантности мозга обусловлена быстрой, но умеренной активацией глутаматергической сигнальной трансдукции и ключевых внутриклеточных регуляторных систем (кальциевой, фосфоинозитидной, цАМФ, умеренной активацией внутриклеточной прооксидантной системы), активацией HIF1a (за счет опосредованной гипоксией инактивации пролил-гидроксилазных реакций). Эти процессы происходят в первые часы гипоксического воздействия и приводят к запуску быстро индуцируемых механизмов активации протеинкиназ, посттрансляционной модификации белков ионных каналов, рецепторов, редокс-чувствительных протеинов. Учитывая, что данные системы внутриклеточной сигнальной трансдукции вовлекаются в экспрессию генома, предполагается, что быстро индуцируемые ПреК механизмы являются необходимым звеном для запуска отсроченных геном-зависимых процессов, благодаря которым развивается полноценный протективный эффект гипоксического ПреК (Самойлов и др., 2012).

Переход от фазы индукции к фазе развития толерантности связан с активацией транскрипционных факторов, вовлекаемых в механизмы пластичности и выживаемости нейронов. К этим, так называемым, активационным транскрипционным факторам относится белок, связывающий цАМФ чувствительный элемент (CREB). На различных ишемических моделях показано, что ПреК вызывает выраженную и пролонгированную активацию CREB, о чем свидетельствует его фосфорилирование по Ser113 и промоторная активность на последовательностях CRE генов-мишеней. Применение маскирующих CRE

олигонуклеотидов или анти-CREB полностью нейтрализовало устойчивость нейронов, индуцируемую ишемическим прекондиционированием (Hara et al., 2003).

Наряду с CREB, при ишемическом ПреК было обнаружено увеличение ДНК-связывающей активности и транслокации в ядро другого фактора - NF-kB. Ингибирование трансактивации NF-kB как с использованием фармакологических ингибиторов, так и олигонуклеотидов-ловушек, нивелировало нейропротекцию, индуцированную прекондиционированием (Blondeau et al., 2001).

Полученные в последнее время результаты говорят о том, что индукция активационных транскрипционных факторов зависит от режима ПреК. Так, в частности, выраженная нейрональная оверэкспрессия pCREB и NF-κB в неокортексе выявляется после трех -, но не одно- и шестикратных сеансов прекондиционирования гипобарической гипоксией (Чурилова и др., 2009, Rybnikova et al., 2008). При этом в отличие от трехкратного, одно- и шестикратное ПреК не предотвращает развитие структурно-функциональных нарушений, следующих за тяжелой гипоксией (Самойлов и др., 2012).

В фазу развития толерантности (24 часа и более) включаются отсроченные геном-зависимые механизмы, обеспечивающие процессы долговременной пластичности и выживания нейронов. В большой серии экспериментов с использованием молекулярно-биологических методов обнаружено, что трехкратное гипобарическое ПреК модифицирует в гиппокампе и неокортексе активность ряда внутриклеточных факторов регуляции процессов выживания/гибели вслед за предъявлением тяжелой гипоксии. Перечислим наиболее важные из этих факторов.

1) Ранние гены (*zif268, c-fos, hif1a*) и их продукты – индуцибельные транскрипционные факторы (NGFI-A,c-Fos, HIF1a) (Rybnikova et al., 2002, 2009). Активация генов индуцибельных транскрипционных факторов происходит за счет ремоделирования структуры хроматина опосредованно модификацией гистонов (ацетилирование, фосфорилирование и метилирование), а также взаимодействия регуляторных участков ДНК с активационными транскрипционными факторами. Гипоксическое ПреК значительно модифицирует паттерн экспрессии ранних генов в ответ на тяжелую гипоксию, а также индуцирует кооперативную up-регуляцию проадаптивных транскрипционных факторов (NGFI-A, c-Fos, HIF1a) и подавляет индуцированную тяжелой гипоксией активацию c-Jun, являющегося важным звеном про-апоптотических каскадов, в частности, JNK каскада.

2) Цитозольные и митохондриальные антиоксиданты (Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, тиоредоксины-1,2) (Строев и др., 2003, Stroev et al., 2004a, 2004b).

3) Факторы регуляции апоптоза семейства генов *bcl-2* (Bcl-2, Bcl-xL, Bax). У непрекондиционированных животных после тяжелой гипоксии наблюдается сдвиг соотношения Bax/Bcl-2,Bcl-xL в сторону преобладания про-апоптотического белка Bax, а у прекондиционированных особей это соотношение, напротив, меняется в пользу антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL, что очевидно препятствует запуску апоптоза в гиппокампе и неокортексе у этих животных (Rybnikova et al., 2006).

4) Митоген-активируемые протеинкиназы (MAP/ERK, JNK, p38) (Самойлов и др., 2007). Методом Вестерн- блот анализа и иммуногистохимии выявлено, что прекондиционирующее воздействие эффективно подавляет экспрессию фосфорилированных форм JNK, p38 и активирует ERK после тяжелой гипоксии.

5) Важную роль в предотвращении индуцируемых тяжелой гипоксией нарушений активности гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС), основной эндокринной системы позвоночных, регулирующей гомеостаз и обеспечивающей мобилизацию защитных сил организма при действии экстремальных факторов и стрессе, необходимую для формирования адаптивных реакций, играют изменения экспрессии экстрагипоталамических рецепторов кортикостероидов (Чистякова и др., 2011, Rybnikova et al., 2011).

2.04. Гипоксическое/ишемическое посткондиционирование

Перспективным способом структурно-функциональной реабилитации мозга после повреждающего воздействия факторов гипоксической природы является гипоксическое/ишемическое посткондиционирование (ПостК). Посткондиционирование в широком смысле - это экспозиция повреждающим факторам умеренной интенсивности после тяжелого повреждающего воздействия, с целью индукции эндогенных механизмов, способствующей коррекции нарушений.

Протективный эффект ишемического ПостК был впервые описан в 2003 году на сердце. В исследовании группы американских ученых было показано, что осуществление трех сеансов 30-секундной коронарооккклюзии, чередующихся с 30-секундными интервалами возобновления коронарного кровотока в реперфузионном периоде после 60-минутной коронарооккклюзии у собак способствует уменьшению степени повреждения миокарда. Феномен был назван ишемическим ПостК (Zhao et al., 2003). В своем пионерском исследовании Zhi-Qing Zhao и соавторы сравнивали протективный эффект

пост- и прекондиционирования. Размер зоны инфаркта анализировали через 3 часа после реперфузии. Площадь повреждения при использовании ишемического ПостК уменьшалась на 44 % по сравнению с 60-минутной контрольной ишемией, что было сопоставимо с протективым эффектом прекондиционирования.

Корректирующий негативные последствия ишемии миокарда эффект ишемического ПостК в дальнейшем был подтвержден многими исследовательскими группами в экспериментах на различных видах животных in vivo (Iliodromitis et al., 2006, Kin et al., 2005, Krolikowski et al., 2006), а также in vitro на культурах клеток (Dosenko et al., 2006). Клинические испытания ишемического ПостК пациентов после инфаркта миокарда также дали положительные результаты (Staat et al., 2005). В настоящее время кардиопротективный эффект ишемического ПостК активно исследуется, продолжается накопление данных об эффективности метода на разных органах, а также ведутся интенсивные работы по расшифровке молекулярно-клеточных механизмов реализации протективного действия данного метода (Zhao et al., 2003, 2006, Maslov et al., 2009, Skyschally et al., 2009, Zhao et al., 2010).

Спустя несколько лет после открытия протективного эффекта ишемического ПостК сердца этот феномен был также продемонстрирован на мозге. Первая работа по ПостК головного мозга была опубликована Калифорнийской группой нейрохирургов под руководством Heng Zhao в 2006 году. Инсульт моделировали на крысах с помощью перманентной окклюзии средней мозговой артерии (СМА) и транзиторной перевязки обеих сонных артерий, а ишемическое ПостК воспроизводили спустя 2 минуты после реперфузии с помощью трех циклов окклюзии по 10 секунд и реперфузии по 30 секунд сонных артерий. Через 2 дня после лигирования СМА оценивали размер зоны инфаркта. Ишемическое ПостК обеспечивало уменьшение очага некроза на 80% по сравнению с контрольной повреждающей ишемией и способствовало снижению интенсивности апоптоза (Zhao et al., 2006). Данные этой работы были с успехом воспроизведены множеством научных коллективов по всему миру, использовавших разные режимы повреждающей ишемии и ишемического ПостК (Danielisova et al., 2006, Gao et al., 2008, Ren et al., 2008, Song et al., 2008). Феномен ПостК также продемонстрирован in vitro в экспериментах на переживающих срезах гиппокампа (Scartabelli et al., 2008) и на первичных нейрональных культурах (Leconte et al., 2009).

2.04.01. Нейропротективные механизмы, активируемые ишемическим посткондиционированием

В настоящее время ведется активное изучение механизмов нейропротективного действия ишемического ПостК. Показано, что ишемическое ПостК подавляет генерацию свободных радикалов и инициацию апоптоза в период реперфузии, вызывает снижение уровня малонового диальдегида (МДА) и окислительных модификаций белков на фоне увеличения активности супероксиддисмутазы и каталазы в тканях головного мозга (Zhao et al., 2006, Danielisova et al., 2006, Song et al., 2008, Li et al., 2012, Xing et al., 2008). Это свидетельствует о ярко выраженном антиоксидантном эффекте ишемического ПостК.

По аналогии с сердцем было показано, что ишемическое ПостК мозга способствует увеличению количества фосфорилированной протеинкиназы Cε на фоне снижения количества фосфорилированной протеинкиназы Cδ, согласно современным представлениям способствующей клеточной гибели (Gao et al., 2008). В гибели нейронов и при патогенезе нейродегенеративных заболеваний важную роль играет киназа JNK, которая активирует транскрипционные факторы c-jun и p53 (Wang et al., 2004). Исследователи из Калифорнии установили, что ишемическое ПостК приводит к снижению количества фосфорилированной JNK в головном мозге и предотвращению клеточной гибели (Gao et al., 2008).

Особая роль в супрессии апоптоз-индуцирующих сигналов, обеспечении нормального функционирования клеток и межклеточных взаимодействий принадлежит протеинкиназе Akt (Alessi et al., 1997, Jonassen et al., 2001). В экспериментах на срезах гиппокампа обнаружено, что селективное ингибирование активатора Akt нивелирует нейропротективный эффект ишемического ПостК (Scartabelli et al., 2008). Американские физиологи в экспериментах in vivo также показали, что ишемическое ПостК мозга ведет к фосфорилированию Akt и, как следствие, повышению активности этого фермента (Gao et al., 2008). Причем, в условиях блокады PI3 киназы уменьшение зоны инфаркта не фиксировалось, но происходило снижение экспрессии шаперонов эндоплазматического ретикулума и наблюдался запуск ЭПР-зависимого апоптоза, вовлекающего каспазу 12 (Yuan et al., 2011). Кроме того, показана роль Akt в реализации эффекта ишемического ПостК через активацию киназы mTOR. Интересно, что анестетики, имитирующие феномен ПостК (пропофол и изофлуран), также активируют Akt и PI3 киназу (Aronowski et al., 1997, Wang et al., 2009).

Еще одной киназой, обеспечивающей выживаемость клеткок в неблагоприятных условиях, является ERK, фосфорилируемая киназой MEK (Grewal et al., 1999, McCubrey et al., 2008). В 2009 году Jiang и соавторы (Jiang et al., 2009) установили, что ишемическое ПостК спинного мозга кролика (модель in vivo) ведет к фосфорилированию ERK, а нейропротективный эффект не проявляется в условиях блокады МЕК. Вовлечение ERK в механизмы толерантности мозга к гипоксическим воздействиям было выявлено и при изучении более старого феномена гипоксического прекондиционирования *(*Самойлов и др., 2007) на головном мозге крыс в модели гипобарической гипоксии. Однако данные Jiang и соавторов противоречат результатам исследований американских и китайских специалистов (Gao et al., 2008, Zhan et al., 2012), обнаруживших снижение количества фосфорилированной ERK после ишемического и нормобарического гипоксического ПостК, причем последними показана роль ингибирования MEK/ERK сигнального пути в компенсации последствий транзиторной глобальной церебральной ишемии (Zhan et al., 2012). Причина данного противоречия остается неясной.

Малоизученным в настоящее время остается вопрос о роли каждой киназы в отдельности, особенностях их взаимодействия при реализации эффекта ПостК, а также идентификация конечных эффекторов ишемического ПостК. На роль ключевых эффекторов ишемического ПостК претендуют ферменты антиоксидантной защиты клетки (Zhao et al., 2006, Danielisova et al., 2006, Song et al., 2008), шапероны (Xing et al., 2008a, Yuan et al., 20011), а также факторы, регулирующие опосредованный митохондриями путь запуска апоптоза (Xing et al., 2008a, Halestrap et al., 2010*)*. Одним из наиболее изученных белков, супрессирующих реализацию данного пути апоптоза, считается Bcl-2. В мозге экспрессия Bcl-2 определяется активностью передачи сигнала между нейронами, и отражает сбалансированную работу сигнальных путей, вовлекающихся в обеспечение нейропластичности (Xing et al., 2008b). Xing и соавторы обнаружили, что ишемическое ПостК способствует повышению уровня Bcl-2, снижению проапоптотического белка Bax и препятствует реперфузионному повышению уровня цитохрома с в цитоплазме нейронов (Xing et al., 2008a). Эта же группа авторов сообщила о противовоспалительном эффекте ишемического ПостК, выражающемся в снижении активности миелопероксидазы, уменьшении количества маркера перекисного окисления липидов (ПОЛ) малонового диальдегида, а также подавлении синтеза провоспалительных цитокинов TNFa, IL1b и маркерных для воспаления молекул клеточной адгезии ICAM (Xing et al., 2008b). Не менее интересным путем стимуляции нейропротекции, опосредованной ишемическим ПостК, представляется ослабление аутофагии, однако в настоящее время недостаточно данных для

однозначной оценки долгосрочных последствий подобных перестроек работы внутриклеточной молекулярной машинерии для дальнейшего функционирования нейронов (Gao et al., 2012).

Заслуживают отдельного упоминания работы Zhang и соавторов, демонстрирующие вклад ишемического ПостК в реализацию изменения локализации глутамата в мозге крыс посредством усиления работы глутамин синтетазы в астроцитах и увеличения экспрессии нейрональных транспортеров глутамата (GLT1), что приводит к снижению эксайтотоксичности и, соответственно, к ослаблению постишемических повреждений (Zhang et al., 2010, 2011).

В последнее время особое внимание исследователей ишемического ПостК привлекает возможность включения процессов пролиферации нейрональных клеток как пути компенсации постинсультной гибели нейронов. В 2015 году Esposito и соавторы продемонстрировали экспериментальные подтверждения этой гипотезы (Esposito et al., 2015).

В основном накопленные к настоящему времени данные литературы касаются моделей так называемого быстрого ишемического ПостК, когда прерывание реперфузии производится в ранний период (секунды и минуты) после ишемии, однако помимо раннего выделяют также отсроченное (Danielisova et al., 2006, Ren et al., 2008, 2009, Leconte et al., 2009, Nemethova et al., 2010) и дистантное (Peng et al., 2012, Zhou et al., 2011) ишемическое ПостК головного мозга, а также используют сочетание различных вариантов ишемического ПостК как между собой, так и с описанным ранее феноменом ишемического прекондиционирования, что подробно изложено в обзорах (Zhao, 2009, 2012, Zhou et al., 2011, Маслов и др., 2012, Ma et al., 2015). Сообщается также об успешных попытках моделирования эффекта ишемического ПостК так называемым фармакологическим ПостК при помощи ингаляционного наркоза (Wang et al., 2009, Adamczyk et al., 2010, McMurtrey et al., 2010).

2.04.02. Неинвазивные способы посткондиционирования

Несмотря на хорошо документированную нейропротективную эффективность ишемического ПостК, трансляционный потенциал данного способа реабилитации мозга остается под вопросом в связи с рядом серьезных недостатков. В частности, способ проведения ишемического ПостК путем прерывистой окклюзии каротидных и церебральных артерий – это инвазивный метод, требующий хирургического вмешательства, что связано со значительными рисками и ограничениями, в особенности у пациентов, переживших тяжелые повреждающие воздействия – то есть именно там, где необходимо применение ПостК. Кроме того, согласно приведенным выше литературным данным, ишемическое ПостК обладает узкими терапевтическими окнами - от нескольких минут до 1-2 часов после ишемического инсульта, что также затрудняет его использование в медицинской практике. Поэтому поиск неинвазивных подходов для ПостК, и расшифровка механизмов их действия представляется перспективным направлением работ.

В недавно выполненных исследованиях лаборатории регуляции функций нейронов мозга Института физиологии имени И.П.Павлова РАН был разработан новый, неинвазивный способ ПостК с использованием умеренной гипобарической гипоксии - воздействия на организм пониженным атмосферным давлением, приводящим к ослаблению кислородного снабжения (способ гипоксического посткондиционирования, патент на изобретение № 2437164, 20.12.2011). (Rybnikova et al., 2012, 2015, Зенько и др., 2014, Gamdzyk et al., 2014, Vetrovoy et al., 2014, 2015, 2016, 2017). Параллельно китайскими коллегами опубликован цикл работ, подтверждающих эффективность нормобарического гипоксического ПостК при коррекции последствий транзиторной глобальной церебральной ишемии (Zhan et al., 2012, Zhu et al., 2013, 2014). Показана эффективность НБГПостК при компенсации последствий 10 минутной транзиторной глобальной ишемии головного мозга.

2.04.02.01. Гипобарическое гипоксическое посткондиционирование

Эффективность метода гипобарического гипоксического ПостК при коррекции последствий тяжелого гипоксического воздействия была продемонстрирована в экспериментах на крысах. В качестве повреждающего гипоксического воздействия использовали тяжелую гипобарическую гипоксию (ТГ), создаваемую в барокамере проточного типа путем трехчасовой экспозиции при давлении 180 мм рт ст (что эквивалентно 5% нормобарического кислорода и подъему в горы на высоту 11 км). Данная модель хорошо изучена. Известно, что примерно 50% крыс не выживают в условиях ТГ, а у остальных наблюдаются отек мозга, повреждение ГЭБ, массированная клеточная гибель в гиппокампе и неокортексе, поведенческий дефицит, нарушения обучения и памяти. Посткондиционирующее воздействие в этой модели состояло в предъявлении трех сеансов умеренной гипобарической гипоксии (360 мм рт ст, что соответствует 10% нормобарического кислорода и подъему на высоту 5 км) по 2 часа, начиная с 24 ч после ТГ и далее – с суточным интервалом.

Как уже упоминалось, животные, пережившие ТГ, демонстрировали выраженные нарушения поведения, включая двигательную ретардацию, повышение тревожности, нарушения стереотипной активности и другие признаки депрессивноподобных состояний. Базальный уровень кортикостерона в плазме крови этих животных был снижен в 6 раз относительно контроля, однако при этом 5-кратно возрастала стрессореактивность гипофизарно-адренокортикальной системы на слабый (непатогенный) стресс. Предъявление гипобарического ПостК по вышеописанной схеме нивелировало эти нарушения (Rybnikova et al., 2012).

Гистологический анализ срезов мозга при окраске по Нисслю показал, что в наиболее уязвимых к гипоксии образованиях мозга (Kodama et al., 2003), в частности CA1 поле гиппокампа, к седьмому дню после ТГ происходит потеря около 30% пирамидных нейронов, при этом ПостК УГГ практически полностью предотвращало нейрональную гибель (Rybnikova et al., 2012). Как было показано раньше, на начальных сроках реоксигенации после ТГ в мозге крыс наблюдается массированная индукция АФК и интенсификация процессов ПОЛ (Kislin et al., 2009, 2011), что может быть причиной описанной нами нейрональной гибели. Опираясь на данные об антиоксидантном действии ишемического ПостК (Danielisova et al., 2006, Song et al., 2008, Li et al., 2012, Xing et al., 2008) можно предположить, что опосредованное гипобарическим ПостК предотвращение клеточной гибели связано с нормализацией работы внутриклеточных сигнальных путей поддержания антиоксидантной защиты. Совокупность этих и других фактов позволила

сделать заключение о высокой нейропротективной эффективности гипобарического ПостК. Настоящая работа посвящена в том числе расширению и детализации представлений о конкретных молекулярных механизмах этого метода.

2.04.02.02. Механизмы нейропротективных эффектов гипоксического посткондиционирования

Механизмы нейропротективного действия гипоксического посткондиционирования, в отличие от ишемического, до настоящего времени изучены слабо. Следует отметить два параллельных направления исследований, основанных на применении разных моделей – нормобарического и гипобарического Постк. Показано, что гипобарическое ПостК up-регулирует экспрессию противоапоптотического белка Bcl-2 и нейротрофина BDNF в гиппокампе крыс (Vetrovoy et al., 2015). Сходные данные были получены и в модели раннего ишемического ПостК (Xing et al., 2008). Стимуляция сигнальных путей регуляции экспрессии нейротрофинов и антиапоптотических белков характерна для многих форм нейропластичности и вероятно также играет ключевую роль в реализации протективного действия ПостК, обеспечивая предотвращение клеточной гибели, нормализацию ПОЛ, а также поведенческих характеристик у крыс (Vetrovoy et al., 2015). Кроме того, очевидно, важный вклад в эти процессы вносит ключевой транскрипционный регулятор индукции адаптации к условиям кислородного голодания гипоксия-индуцируемый фактор1 (HIF1) и мишени его транскрипционной активности, в частности, протективный цитокин эритропоэтин, показавший себя как важный регулятор процессов синапто- и нейрогенеза. Было обнаружено, что ТГ отсроченно подавляет экспрессию регуляторной альфа субъединицы HIF1 (HIF1a) и, как результат, ведет к снижению уровня эритропоэтина, что согласуется с данными литературы о путях регуляции HIF1 (Dengler et al., 2014) и об особенностях активности протеинкиназ в период реоксигенации на различных ишемических моделях (Scartabelli, et al., 2008, Gao et al., 2008, Yuan et al., 2011, Grewal et al., 1999, McCubrey et al., 2008). В то же время гипобарическое ПостК up-регулирует уровень HIF1a и эритропоэтина, что предположительно также вносит вклад в нейропротективный эффект ПостК (Vetrovoy et al., 2014), однако для полного понимания роли HIF1 в реализации адаптивных/патологических реакций мозга на гипоксию требуется проведение дополнительных исследований его динамики, особенностей его пост-трансляционных модификаций и транскрипционной активности в ранний постгипоксический период.

Особых успехов в изучении модификации активности протеинкиназ, регулирующих функционирование HIF1 в условиях патологической и адаптивной гипоксии, добились китайские исследователи под руководством En Xu, используя НБГПостК для компенсации последствий 10 минутной транзиторной глобальной ишемии головного мозга. Нормобарическое гипоксическое ПостК представляет собой двухчасовое пребывание в камере, заполненной смесью 8% кислорода и 92% азота, через 1 день после пережитой ишемии: окклюзии двух позвоночных и двух сонных артерий. В своих первых экспериментах авторы показали, что нормобарическое гипоксическое ПостК приводит к увеличению фосфорилирования киназы Akt и нейропротективного транскрипционного фактора FoxO, что коррелирует с уменьшением очага инфаркта и предотвращением клеточной гибели. При этом использование ингибитора PI3K, как и в случае ишемического ПостК (Gao, et al., 2008), нивелирует нейропротективный эффект и сопровождается снижением фосфорилирования Akt, FoxO, а также интенсификацией клеточной гибели. В то же время такой метод ПостК способствует уменьшению фосфорилирования киназ MEK и ERK, активированных в модели транзиторной глобальной церебральной ишемии, а применение ингибитора MEK приводило к снижению нейрональных потерь после повреждающей ишемии (Zhan et al., 2012).

На следующем этапе этой же группой авторов продемонстрирована роль нейрональной (но не глиальной) киназы p38 в осуществлении нейропротективного действия нормобарического гипоксического ПостК через фосфорилирование киназы MSK, активирующей c-Rel субъединицу транскрипционного фактора семейства NF-kB (Zhu et al., 2013). Помимо известного для ЦНС прямого нейропротективного действия NF-kB выступает в качестве коактиватора альфа субъединицы гипоксия-индуцируемого фактора (HIF1a), в связи с чем крайне интересны данные о вовлечении этого фактора адаптации к гипоксии в обеспечение нейропротекции нормобарического гипоксического ПостК. Действительно, нормобарическое гипоксическое ПостК up-регулирует экспрессию HIF1a, а также экспрессию продуктов его генов-мишеней, в частности VEGF, способствуя предотвращению клеточной гибели и уменьшению содержания активной каспазы-3 в гиппокампе. При этом, ингибиторы как киназы p38, так и киназы Akt, вызывают полное блокирование этого сигнального пути, а ингибитор MEK/ERK сигналинга, напротив, up-регулирует HIF1a-зависимый нейропротективный путь в ответ на глобальную церебральную ишемию в отсутствие нормобарического гипоксического ПостК (Zhu et al., 2014).

Таким образом, накопленные в настоящий момент данные указывают на существенное сходство путей достижения нейропротективного эффекта как ишемического, так и гипоксического (гипобарического и нормобарического) посткондиционирования, а также на значительное их перекрывание с механизмами нейропластичности мозга. Однако эти вопросы требуют дальнейших исследований.

2.05. Предполагаемые эффекторы нейропротекции, индуцируемой гипоксическим посткондиционированием умеренной гипобарической гипоксией

В рамках исследования механизмов гипоксического посткондиционирования на первых этапах наше внимание было привлечено к основному регулятору клеточного гомеостаза в условиях гипоксии – фактору HIF1a (регуляторной альфа субъединице гетеродимера HIF1) и одной из мишеней его транскрипционной активности, цитокину эритропоэтину, использованному в качестве маркера транскрипцционной активности HIF1, а также к антиапоптотическому белку Bcl-2 и нейротрофину BDNF, как ключевым индукторам толерантности мозга вообще. Настоящий раздел обзора литературы посвящен краткому обобщению литературных данных об этих белках.

2.05.01. Гипоксия-индуцируемый фактор (HIF1)

Клеточный ответ на изменение концентрации кислорода является центральным процессом в клетках животных. Как известно, одним из ключевых факторов адаптации к гипоксическим условиям является гипоксия-индуцируемый фактор 1 (HIF1) (Herdegen et al., 1998, Semenza, 2000, 2001). HIF1 – транскрипционный фактор, представляющий собой гетеродимер белков HIF1a и HIF1β, имеющих ДНК связывающий спираль-петля-спираль домен, центральный PAS (Per-ARNT-Sim) домен, обеспечивающий гетеродимеризацию, и С-терминальный трансактиваторный домен. HIF1a, являясь регулируемой субъединицей, накапливается в условиях гипоксии, тогда как HIF1β экспрессируется конститутивно (John et al., 1999).

На Рисунке 1 представлена обобщенная схема представлений о сигнальных путях, приводящих к мобилизации HIF1a и о мишениях этого транскрипционного фактора. В присутствии кислорода HIF1a гидроксилируется пролил-гидроксилазой, убиквитинилируется и затем подвергается протеасомной деградации (Jiang et al., 1997, Masson et al., 2001). В условиях гипоксии пролил-гидроксилаза инактивируется, и HIF1a

перестает восприниматься убиквитинлигазой. Это приводит к его накоплению в цитозоле, димеризации с HIF1β и транслокации в ядро, где происходит взаимодействие с CREB, РНК полимеразой II, связывание с последовательностью HRE (Hypoxia-Responsive Element) и активация транскрипции генов-мишеней.

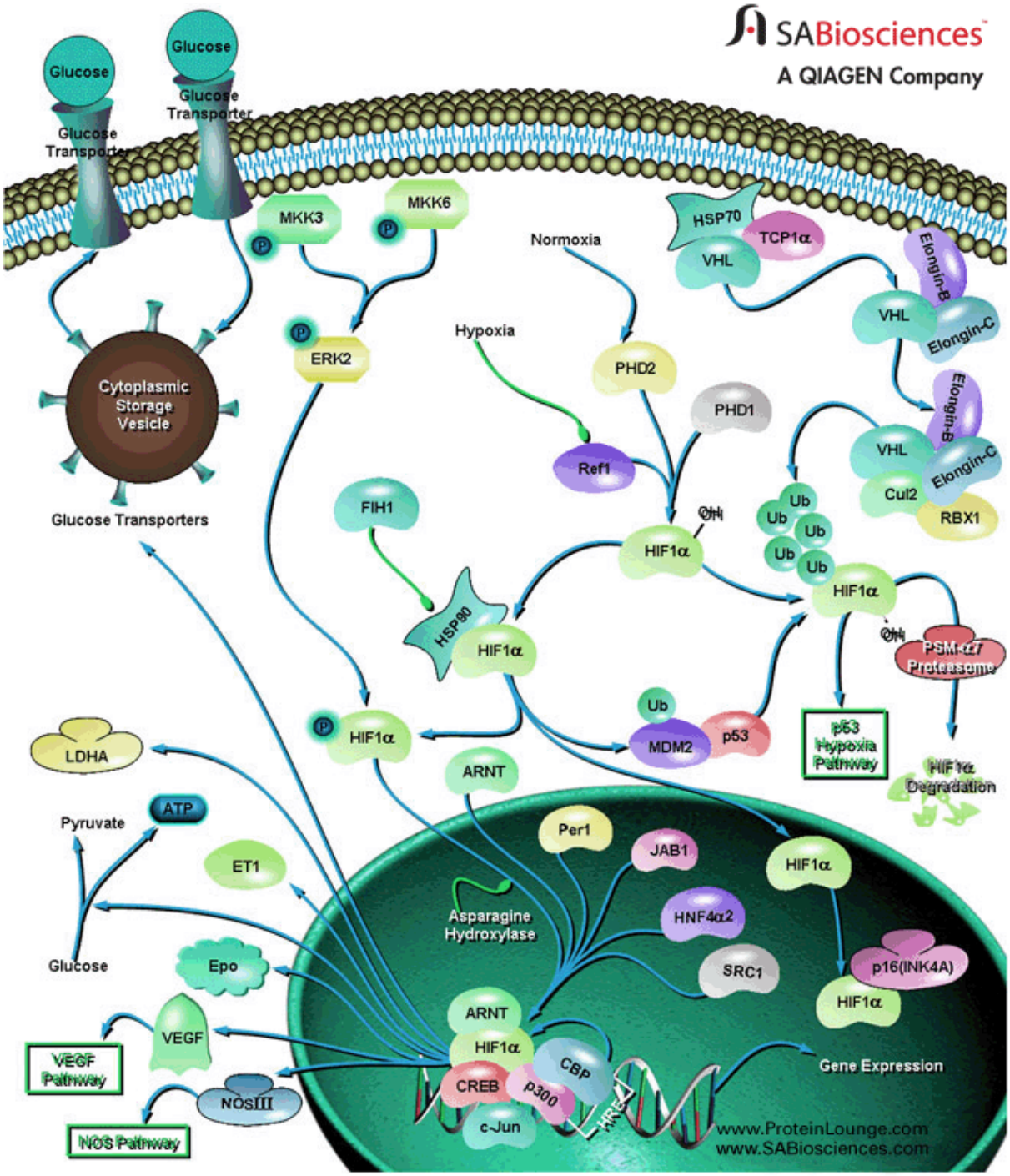


Рисунок 1. Обобщенная схема представлений о сигнальных путях, приводящих к мобилизации HIF1a и о мишениях транскрипционного фактора HIF1 (http://www.sabiosciences.com/). Пояснения в тексте.

В настоящее время очевидно, что механизмы регуляции работы HIF1 намного сложней и разнообразней. Например, помимо пролил-гидроксилазного есть еще аспарагин-гидроксилазный путь ингибирования HIF1, ведущий правда не к деградации, а к нарушению взаимодействия с коактивирующими транскрипцию гистоновыми ацетилтрансферазами CBP/p300 (Dengler et al., 2014). Также транскрипционная активность HIF1a прямо зависит от активности киназ ERK и p38, а индуцирующая деградацию HIF1a пролилгидроксилаза сама может отправиться в протеасому при достаточно высокой активности киназы Akt (Loboda et al., 2010). Наконец, сам HIF1 способен запускать транскрипцию антагониста собственной транскрипционной активности фактора HIF3a. HIF3a, как и HIF1a, является кислород-зависимым белком, имеет такой же сайт связывания с HIF1β и такой же сайт «посадки» на ДНК, как HIF1a, но не имеет С-трансактиваторного домена, без которого невозможен запуск транскрипции. Однако HIF3a продолжает гидроксилироваться и, как следствие, расщепляться в протеасомах при умеренных формах гипоксии, когда механизм гидроксилирования HIF1a уже супрессирован (Dengler et al., 2014).

За счет опосредованной снижением концентрации кислорода стимуляции экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), транспортеров глюкозы, ферментов гликолиза, лактатдегидрогеназы, цитокина эритропоэтина и продуктов многих других генов, необходимых для обеспечения функционирования в условиях хронической гипоксии (Kim et al. 2006, Semenza 2000, 2001, Chavez et al., 2000, Kodama et al., 2003, Guo et al., 2008, Lukyanova et al., 2015, Sheldon et al., 2014, Dengler et al., 2014) HIF1 по праву признан ключевым регулятором адаптации к хронической гипоксии. Однако, патогенез относительно непродолжительных острых форм гипоксии/ишемии в первую очередь реализуется в период реоксигенации (Nita et al., 2001), когда неконтролируемая активация данного фактора транскрипции на фоне дефицита активности киназ, обеспечивающих адекватную активность HIF1 (Chen et al., 2003, Vetrovoy et al., 2015), потенциально способна оказывать дезадаптивный эффект, что может вносить неблагоприятный вклад в формирование постгипоксических патологий (Sun Y. et al., 2017).

Среди множества гипотетических нейропротективных стратегий при коррекции постинсультных патологий активно обсуждается возможность применения стимуляторов активности HIF1 (Siddiq et al., 2005). Накоплено множество сведений о нейропротекции, вызванной активаторами HIF1 при моделировании ишемии (Nagel et al., 2011, Tian et al., 2011). В то же время появляются сведения, согласно которым ранее продемонстрированные доказательства протективной роли HIF1 в постишемический период были связаны с

побочными эффектами используемых ингибиторов пролил-гидроксилаз, также выполняющих роль хелаторов двухвалентных металлов, и протекция связана не столько со стабилизацией данного транскрипционного фактора, сколько с ингибированием клеточной гибели по типу ферроптоза (Speer et al., 2013). Более того, в ряде исследований на модели окклюзии средней мозговой артерии было показано, что ключевой регулятор адаптации организма к гипоксическим условиям, транскрипционных фактор HIF1, в период реперфузии после острой ишемии способен оказывать дезадаптивный эффект, способствуя разборке структур гемато-энцефалического барьера (Sun Y., et al. 2017) и запуску апоптотической клеточной гибели (Chen et al., 2009). Поэтому вопрос о направленности эффектов HIF1 в условиях гипоксии/реоксигенации остается открытым.

2.05.02. Цитокин эритропоэтин

Эритропоэтин – цитокин молекулярной массой 34кДА, физиологический стимулятор эритропоэза. Изначально его основной функцией считались запуск пролиферации и дифференцировкии эритроцитов из полустволовой клетки миелоидного ряда. В последнее десятилетие интерес исследователей к эритропоэтину значительно возрос в связи с тем, что этот белок в достаточно высоких концентрациях был обнаружен в нейронах мозга, где, по всей видимости, выполняет множественные нейропротективные функции, не связанные с эритропоэзом (Chatagner et al., 2010). Помимо этого, сигналлинг, запускаемый эритропоэтином, определяет переход от стадии индукции к стадии экспрессии (осуществления) толерантности мозга к тяжелым повреждающим воздействиям

Эритропоэтин проявляет свои функции через EpoR (рецептор эритропоэтина), представитель семейства цитокиновых рецепторов (Pereira et al., 2000). На Рисунке 2 Представлена обобщенная схема представлений о сигнальных путях, активируемых связыванием эритропоэтина с рецептором. После связывания с эритропоэтином рецептор гомодимеризуется и претерпивает фосфорилирование под действием сопряженной с ним тирозинкиназы JAK2. Далее происходит активация ряда downstream адаптеров и эффекторов, включая STAT5, PI3K, SHIP (SH2-containing Inositol Phosphatase), тирозинфосфатаз SHP1 и SHP2, ERKs и др (Iwatsuki et al., 1997). PI3K опосредует активацию киназы Akt, играющей ключевую роль в запуске адаптивных реакций клетки (Alessi et al., 1997, Jonassen et al., 2001).

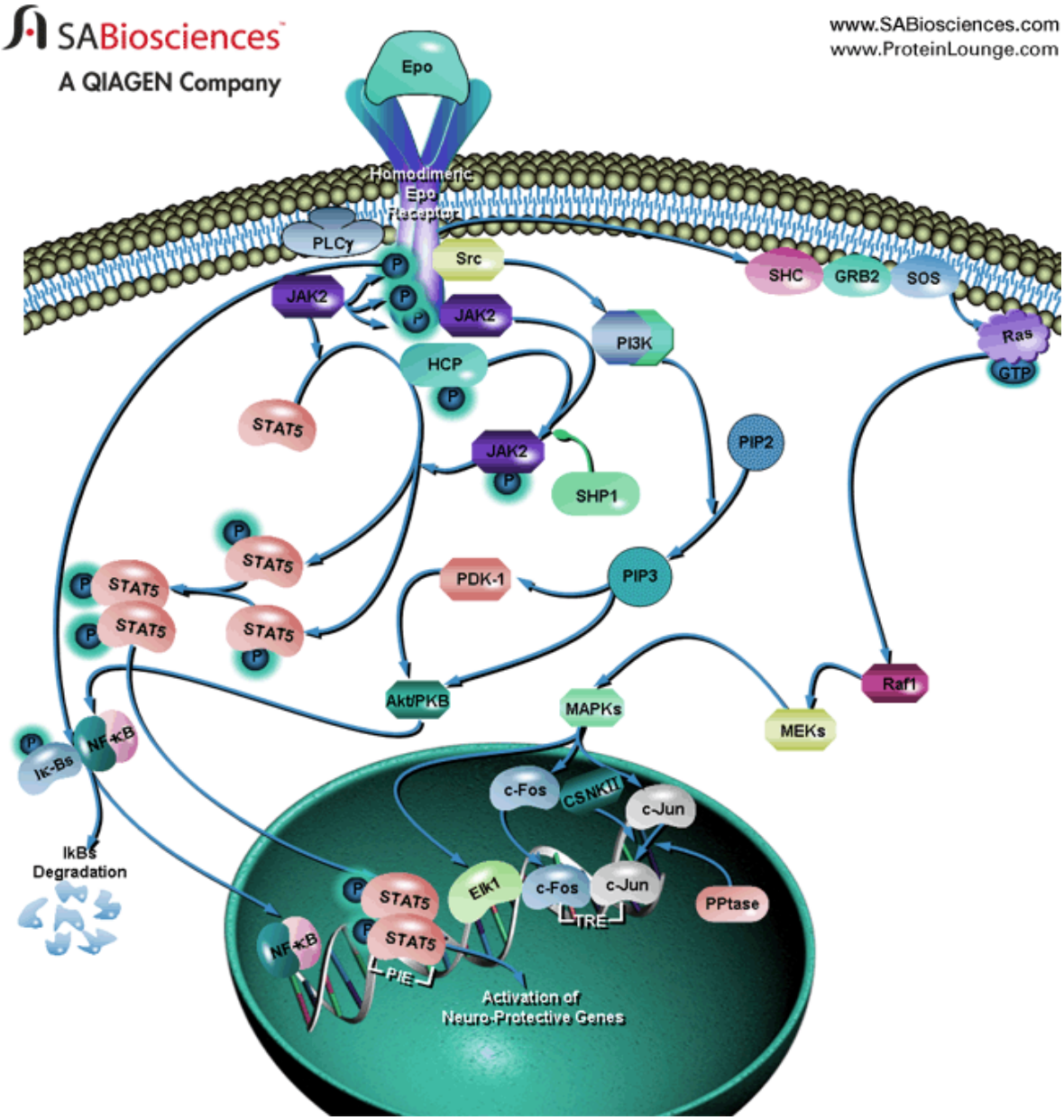


Рисунок 2. Обобщенная схема представлений о сигнальных путях, активируемых связыванием эритропоэтина с рецептором (http://www.sabiosciences.com/). Пояснения в тексте.

Предполагают, что эритропоэтин, будучи транскрипционной мишенью фактора HIF1a, может играть важную роль в механизмах гипоксического/ишемического повреждения нейронов и его компенсации. В частности, в моделях гипоксии/ишемии

показано, что экзогенный эритропоэтин снижает объем повреждений мозга и улучшает его структурно- функциональное состояние (Ogunshola et al., 2013). В данной работе эритропоэтин использован как белковый маркер транскрипционной активности HIF1.

2.05.03. Bcl-2 и регуляция апоптоза, опосредуемого митохондриями

Bcl-2 является белком, препятствующим запуску апоптоза, опосредуемого митохондриями (Рисунок 3), за счет ограничения проницаемости митохондриальной мембраны. Локализован в наружной мембране митохондрий, и ингибирует выход цитохрома С в цитозоль. Ген Bcl-2 является одной из мишеней CREB и NF-κB, ключевых адаптивных транскрипционных факторов мозга (Karin et al., 2002, Chiueh et al., 2005).

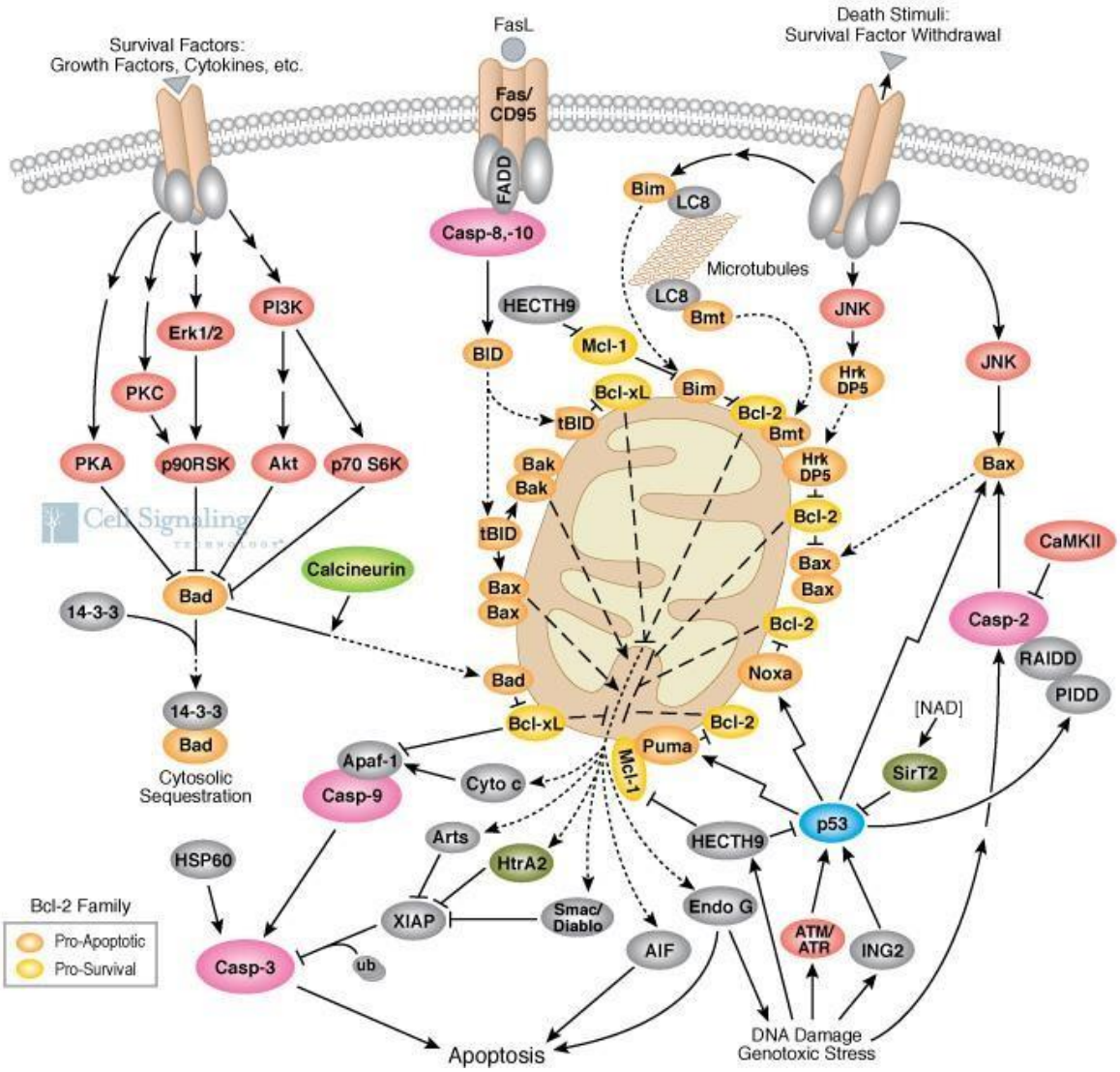


Рисунок 3. Обобщенная схема представлений о путях регуляции запуска апоптоза, опосредуемого митохондриями (http://www.cellsignal.com/). Пояснения в тексте.

Проапоптотические белки Bad, Bid, Bax, и Bim могут находиться в цитозоле, при перемещении и встраивании во внешнюю мембрану митохондрий становятся триггерами клеточной смерти, способствуя выходу цитохрома С. Bad встраивается в митохондриальную мембрану, образуя проапоптический комплекс с Bcl-XL. Транслокация Bad ограничивается ростовыми факторами, в частности при адаптации мозга к повреждающему воздействию гипоксии характерными примерами таких сигнальных белков являются эритропоэтин (транскрипция регулируется HIF1) и BDNF (CREB и NGFI-a зависимый), которые опосредованно киназой Akt вызывают фосфорилирование Bad, что приводит к его цитозольному секвестрированию. Цитозольный Bid, подвергаясь ограниченному протеолизу каспазой-8, переходит в активную форму, способную к встраиванию в митохондриальную мембрану и инактивации Bcl-XL. Bax и Bim перемещаются в митохондриальную мембрану в ответ на внеклеточный сигнал клеточной смерти, либо на отсутствие сигнала от факторов роста. Bcl-2 блокирует активность Bax, но сам может быть инактивирован Bim (продукт транскрипционной активности c-Jun и FoxO1) и рядом других проапоптотических белков (Puma,Noxa – их транскрипция активируется p53 (Brenner et al., 2009, Halestrap et al., 2010).

Высвободившийся из митохондрии цитохром С взаимодействует с локализованным в цитоплазме белком Apaf-1. Предполагается, что связывание цитохрома С изменяет конформацию Apaf-1, в результате чего CARD-домен становится доступен для связывания с гомологичным доменом прокаспазы-9. Формируется олигомерный комплекс (апоптосома), состоящий из нескольких молекул Apaf-1, цитохрома С и прокаспазы-9, в результате чего молекулы прокаспазы-9 тесно сближаются, и происходит ограниченный протеолиз прокаспазы-9 до активной каспазы-9, активирующей в свою очередь каспазу-3, которая запускает апоптоз опосредованно активацией нуклеазы CAD, осуществляющей фрагментацию ДНК. Хотя механизмы, регулирующие проницаемость митохондриальной мембраны и освобождения цитохрома С при апоптозе полностью не понятны, Bcl-XL, Bcl-2 и Bax могут повлиять на потенциал-зависимый анионный канал (VDAC), который, видимо, играет роль в регуляции выхода цитохрома С (Pradelli et al., 2010).

Данные о вовлечении Bcl-2 в реализацию нейропротекции были получены в модели раннего ишемического ПостК (Xing et al., 2008). Регуляция транскрипции Bcl-2 осуществляется адаптивными транскрипционными факторами CREB, NF-κB (Chatagner et al., 2010, Jonassen et al., 2001). Мобилизация CREB (за счет фосфорилирования) была продемонстрирована при изучении эффекта ишемического (Hara et al., 2003) и гипобарического (Чурилова и др., 2009) прекондиционирования. Следует отметить, что

гипоксическое прекондиционирование, как ишемическое, так и гипобарическое, увеличивало экспрессию NF-кВ, хотя тяжелая гипоксия/ ишемия приводила к снижению его экспрессии (Чурилова и др., 2009, Blondeau et al., 2001). Накопленные в настоящее время данные свидетельствуют о том, что Bcl-2 является удобным коррелятом адаптивного/патологического статуса клеток вообще, а в частности нейронов.

2.05.04. Нейротропный фактор мозга (BDNF)

Все ростовые факторы представляют собой полипептиды, состоящие из 100-150 аминокислотных остатков. Нейротрофины – семейство факторов роста, осуществляющих свою функцию главным образом в нервной системе. Все они синтезируются в виде предшественников (примерно 33кДа). Затем в ходе посттрансляционного процессинга выщепляются активные пептиды, содержащие несколько высоко консервативных остатков цистеина, образующих дисульфидные мостики при формировании третичной структуры.

Нейрональные ростовые факторы необходимы для развития и поддержания нервной системы за счет обеспечения выживаемости определенных типов нейронов и клеток глии (благодаря подавлению активности проапоптотического белка Bad опосредованно запуском Akt и Erk1/2 сигналинга), регуляции формирования специфического фенотипа нервных клеток, участия в образовании определенного рецепторного аппарата и типа эргичности (отдельными нейротрофинами или их совместным действием). В нервной системе взрослого организма ростовые факторы обеспечивают формирование синапсов, поддерживают пластичность нейронов и участвуют в регенеративных процессах.

Семейство нейротрофинов включает в себя NGF (фактор роста нервов), BDNF (нейротропный фактор мозга), NT3 (нейротрофин-3), и NT4/5 (нейротрофин-4/5). Разные нейротрофины имеют различные места преимущественной реализации их действия. Так для NGF основными клетками-мишенями являются симпатические и сенсорные нейроны в ПНС, холинэргические нейроны базального переднего мозга и стриатума, а также клетки Пуркинье мозжечка в ЦНС, для BDNF – сенсорные нейроны в ПНС, спинальные мотронейроны, дофаминэргические нейроны черной субстанции, глутаматэргические нейроны гиппокампа и ганглиозные клетки сетчатки в ЦНС (Ещенко и др., 2013).

Функции нейротрофинов опосредуется путем взаимодействия с тирозинкиназными рецепторами: NGF с TrkA, BDNF и NT4/5 с TrkB, NT3 с TrkC и в меньшей степени с TrkA, TrkB. В структуре рецептора выделяют три участка: экстраклеточный с сайтом связывания

лиганда (содержит два богатых цистеином и один богатый лейцином домены, а также иммуноглобулиновый домен), трансмембранный (22-26 а.о., низкая гомология даже в пределах семейства), внутриклеточный с тирозинкиназным доменом на С конце (высоко консервативный) и сайтами аутофосфорилирования. Специфичность лиганд-рецепторного взаимодействия определяется вариабельностью экстраклеточного участка рецептора (Ещенко и др., 2013).

Связавшись с лигандом димеризовавшийся рецептор аутофосфорилируется, что приводит к ассоциации с белками мишенями, эндоцитируется и, перемещаясь ретроградным транспортом к ядру, запускает несколько сигнальных путей. Мишенями рецепторов нейротрофинов являются такие молекулы цитозоля чувствительных нейронов как фосфолипаза С, IAPs (ингибитор апоптоза) и киназа Akt (опосредованно PI3K), белки Ras-MAP киназного пути, приводящего к активации адаптивного транскрипционно фактора CREB, запускающего транскрипцию противоапоптотического белка Bcl-2, пептидных антиоксидантов, NGFI (фактора транскрипции, индуцирующего NGF) (Howe et al., 2001).

Кроме высокоаффинных Trk-рецепторов обнаружен общий для всех нейротрофинов низкоаффинный (паннейротрофиновый) рецептор p75. В отличие от остальных Trk-рецепторов он не имеет тирозинкиназной активности, но на внутриклеточном участке несет домен, активирующий церамидный путь передачи сигнала запуска апоптоза.

BDNF, как и другие нейротрофины, является полипептидным фактором (13,6 кДа), ответственным за пролиферацию нейронов, дифференцировку и выживание, синаптическую пластичность и процессы памяти и научения. Высоко консервативен, способен димеризоваться с образованием активной формы. Содержание BDNF в структурах мозга млекопитающих значительно выше, чем NGF (Ещенко и др., 2013).

Высока экспрессия BDNF в гиппокампе и коре головного мозга. Его клеточное действие осуществляется через два типа рецепторов: высоко аффинные TrkB и низко аффинные рецепторы p75. Секретируемый нейронами и астроцитами BDNF воздействует на нейроны через активации рецептора на мембране аксона. Связывание BDNF инициирует димеризацию TrkB и аутофосфорилирование остатков тирозина на цитоплазматическом домене (Рисунок 4).

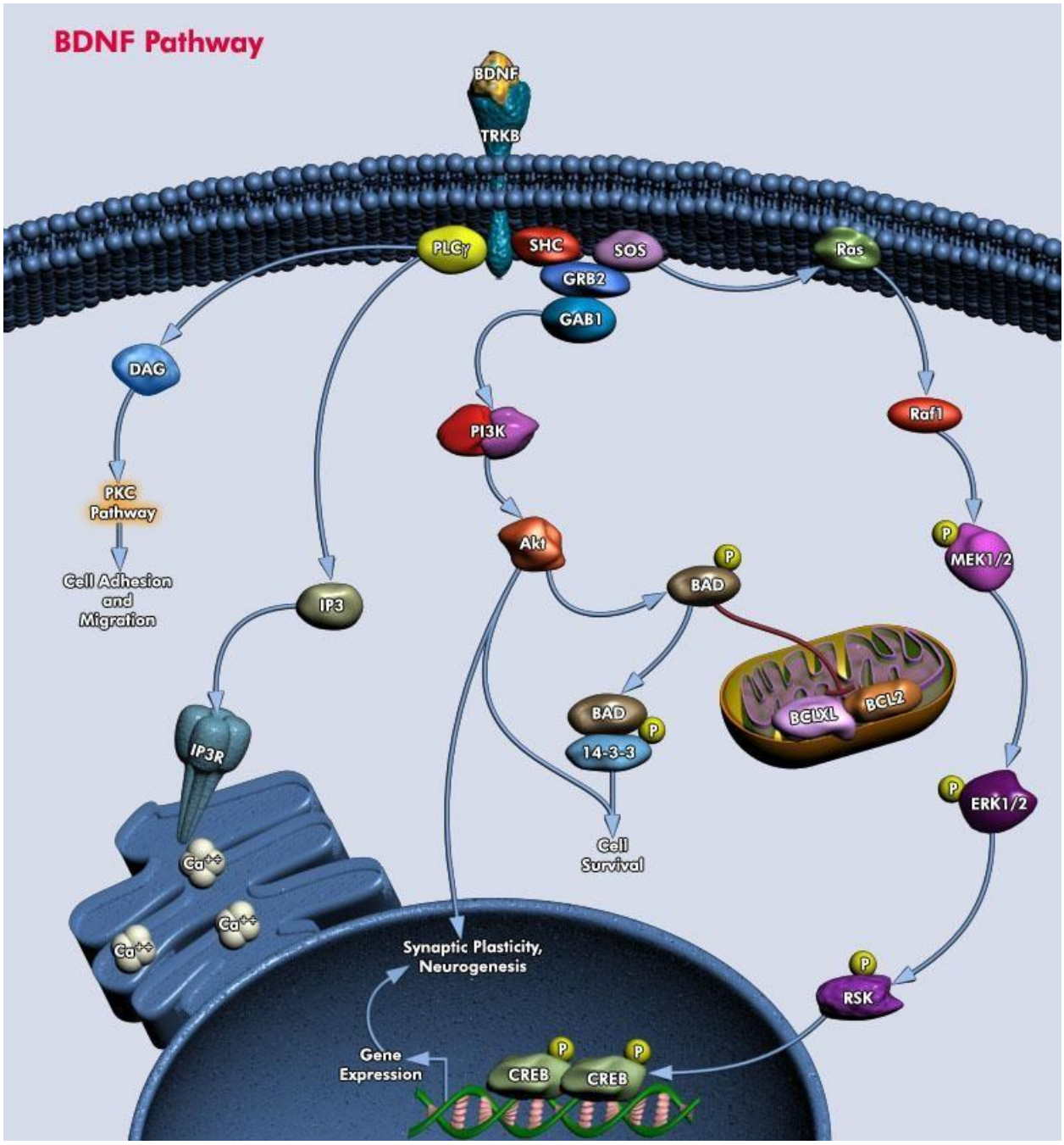


Рисунок 4. Обобщенная схема представлений о сигнальных путях, активируемых связыванием BDNF с TrkB (http://www.qiagen.com). Пояснения в тексте.

Фосфорилированные остатки тирозина становятся сайтами связывания цитоплазматических сигнальных и структурных белков по SH2 домену. Происходит индукция сборки клатринового опушения и микротрубочек, опосредующая интернализацию BDNF-рецепторного комплекса и ретроградный транспорт в тело нейрона с последующей активацией множества мишеней (Bariohay et al., 2005)

Связывание комплекса GRB2 по SH2 домену приводит к активации ГТФазы Ras (Stenqvist et al., 2005). Ras, в свою очередь, активирует PI3K и c-Raf/ MEK/ERK1/2 путь. PI3K может быть также активирована через адаптерные белки SHC и Gab1. PI3K непосредственно регулирует определенные пути выживания клетки путем активации киназы Akt. Среди мишеней ERK1/2 индуцибельный транскрипционный фактор c-Fos, регулятор его транскрипции CREB, HIF1a и другие (Ying et al., 2002).

Регуляция транскрипции BDNF осуществляется адаптивными транскрипционными факторами CREB, NF-κB (Herdegen et al., 1998, Knapska et al., 2004). Также обнаружены механизмы контроля экспрессии BDNF на уровне трансляции: при интенсивной стимуляции глутаматных NMDA рецепторов входящий кальций активирует eEF2 киназу, фосфорилирующую эукариотический фактор элонгации 2, приводя к его инактивации и, следовательно, остановке трансляции. Блокада NMDA рецепторов кетамином up-регулировала трансляцию BDNF (Lester et al., 2012), что отражено на Рисунке 5.

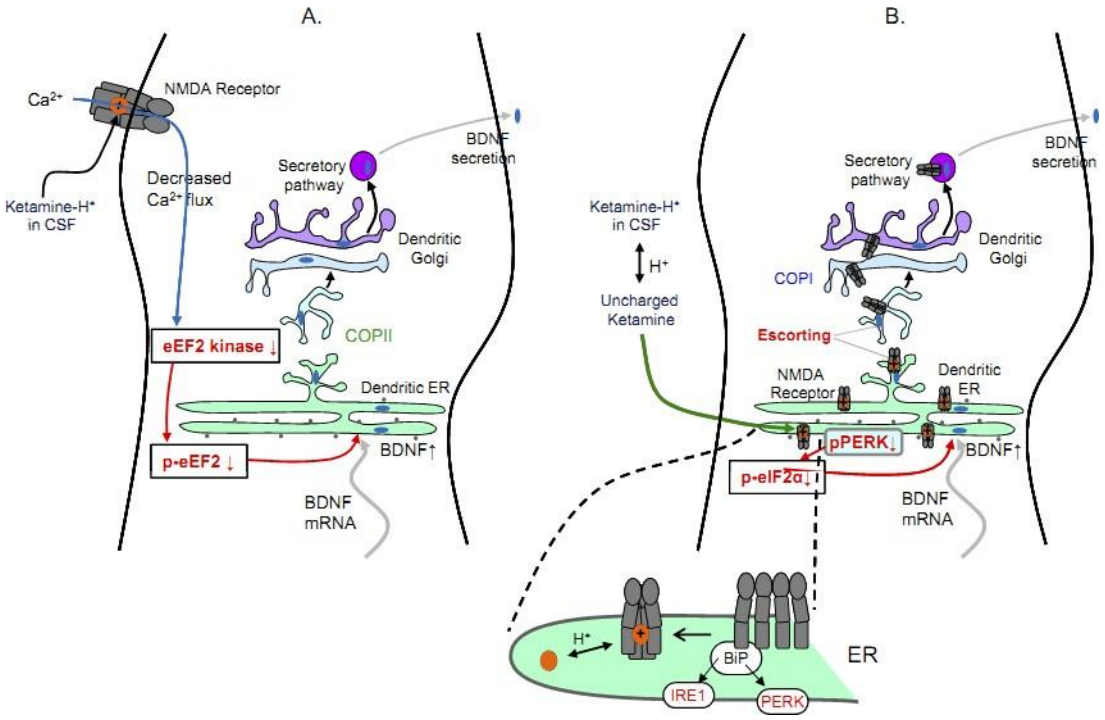


Рисунок 5. Схема, демонстрирующая опосредованный кальцием контроль трансляции BDNF в дендритах глутаматэргических нейронов (A), влияние блокады NMDA рецепторов кетамином на трансляцию BDNF (B) (Lester et al., 2012).

Таким образом, литературные данные указывают на то, что белок BDNF играет ключевую роль в регуляции процессов гибели/выживания нейронов мозга вообще, а также может быть задействованы в реализации нейропротективного действия посткондиционирования умеренной гипобарической гипоксией, в частности.

2.06. Пентозофосфатный путь как ключевой регулятор антиоксидантных функций

На основании косвенных данных об эффектах умеренной гипоксии, а именно о связанной с гипоксией резистентности опухолевых клеток к радиотерапии (Meijer et al., 2014), нами было сделано предположение о том, что среди мишеней регуляции гипоксией/реоксигенацией важную роль может занимать пентозофосфатный путь (ПФП) метаболизма глюкозы. Важной особенностью данного метаболического пути является то, что его ферменты (в большей степени глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ), являющаяся первым скорость-лимитирующим ферментом ПФП, но такжже и 6-фосфоглюконатдегидрогеназа) являются в мозге основными генераторами восстановленного НАДФ (Ulusu et al., 2003), существенно превосходя по эффективности альтернативные малик-энзимный и изоцитрат дегидрогеназный пути (Ещенко и др., 2013). В связи с тем, что без НАДФН невозможно восстановление таких антиоксидантов как тиоредоксины и глутатион (Dringen, 2000, Fernandez-Fernandez et al., 2012, Cheng et al., 2009, Deponte, 2013), ПФП играет ведущую роль в обеспечении эффективности антиоксидантных систем мозга и поддержания нормального окислительно-восстановительного статуса клетки. На Рисунке 6 представлена схема вовлечение этого метаболического пути в обеспечение эффективной антиоксидантной защиты мозга.

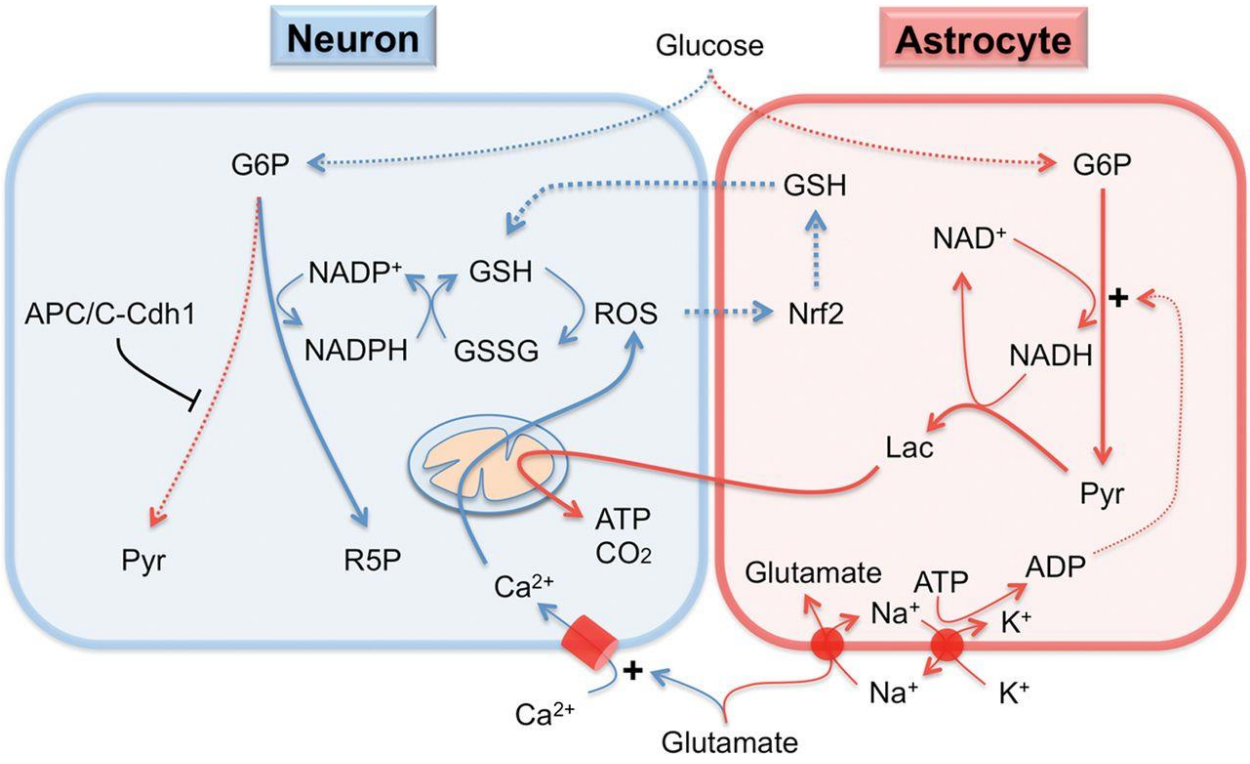


Рисунок 6. Обобщенная схема представлений о вовлечении пентозофосфатного пути в процессы функционирования глутатионовой антиоксидантной системы мозга (Fernandez-Fernandez et al., 2012).

Так как в основе постгипоксического/ишемического повреждения клеток мозга лежит сопряженная с реоксигенацией/реперфузией чрезмерная генерация АФК и, как следствие, каскадное свободнорадикальное повреждение макромолекул, ведущее к запуску апоптотических процессов и сопровождающее некротическим повреждением (Maiti et al., 2006, Nita et al., 2001, Sugawara & Chan, 2003, Sanderson et al., 2013), поддержание процессивности систем утилизации АФК критично для реализации защитных функций.

В связи с этим вопрос о вовлечении ПФП в обеспечение защитных реакций мозга на гипоксию и последующую реоксигенацию является крайне важным как для понимания эндогенных механизмов адаптации мозга, так и представляет собой перспективное направление для таргетной терапии постгипоксических состояний. Поэтому изучение возможной взаимосвязи между гипоксией/реоксигенацией в различных режимах, ключевым регулятором клеточного ответа на гипоксию, HIF1, пентозофосфатным путем и опосредованными им функциями оказалось в центре внимания при выполнении настоящей работы.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.01. Материалы

Работа выполнена на взрослых самцах крыс линии Wistar весом 220-240г (n=441) из Биоколлекции Института Физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Эксперименты были проведены согласно требованиям, сформулированным в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/EEC) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П.Павлова РАН. Все измерения проведены минимум в двух повторностях с использованием материалов из независимых экспериментов. В каждой экспериментальной группе (контрольной или опытной) на каждой временной точке использовано не менее 6 животных.

3.02. Модель гипобарической гипоксии

Гипобарическая гипоксия – гипоксическое воздействие, вызываемое общим уменьшением атмосферного давления в окружающей среде. Создаваемая в барокамере гипобарическая гипоксия может рассматриваться как имитация подъема на соответствующую высоту в горах. В наших исследованиях была использована модель гипобарической гипоксии, создаваемой в барокамере проточного типа (Рисунок 7), в трех режимах: тяжелая повреждающая гипоксия (ТГ), ТГ в сочетании с последующей трехкратной умеренной гипобарической гипоксией (3УГГ), используемой в качестве посткондиционирующего воздействия (ПостК), а также 3УГГ без предварительной ТГ, используемая в качестве HIF1-позитивной модели для анализа зависимости между активностью этого фактора транскрипцией гена ключевого фермента ПФП – Г6ФДГ.

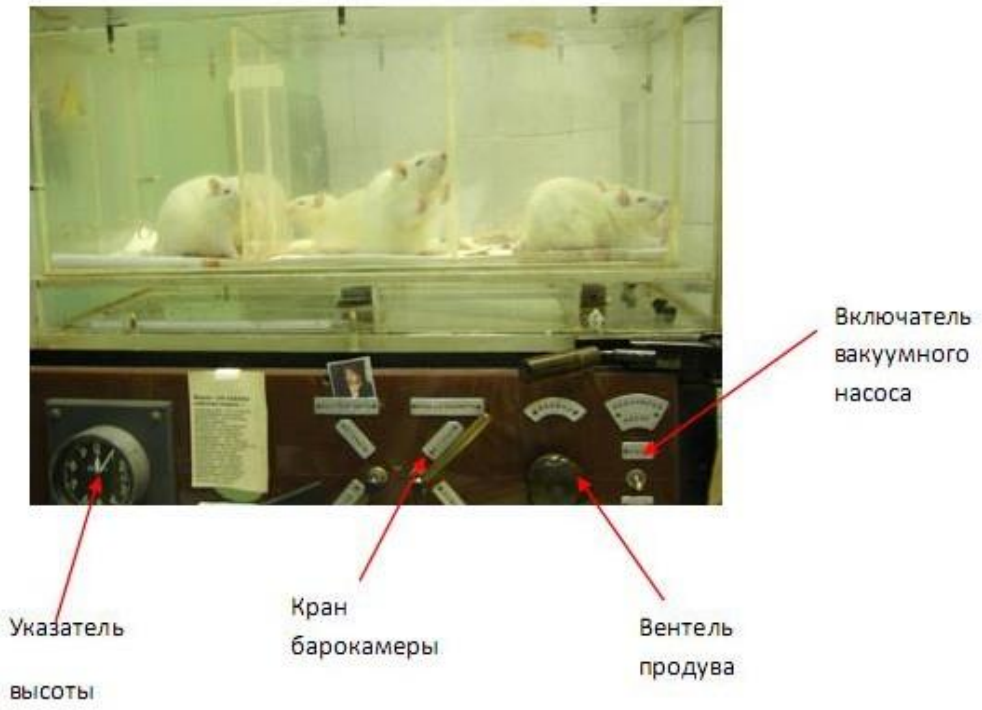


Рисунок 7. Барокамера проточного типа для создания гипобарической гипоксии в различных режимах.

3.02.01. Режим тяжелой повреждающей гипоксии

Для создания условий ТГ животных помещали в барокамеру проточного типа (Рисунок 7), снижали давление до 180 мм.рт.ст (содержание кислорода 5%). Длительность воздействия 3 часа. «Подъем» на соответствующую высоту производили, начиная с 760 мм.рт.ст и далее ступенчато понижали давление на 100 мм.рт.ст. каждую минуту до достижения отметки в 180 мм.рт.ст. Данный способ подъема помогал избежать резкого перепада давления, позволяя крысам адаптироваться. Продув камеры воздухом осуществляли каждые 20 минут с целью поддержания нормального соотношения газов и избежания гиперкапнии. Примерно пятьдесят процентов животных не выживали в условиях ТГ и, соответственно, они были исключены из опыта.

Декапитацию животных для взятия головного мозга осуществляли гильотиной непосредственно после сеанса ТГ (для анализа продуктов ПОЛ) или через 1, 2 и 4 дня после ТГ. Животные контрольной группы, не подвергавшиеся гипоксическому воздействию, проходили соответствующие процедуры пребывания в барокамере и были выведены из эксперимента через 1 день после введения ингибитора HIF1 либо инъекционного контроля (смесь ДМСО : NaCl в пропорции 1:1, см. раздел 3.03) . После декапитации на холоде

изолировали головной мозг, выделяли гиппокамп и неокортекс и быстро замораживали в жидком азоте либо помещали в фиксирующий раствор (FineFix, Millestone, Италия) для последующего проведения гистологического анализа.

3.02.02. Режим посткондиционирования трехкратной умеренной гипобарической гипоксией

С целью ПостК применяли умеренную гипобарическую гипоксию. При этом давление в барокамере составляло 360 мм рт.ст. (содержание кислорода 10%). Как и при ТГ, снижение давления в барокамере проводили ступенчато.

Крыс подвергали умеренной гипобарической гипоксии трижды (продолжительность воздействия - 2 часа), с интервалом 24 часа. Первый сеанс осуществлялся через 24 часа после ТГ, поскольку ранее в нашей лаборатории было показано, что это наиболее эффективный режим посткондиционирования (Rybnikova et al., 2012). Декапитацию животных для взятия головного мозга осуществляли гильотиной через 1 день после первого или третьего сеансов ПостК. Животные контрольной группы, не подвергавшиеся гипоксическому воздействию, проходили соответствующие процедуры пребывания в барокамере и были выведены из эксперимента через 1 день после введения ингибитора HIF1 либо ДМСО. Извлекали мозг, выделяли гиппокамп и неокортекс и быстро замораживали в жидком азоте либо, для проведения гистологического анализа, помещали в фиксатор.

3.02.03. Режим трехкратной умеренной гипобарической гипоксии

Для проверки взаимосвязи между гипоксией/реоксигенацией, активностью HIF1 и экспрессией мРНК Г6ФДГ использовали HIF1-позитивную модель трехкратной умеренной гипобарической гипоксии (Samoilov et al., 2015). Условия 3УГГ создавались в барокамере посредством понижения давления до 360 мм рт.ст. (содержание кислорода 10%). Крыс подвергали умеренной гипобарической гипоксии трижды (продолжительность воздействия - 2 часа), с интервалом 24 часа. Декапитацию животных для взятия головного мозга осуществляли гильотиной через 3 и 24 часа после третьего сеанса УГГ. Животные контрольной группы, не подвергавшиеся гипоксическому воздействию, проходили соответствующие процедуры пребывания в барокамере и были выведены из эксперимента через 5 и 27 часов после введения ингибитора HIF1 либо через 27 часов после введения

ДМСО. Из извлеченного мозга выделяли гиппокамп, гомогенизировали в тризоле (TRIzol™ Reagent, Thermo Fisher Scientific) для дальнейшей экстракции общей РНК и хранили при температуре +4^{0}С.

3.03. Постановка экспериментов с использованием ингибитора HIF1

С целью оценки вклада гипоксия-индуцируемого фактора-1 (HIF1) в изучаемые процессы использовали ингибитор HIF1 - топотекан (Ban et al., 2011, Rapisarda et al., 2009).

Топотекан растворяли в смеси ДМСО : 0,09 % NaCl в пропорции 1:1 и вводили животным внутрибрюшинно в расчете 5 мг/кг веса за 10 минут до каждого гипоксического сеанса (группы тяжелая гипобарическая гипоксия + ингибитор (ТГ + HIF1i) либо трехкратная умеренная гипобарическая гипоксия + ингибитор (3УГГ + HIF1i)).

В качестве инъекционного контроля использовали смесь ДМСО : 0,09 % NaCl (группы ТГ, ТГ + посткондиционирование (ПостК) либо 3УГГ). Не подвергавшимся гипоксическим воздействиям крысам также вводили топотекан для ингибирования HIF1 (контроль + HIF1i) либо смесь ДМСО : 0,09 % NaCl (контроль).

3.04. Гистохимические методы

3.04.01. Гистологическая обработка ткани и изготовление парафинизированных срезов мозга

Образцы ткани мозга фиксировали в молекулярном фиксаторе FineFix (разведение: 28 мл фиксатора + 72 мл 96% этанола, Milestone, Italy) в течение 24 часов при температуре +4^{0}С. Затем образцы обезвоживали, проводя через этанол возрастающих концентраций (50%→70%→80%→96%→96% по 1 часу инкубации в каждом). На ночь образцы ткани оставляли в бутаноле. Затем материал проводили через 2 порции ксилола (по 30-40 мин), помещали в парафин (2 смены парафина, по 1 часу в каждой) в термостате при температуре +56^{0}С и изготавливали парафиновые блоки.

На ротационном микротоме (Reichert, Austria) изготавливали серийные срезы мозга во фронтальной плоскости толщиной 7 мкм на уровне -2.80 мм от брегмы (Paxinos, 1986). Для изучения были выбраны CA1 поле гиппокампа и второй слой сенсомоторной коры в связи с тем, что эти структуры считаются образованиями мозга, наиболее уязвимыми к гипоксии (Kumar et al. 2016). Полученные срезы монтировали на предметные стекла,

обработанные поли-лизином. Далее срезы депарафинизировали в ксилоле (2 смены по 5 мин) и подвергали регидратации в спиртах (96% - 96% - 96% - 70% по 5 мин в каждом).

Для оценки содержания и локализации белков интереса в структурах мозга использовали иммуногистохимический метод, а для анализа интенсивности апоптотических процессов – метод TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).

3.04.02. Иммуногистохимический метод детекции белков

Иммуногистохимический метод – метод выявления точной локализации того или иного клеточного или тканевого компонента (антигена) in situ благодаря связыванию его с специфичными меченными антителами.

3.04.02.01. Иммуногистохимическое окрашивание срезов мозга

Содержание белков Bcl-2, BDNF, HIF1a, эритропоэтина, Г6ФДГ в CA1 поле гиппокампа и втором слое неокортекса крыс определяли методом непрямого окрашивания с использованием авидин-биотинового комплекса – ABC (аббревиатура от английского Avidin and Biotinylated horseradish peroxidase macro-molecular Complex), предполагающим использование первичных (антиген-специфичных) и вторичных (специфичных к первичным антителам) антител (Рисунок 8).

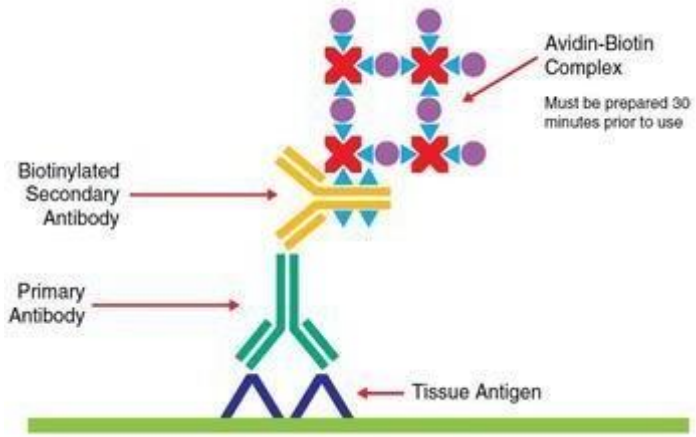


Рисунок 8. Схема, иллюстрирующая принцип ABC метода непрямого иммуногистохимического окрашивания.

Первичные антитела реагируют с антигенами ткани. Связанные с меткой вторичные антитела специфически взаимодействуют с первичными, которые для вторичных антител являются антигеном. Метод значительно чувствительнее прямого, так как с каждой молекулой первичных антител связывается несколько молекул вторичных антител, а первичные антитела не несут на себе лишнего «груза» в виде метки, благодаря чему легче и быстрее проникают в ткани.

Использовали следующие реактивы:

1) Фосфатный буфер: 0,02M Na_2HPO_4, 0,003M NaH_2PO_4, 0,14M NaCl (pH 7,4).

2) Цитратный буфер (0.01M , pH 6.0).

3) Нормальная сыворотка: 1% BSA (bovine serum albumin) буфер, содержащий также 0,3 % тритона X-100, 0,2 % бацитрацина, 0,1 % NaN_3 в PBS (Vectastein ABC kit, Vector Laboratories, Inc, USA).

4) Первичные поликлональные кроличьи антитела против белков интереса (разведение в PBS 1:50), Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA.

5) Вторичные биотинилированные антитела (разведение в PBS 1:200), Vectastein ABC kit, Vector Laboratories, Inc, USA.

6) Авидин-биотиновый комплекс (ABC), Vectastein ABC kit, Vector Laboratories, Inc, USA. Приготовление: компонент А (авидин) добавляли в фосфатный буфер (разведение 1:100) перемешивали; добавляли компонент В (биотин) в смесь (разведение 1:100), перемешивали. Реактив ABC готовили за 30 мин до использования.

7) Диаминобензидиновый набор (DAB substrate kit for peroxidase, Vector Laboratories, Inc, USA), содержащий следующие компоненты буфер, 3,3-диаминобензидин, H_2O_2 (30%), используемые в пропорции 50:100:50 мкл, соответственно, на 2.5 мл H_2O.

Эксперименты проводились по следующему протоколу:

После депарафинизации срезы отмывали в фосфатном буфере и осуществляли демаскировку антигена кипячением в цитратном буфере под давлением в течение 1 мин. Затем отмывали срезы в фосфатном буфере 2 раза по 5 мин. и обрисовывали гидрофобным маркером, предотвращающим растекание реактива. Далее блокировали неспецифическое связывание. Для этого на срез наносили нормальную сыворотку и оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Жидкость добавляли по каплям из расчета 40 мкл раствора на срез. Затем препараты в течение ночи инкубировали с первичными поликлональными

кроличьими антителами к исследуемым белкам (Bcl-2, BDNF, HIF1a, эритропоэтин, Г6ФДГ) во влажной камере при температуре +4°С. После инкубации стекла отмывали в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Затем обрабатывали срезы вторичными биотинилированными антителами в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере и отмывали в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Далее наносили раствор универсальной системы авидин-биотинового комплекса (реактив № 6) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После инкубации с АВС-комплексом образцы промывали в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Для визуализации реакции связывания антитела с антигеном использовали диаминобензидиновый набор. Раствор готовили ex tempore и наносили на срезы для выявления иммунопозитивной реакции, после чего препараты отмывали в дистиллированной воде (3 раза по 5 мин), сушили на воздухе и заключали под покровное стекло в глицерин-желатиновый гель (1:1).

3.04.02.02. Количественная обработка результатов иммуногистохимического окрашивания с использованием системы компьютерного анализа изображений

Анализ препаратов проводили с помощью морфометрической установки, позволяющей осуществить косвенную оценку изменения количества исследуемых белков по средней оптической плотности (интенсивности окраски) иммунопозитивных клеток относительно фона (Рисунок 9). Морфометрическая установка состояла из светового микроскопа Jenaval (Carl Zeiss, Germany), цифровой камеры Baumer CX05c (Baumer Optronic, Germany) и компьютера IBM PC с программным обеспечением ВидеоТест Мастер Морфология (разработка ООО “Видео Тест”, Санкт-Петербург). Используя программу ВидеоТест Мастер Морфология, определяли среднюю оптическую плотность клеток относительно фона. Анализировали иммунопозитивные клетки в поле зрения площадью 460х340 мкм (объектив 40х). Для каждого животного анализировали по 6 гистологических препаратов, усредняя значения для каждой области мозга с одного поля зрения конкретной области мозга на срезе. Результаты обрабатывали с помощью пакетов анализа данных STATISTICA 7.0 Stat Soft, Inc и Microsoft Excel’2003, использовали непараметрический критерий Манн-Уитни (Mann-Whitney U-test). Изменения считали достоверными при $p \leq 0,05$. Все результаты представлены в виде среднего арифметического ± SEM (standard error of the mean) и выражены в процентах от контроля.

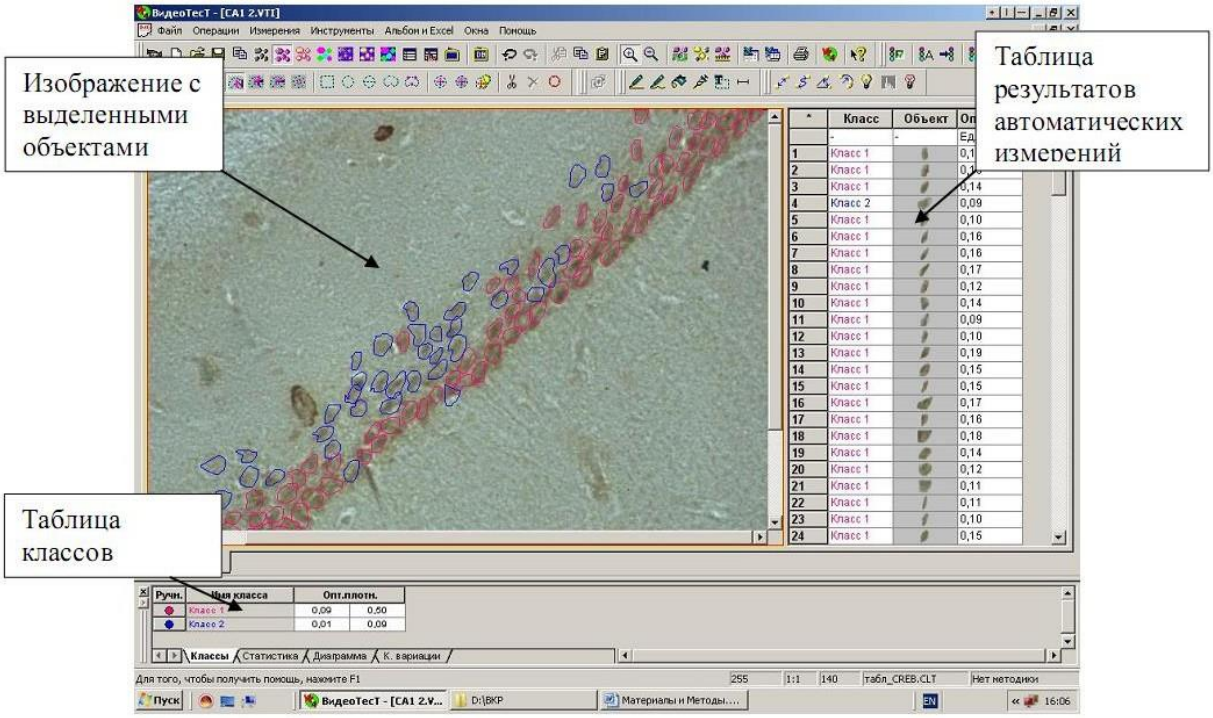


Рисунок 9. Пример результата автоматического анализа изображения среза поля CA1 гиппокампа с использованием программы ВидеоТест Мастер Морфология.

3.04.03. Детекция апоптотических клеток методом TUNEL

Количество нейронов, подверженных апоптотическим процессам, оценивали в CA1 поле гиппокампа и втором слое неокортекса крыс через 4 дня после ТГ или, соответственно, через 1 день после третьего сеанса постобусловливания. dUTP концевое мечение ДНК терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазой (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL) проводили на парафиновых срезах (7 мкм) мозга крыс с использованием коммерческого набора NeuroTACs (R&D Systems, Великобритания), визуализируя фрагментацию ДНК, специфичную для апоптоза.

После депарафинизации срезы мозга инкубировали с реагентом NeuroPore в течение 60 минут при комнатной температуре. После промывки срезов в PBS их погружали в реакционную смесь, содержащую TdT и биотинилированные нуклеотиды, и инкубировали в течение 1 часа при $+37^0$C. Реакцию останавливали посредством инкубации в TdT Stop Buffer. После трех промывок в PBS секцию инкубировали с коньюгатом стрептавидина и пероксидазы хрена в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакцию

визуализировали диаминобензидином. Далее срезы были подкрашены Blue Counterstain для визуализации всех клеток, и секции были высушены на воздухе, смонтированы и проанализированы с использованием системы анализа изображений.

Число TUNEL-положительных клеток подсчитывали в поле CA1 гиппокампа и втором слое сенсомоторной коры, используя программное обеспечение Видеотест Master Morphology. Из каждого мозга анализировали четыре среза; одно поле каждой исследуемой области мозга измерялось на каждый срез.

3.05. Иммуноблоттинг

Для проверки специфичности используемых при иммуногистохимическом анализе антител использовали метод иммуноблоттинг, позволяющим сравнить массу визуализируемых белков с массой белка интереса и сделать вывод о специфичности реакции.

3.05.01. Пробоподготовка

Крыс декапитировали и быстро на холоде извлекали мозг. Чтобы исключить действие протеаз, извлеченный мозг незамедлительно замораживали при температуре -80 °C, и дальнейшее выделение интересующих областей вели при отрицательной температуре на замораживающем столике. Для одной пробы выделяли участок гиппокампа и неокортекса примерно по 30 мг и гомогенизировали в лизирующем буфере (0,05M трис-HCl (pH8), 0,15M NaCl, 1% тритон X-100, 1%, 0,001M дитиотриэтол, 0,01M NaF, 0,01M Na_3VO_4, каждый из компонентов протеазингибирующего коктейля Proteas Inhibitor Coctail Kit (MP Biomedicals, USA) – AEBSF, ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия, леупептин, пепстатин А (разведение 1:40)).

Гомогенизацию вели в стеклянных гомогенизаторах на ледяной бане в 300 мкл лизирующего буфера, далее осуществляли экстракцию белков при +4°C в течение 20 мин, периодически перемешивая. Переносили в пробирки для центрифугирования и смывали остатки ещё двумя порциями буфера по 300 мкл. Ценрифугировали полученный лизат на уравновешенной центрифуге Microfuge в течение 25 мин при 15000g. Аккуратно отбирали надосадочную жидкость в новую пробирку. После центрифугирования отбирали супернатант и кипятили на водяной бане с трехкратным объемом буфера нанесения (0,0625M трис-HCl (pH6,8), 2%SDS, 25% глицерин, 0,01% бромфенол синий, 5% бета-

меркаптоэтанол) в отношении 2:1 в течение 5 мин, далее быстро охлаждали во льду. После расфасовки пробы хранили при -20ºС, не размораживая вплоть до использования при электрофоретическом разделении. Параллельно отбирали 2 аликвоты супернатанта по 6 мкл для определения концентрации белка методом Бредфорда в стеклянные пробирки, в которых предварительно наливали по 1 мл дистиллированной воды.

3.05.02. Определение концентрации белка по методу Бредфорда

Метод Бредфорда основан на взаимодействии белка с кислым красителем Кумасси G-250. Концентрация образующегося окрашенного комплекса пропорциональна концентрации белка в пробе. Поглощение раствора измеряли спектрофотометрически при длине волны 590 нм против соответствующего контроля. Общую концентрацию белков в каждой пробе необходимо знать для того, чтобы при проведении электрофоретического разделения в каждую дорожку наносить эквивалентные количества белка.

Для колориметрического анализа использовали реактив Кумасси – 6% краситель Кумасси G-250 в 3% надхлорной кислоте. Для расчёта концентрации белка в исследуемой пробе 6 мкл пробы растворяли в 1 мл воды, добавляли 1 мл реактива Кумасси и перемешивали. Через 20 мин измеряли поглощение при длине волны 590 нм против соответствующего контроля (1 мл воды + 1 мл реактива). Каждую пробу измеряли в двух повторностях. Концентрацию белка в пробе рассчитывали по калибровочному графику и учитывали при определении объема пробы, который будет использован для электрофореза. Для построения калибровочной кривой использовали стандартный раствор белка – BSA. Затем прибавляли 1 мл реактива Кумасси и перемешивали.

3.05.03. Электрофорез белков в ПААГ по методу Лэммли

Подготовленные экстракты нервных клеток, содержащие белки интереса, разделяли электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) - система Лэммли, на трис-глициновом буфере (pH 8.3) в присутствии 0.1% SDS. Электрофорез проводили в камере Mini-PROTEAN®4 Cell (Bio-Rad, USA). Приготовление ПААГ и других необходимых растворов осуществляли согласно рекомендации фирм Bio-Rad и Abcam. Трис-глициновый буфер для электрофореза (pH~8,3) готовили из стокового 10-кратного раствора (15,15 г триса, 72 г глицина, 5 г SDS, бидист. вода до 500 мл) разведением в 10 раз. При нанесении проб на ПААГ, учитывали рассчитанную общую концентрацию белка в пробе, чтобы было

нанесено одинаковое количество белка. В качестве маркеров молекулярной массы использовали окрашенные белки-стандарты ColorPlus (BioLabs, USA). Электрофорез проводили при 160 v - концентрирование, 5 мин, и далее разделение I = 30мА на 1 гель, U = 200 V в течение 35 мин.

В некоторых случаях для контроля качества разделения белков электрофорезом (если гель не использовался далее для блоттинга) и для контроля качества переноса белков из ПААГ на мембрану (после блоттинга) проводили визуализацию результатов электрофореза в геле, для чего белки окрашивали 0,1%-ным красителем Кумасси G-250 в течение 30 мин. После окрашивания гель отмывали от несвязавшегося красителя 5%-ной уксусной кислотой с этанолом (все процедуры проводили на шейкере).

3.05.04. Электроперенос белков с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану

Разделенные электрофоретически белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану, используя, как и для электрофореза, аппарат Mini-PROTEAN, но в модификации для блоттинга. Для последующего переноса разделяющий ПААГ, содержащий белки, вымачивали в охлажденном буфере для переноса (25 мМ трис, 192 мМ глицин, pH 8,3) в течение 30 мин, смачивали этим же буфером фильтры Ватман и нитроцеллюлозную мембрану Protran BA85 (Whatman, Germany), выкладывали их последовательно на кассете для блоттинга, плотно совместив ПААГ и мембрану, вставляли кассету в камеру, и, залив буфером, запускали блоттинг. Электроперенос вели в течение 1 – 1,5 часов при силе тока I = 1мА на см2 мембраны (100 – 150 V, 350 mA) при постоянном перемешивании и охлаждении.

О полноте переноса судили по переносу предварительно окрашенных белков-стандартов. Для проверки качества переноса белков на мембрану использовали окрашивание Ponceau S Red (MP Biomedicals, USA), выявлявшее полосы сорбирования, затем отмывали дистиллированной водой. Процедуры окрашивания и отмывки проводили на шейкере.

3.05.05. Иммунодетекция белков на мембране

Все процедуры окрашивания и отмывки проводили на шейкере. Мембрану промывали в TBS-T буфере pH 7.6 два раза по 5 мин. Буфер TBS-T (Tris-Buffered Saline Tween-20) готовили из стокового 10-кратного раствора TBS (0,2M трис-HCl, 1,3M NaCl, pH

7,6) разведением в 10 раз и добавлением Tween до 0,1%. Затем в течение 1 часа проводили блокировку мест неспецифической сорбции антител на мембрану с помощью блокирующего буффера: 3% BSA (Sigma, USA) в TBS (15 мл на мембрану), после чего дважды ополаскивали TBS-T.

Нитроцеллюлозные мембраны затем последовательно инкубировали в течение часа в растворах, содержащих первичные кроличьи антитела, специфичные к HIF1a, эритропоэтину, Г6ФДГ, Bcl-2, BDNF (разведение 1:500 - 1:1000 или 0,2-0,4 мкг/мл, Santa Cruz Biotechnology, USA) и вторичные противокроличьи антитела (1:1000 - 1:2000, Dako, Germany). В качестве контроля использовали антитела к актину-бета (Sigma, USA). Инкубацию с антителами I, растворёнными в 15 мл TBS, содержащего 0,3%, проводили в течение 1-2 часов при комнатной температуре, отмывали от не связавшихся антител в TBS-T 2 раза по 10 мин. Инкубация со вторичными, конъюгированными с пероксидазой хрена, антителами, растворёнными в 15 мл TBS продолжалась затем около 1 часа. Далее мембрану тщательно отмывали в TBS-T 2 раза по 10 мин.

Визуализацию белков на нитроцеллюлозе хемилюминесцентным методом проводили с использованием наборов ECL - Enhanced chemiluminescence: STAR-GLO (MP Biomedicals, USA) или SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific, USA). Эти системы содержат примерно 0,8% люминола, 0,07% кумаровой кислоты и 0,03% перекиси водорода. Для обнаружения люминесценции смешивали растворы реагента 1 и реагента 2 из набора в соотношении 1:1 из расчета 0,125 мл/см2 и наносили на мембрану на 1 мин при комнатной температуре. Затем в темноте совмещали блот с рентгеновской пленкой Kodak и экспонировали в течение от 30 секунд до 5 минут в зависимости от силы свечения. Дальнейшие действия также осуществляли в темноте. Рентгеновскую плёнку проявляли в течение 2-5 мин. Ополаскивали водой и фиксировали 5 мин в фиксаже (из готовых наборов). Далее пленки высушивали и сканировали. Используя программу ImageJ, производили определение количества исследуемых белков в образцах по интегральной оптической плотности, нормируя на интегральную оптическую плотность полос, соответствующих бета-актину.

Результаты, полученные методом иммуноблоттинг, в диссертации не представлены, так как данный вспомогательный этап работы осуществлялся для проверки специфичности антител. Используя этот метод, мы смогли убедиться в высокой специфичности коммерческих антител, которые применяли в своих экспериментах.

3.06. Выделение и электрофоретический анализ фрагментации ДНК для определения интенсивности процессов клеточной гибели

Для оценки процессов клеточной гибели выделяли ДНК из гиппокампа и неокортекса крыс, переживших ТГ либо ТГ в сочетании с гипоксическим посткондиционированием, при помощи экстрагирующего буфера, содержащего 2% детергент цетилтриметиламмоний бромид, 1,4М NaCl, 0,02М ЭДТА (pH 8.0), 0,01М Трис-HCl (pH 8.0) (инкубация 30 минут при 60ºС). Пробы отмывали от липидных примесей хлороформом, после чего ДНК осаждали изопропанолом и обессоливали 70% этанолом. Осадок после сушки растворяли в воде. Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в горизонтальном 1 % агарозном геле (7 см/8 см/0.3 см) в буфере ТАЕ (0.04 М трис-ацетат, 0.002 М ЭДТА, pH 8.0). Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически при помощи прибора BioPhotometer plus (Eppendorf, Germany), предоставленного Ресурсным Центром «Обсерватория экологической безопасности» Научного парка Санкт-Петербургского Государственного Университета.

Для выявления ДНК в агарозный гель вводили бромистый этидий до конечной концентрации 0,4 мкг/мл. В карманы геля вносили раствор, содержащий 5 мкг ДНК, краситель бромфеноловый синий и утяжелитель (20% глицерин). В качестве стандартов использовали GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA). Электрофорез проводили при 50 В в течение 2,5 часов. Детекцию осуществляли с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc с ручным управлением в ультрафиолетовом свете при длине волны 310 нм.

3.07. Спектрофотометрический метод определения содержания общего белка

При проведении измерения активности Г6ФДГ, количества НАДФН, тиоловых групп, общего глутатиона, ТБК-активных продуктов параллельно осуществляли измерение количества общего белка с целью последующий нормировки данных. Количество белка в каждой пробе определяли непосредственно перед экспериментом с помощью фотометра Biophotometer plus Eppendorf (Eppendorf, Германия). 20 мкл пробы разводили дистиллированной водой до конечного объема 1 мл. Оптическая плотность измерялась на длинах волн 260, 280 и 340 нм согласно стандартному протоколу Eppendorf. Результаты определения концентрации белка выражали в мг/мл раствора. Измерения проводились на базе ресурсного центра «Обсерватория экологической безопасности» Научного Парка СПбГУ.

3.08. Определение активности Г6ФДГ

Для определения активности глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г6ФДГ) в гиппокампе и неокортексе крыс использовали коммерческий набор для колориметрического анализа (MAK015, Sigma-Aldrich).

Образцы ткани гиппокампа или неокортекса весом 20 мг гомогенизировали в 500 мкл холодного фосфатного буфера (pH 6.5-8). Далее гомогенаты переливали в микропробирки и центрифугировали в течение 10 минут при 15 000g для удаления нерастворимого материала. После этого 200 мкл супернатанта переливали в чистые пробирки и отдельно отбирали 50 мкл супернатанта для измерения общего количества белка. По 20 мкл пробы в двух параллелях наносили в лунки 96-луночного планшета и доводили до конечного объема 50 мкл, используя Assay Buffer.

Для детекции активности Г6ФДГ в каждую лунку вносили по 50мкл Master Reaction Mix (46 мкл G6PD буфера: 2мкл G6PDH Substrate Mix: 2мкл G6PDH Developer), перемешивали при помощи горизонтального шейкера в течение 1 минуты, после чего переносили планшет в микропланшетный спектрофотометрический ридер SPECTROstar Omega (BMG Labtech, Germany), термостатируемый при +37°C, и через 2 минуты начинали измерение оптической плотности при длине волны 450 нм. Инкубировали планшет при +37°C с проведением измерений (A450) через каждые 2 минуты в течение 30 минут до достижения значений оптической плотности самого активного образца больше, чем значение самого высокого стандарта.

Активность Г6ФДГ в экстрактах гиппокампа и неокортекса расчитывали по формуле:

Г6ФДГ активность = [НАДН нмоль]/ (Время реакции (мин) * Объём пробы в лунке (мл) * [белка мг/мл])

3.09. Определение количества НАДФН

Количество продукта ПФП - восстановленного НАДФ, в гиппокампе и неокортексе определяли при помощи количественного колориметрического набора (MAK038, Sigma-Aldrich). Для этого 30 мг ткани промывали холодным PBS, гомогенизировали 500 мкл Extraction Buffer, после чего инкубировали в микропробирках на льду в течение 10 минут. Далее образцы центрифугировали в течение 10 минут при 10000g для удаления нерастворимого материала. После этого 150 мкл супернатанта переливали в чистую пробирку и отдельно отобирали 50 мкл супернатанта для определения общего белка.

Далее пробы (по 150 мкл) инкубировали в эпендорфах в течение 30 минут при +60^{o}C, после чего охлаждали на льду и центрифугировали 10 минут при 10 000g для удаления нерастворимого материала. Для детекции использовали Master Reaction Mix (98,5 мкл NADP Cycling Buffer : 1,5 мкл NADP Cycling Enzyme Mix) из расчета 100мкл/на реакцию.

Две аликвоты по 50 мкл из каждой пробы вносили в лунки 96-луночного планшета (в лунки вносили каждую пробу в двух параллелях), добавляли 100 мкл Master Reaction Mix в каждую лунку, перемешивали горизонтальным шейкером и инкубировали 5 минут при комнатной температуре для конвертирования НАДФН в НАДФ. Далее в каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора NADPH Developer и инкубировали при комнатной температуре в течение 4 часов в микропланшетном спектрофотометрическом ридере SPECTROstar Omega (BMG Labtech, Germany), производя измерения оптической плотности при 450 нм каждую минуту. Реакцию останавливалиь добавлением 10 мкл Stop Solution и хорошо перемешав. Окрашивание стабильно в течение 48 часов в герметически закрытом планшете после добавления стоп-раствора.

Количество НАДФН в пробах определяли по калибровочной кривой и выражали в пг/мг белка.

3.10. Экстракция цитозольной фракции из гиппокампа и неокортекса крыс

Для выделения цитозольной фракции гиппокампа и неокортекса крыс с целью дальнейшего анализа количества тиоловых групп, свидетельствующих об окислительно-восстановительном статусе, и общего глутатиона использовали метод дифференциального центрифугирования в растворе сахарозы (Rodrigues and Pellegrino 1986). Фрагмент гиппокампа или неокортекса весом около 50 мг гомогенизировали вручную на льду в системе стекло-стекло в 2 мл 0,3 М раствора сахарозы на 1мМ ЭДТА, 0,2 М Трис-HCl (pH 7,4). Гомогенат центрифугировали в течение 10 минут при 1500g и температуре 4^{o}C.

Супернатант содержал цитозольную фракцию, микросомы и митохондрии. В осадке оставались негомогенизированные клетки, ядра клеток и крупные обрывки клеточных мембран. Супернатант подвергали повторному центрифугированию в течение 20 минут при 9000g и температуре 4^{o}C. Полученный супернатант содержал цитозольную фракцию; его замораживали и хранили при температуре -80^{o}C.

3.11. Измерение содержания восстановленных тиоловых групп и общего глутатиона

Методика основана на реакции восстановленных тиогрупп цистеина в составе белков или глутатиона с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (DTNB) с образованием окрашенного продукта 2-нитро-5-тиобензойной кислоты (TNB) (Рисунок 10), поглощение которого можно детектировать спектрофотометрически на длине волны 412 нм (Akerboom, 1981).

Определение содержания общего глутатиона проводится в безбелковом центрифугате. Для осаждения белка могут быть использованы трихлоруксусная, уксусная, молибденовая, сульфосалициловая и метафосфорная кислоты. Согласно литературным данным, этот этап лучше всего проводить с помощью 2 М перхлорной кислоты, которую добавляют к раствору пробы в соотношении 1:1 по объему. После этого pH пробы доводят до 7 при помощи 2 М гидроксида калия. Специфичность данного метода достигается добавлением в среду глутатион редуктазы, которая восстанавливает окисленную форму глутатиона, что приводит к взаимодействию с DTNB общего количества трипептида (Akerboom, 1981).

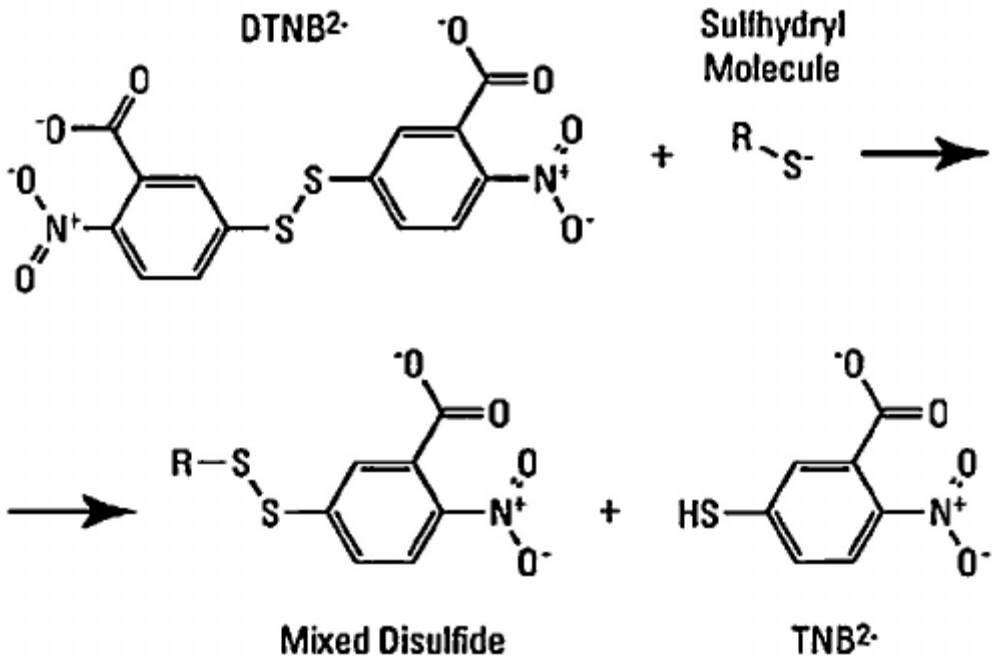


Рисунок 10. Реакция DTNB с тиоловой группой с образованием смеси дисульфида тионитробензоаттиола и стехиометрических количеств 2-нитро-5-тиобензойной кислоты (TNB) (Caldeira et al., 2013).

3.11.01. Измерение содержания тиоловых групп

Для измерения количества тиоловых групп, свидетельствующих о состоянии окислительно-восстановительного статуса в цитозольной фракции гиппокампа и неокортекса, использовали следующие реактивы:

1. 1,5 мг 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты (DTNB, Sigma Ald., США) в 1 мл 0,5 % бикарбонате натрия ($NaHCO_3$).

2. Буфер фосфата калия (0,1 М), содержащий 1 мМ ЭДТА (pH 7,0).

3. Восстановленный глутатион (AppliChem., Германия) для построения калибровочной кривой.

Готовили реакционную смесь из расчета 5 мкл DTNB и 138 мкл фосфатного буфера на лунку. В лунки вносили по 25 мкл 10-кратно разведенной цитозольной фракции гиппокампа или неокортекса крыс либо (для построения калибровочной кривой) раствора восстановленного глутатиона либо H_2O (в качестве фотометрического контроля). В каждую лунку добавляли по 143 мкл реакционной смеси. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометрическом микропланшетном ридере SPECTROstar Nano

(BMG Labtech, Германия) при длине волны 412 нм и комнатной температуре в течение 10 минут.

Количество тиоловых групп в цитозольной фракции гиппокампа и неокортекса определяли по калибровочной кривой и выражали в нмоль/мг белка.

3.11.02. Определение содержания общего глутатиона

Для измерения количества общего глутатиона, основного антиоксиданта мозга, в цитозольной фракции гиппокампа и неокортекса, использовали следующие реактивы:

1. 1,5 мг 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоts (DTNB, Sigma Ald., США) в 1 мл 0,5 % бикарбонате натрия ($NaHCO_3$).

2. Буфер фосфата калия (0,1 М), содержащий 1 мМ ЭДТА (pH 7,0).

3. Восстановленный глутатион (AppliChem., Германия) для построения калибровочной кривой.

4. Глутатион редуктаза (GRed) (Sigma Ald., США) – конечная концентрация в лунке 6 U/мл.

5. 4,5 мг NADPH (AppliChem., Германия) в 1 мл 00,5 % бикарбонате натрия (NaHCO3).

6. Раствор $HClO_4$ (2M);

7. Раствор KOH (2M).

Готовили реакционные смеси 1, содержащую 12,5 мкл NADPH, 5 мкл DTNB и 125 мкл буфера в расчете на 1 лунку, и 2, содержащую необходимый объем GRed, разведенной в 130 мкл буфера. Для депротеинизации проб цитозольной фракции структур мозга крыс к 80 мкл пробы приливали 80 мкл HClO4, инкубировали 10 минут на льду, после чего центрифугировали при 7800g и температуре +4^{o}C в течение 7 минут. Отбирали 100 мкл супернатанта и осуществляли нейтрализацию pH с помощью раствора KOH (80 мкл), после чего повторно центрифугировали при 7800g и температуре +4^{o}C в течение 7 минут. В лунки 96-луночного планшета вносили по 25 мкл супернатанта либо раствора восстановленного глутатиона (для калибровочной кривой) либо H_2O (для фотометрического контроля). Вносили 143 мкл реакционной смеси 1. Быстро вносили 130 мкл реакционной смеси 2.

Измерение линейного увеличения оптической плотности проводили на спектрофотометрическом микропланшетном ридере SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Германия) при длине волны 412 нм в течение 10 минут.

Количество общего глутатиона в цитозольной фракции гиппокампа и неокортекса определяли по калибровочной кривой и выражали в нмоль/мг белка.

3.12. Измерение количества продуктов перекисного окисления липидов

Для определения интенсивности процессов свободнорадикального окисления использовали методы анализа продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гиппокампе и неокортексе. Все процедуры проводили при +4°С. Из головного мозга извлекали гиппокамп и неокортекс, после чего образцы гомогенизировали в 10-кратном объеме смеси хлороформ - метанол (2:1) (с последующей экстракцией липидной фракции по Фолчу (Folch, 1957) для определения диеновых, триеновых коньюгатов, коэффициента Клейна и оснований Шиффа либо в буфере трис-HCl, содержащим KCl (30мМ трис-HCl, 100мМ KCl, pH=7,4) для определения ТБК-активных продуктов.

3.12.01. Анализ диеновых, триеновых конъюгатов и коэффициента Клейна

1мл хлороформной фазы упаривали досуха в водяной бани, растворяли в смеси метанол – гексан (5:1) и с использованием спектрофотометрического микропланшетного ридера SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Германия) определяли содержание диеновых и триеновых конъюгатов спектрофотометрически при 233нм и 274нм соответственно. Количество выражали в единицах оптической плотности, нормированных на количество общих фосфолипидов. Кроме этого, регистрировали оптическую плотность липидного экстракта при 215нм и рассчитывали индекс Клейна I=E233/E215, характеризующего степень окисленности липидов.

3.120.2. Измерение количества оснований Шиффа

Из липидного экстракта отбирали 1мл (0,5мл), выпаривали досуха и растворяли в хлороформе. Содержание Шиффовых оснований определяли флюориметрическим методом с помощью спектрофлуориметрического планшетного ридера FLUOstar Omega (BMG Labtech, Германия), предоставленного Ресурсным Центром «Обсерватория экологической безопасности» Научного парка Санкт- Петербургского Государственного Университета.

Измерения проводили при максимуме возбуждения 365нм и максимуме испускания 425 нм, выражая в относительных единицах флюоресценции, соотнесённых к общему количеству фосфолипидов.

3.12.03. Определение количества фосфора общих фосфолипидов

Количество фосфолипидов оценивали спектрофотометрически при 830нм по содержанию неорганического фосфора методом Бартлетта (Bartlett, 1959).

3.12.04. Определение количества ТБК-активных продуктов

Из гомогенатов гиппокампа или неокортекса, пригитовленных на трис-HC1 буфере, отбирали по 0,5 мл, добавляли по 0,5 мл 1% раствора ортофосфорной кислоты и 0,25мл 0,5% раствора тиобарбитуровой кислоты, перемешивали, нагревали на водяной бане (+100˚С) 20 мин. Затем охлаждали и образовавшийся окрашенный комплекс экстрагировали 1,5мл бутанола. Пробы тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 3000g, отбирали бутанольную фракцию и фотометрировали при 532нм на спектрофотометрическом микропланшетном ридере SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Германия). Также учитывали вклад неспецифического поглощения (светорассеяния), который оценивался по величине оптической плотности при 600нм.

Содержание ТБК-активных продуктов выражали в единицах оптической плотности, нормированных на количество общего белка в пробе, определенного спектрофотометрическим методом.

3.13. Количественный анализ транскрипции Г6ФДГ методом ПЦР в реальном времени

Общую РНК изолировали из гиппокампа крыс с использованием коммерческого набора Aurum Total RNA Mini Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), предназначенного для выделения РНК, согласно инструкциям производителя. Синтез кДНК производили из 1 мкг общей РНК при помощи RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Количественную ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием флуоресцентного красителя SYBR green на термоциклере CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Последовательности праймеров, температура отжига и размер фрагментов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристики используемых праймеров.

Ген	Последовательности праймеров (5’ - 3’)	Температура отжига (°C)	Длина продукта (пн)
Г6ФДГ	**F: GTCTACCACTGCTACCTTTGC** **R: ACATCGCGGAACTGAAGTC**	**60**	**135**
Актин-бета	**F: CAACTGGGACGATATGGAGAAG** **R: TCTGGGTCATCTTTTCACGG**	**60**	**134**

Уровень экспрессии гена интереса (Г6ФДГ) определяли, используя ΔΔCt метод, нормализуя данные на количество мРНК референтного гена актина-бета.

3.14. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку проводили с помощью пакетов анализа данных STATISTICA 7.0 Stat Soft, Inc и Microsoft Excel, использовали непараметрический критерий Манн-Уитни (Mann-Whitney U-test). Изменения считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Также дополнительно результаты обрабатывали с использованием скриптов на свободном статистическом языке R (https://cran.r-project.org/) в ресурсном центре «Обсерватория экологической безопасности» научного парка СПбГУ. Для анализа и построения графиков использовали метод бутстреп. Оценку статистической значимости проводили с использованием непараметрического теста Крускала-Уоллиса (The Kruskal–Wallis test). Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Все результаты в диссертации представлены в процентах от контроля (исключения: для TUNEL-позитивных клеток в процентах от общего числа клеток, для количества мРНК Г6ФДГ – в условных единицах отношения мРНК Г6ФДГ к мРНК актина-бета) в виде среднего арифметического ± SEM (стандартная ошибка среднего).

5. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.01. Эффекты тяжелой гипоксии и тяжелой гипоксии в сочетании с посткондиционированием умеренной гипобарической гипоксией на гиппокамп и неокортекс крыс

4.01.01. Анализ процессов клеточной гибели

На первых этапах работы с целью изучения влияния тяжелой гипоксии (ТГ) и ТГ в сочетании с сеансами гипоксического посткондиционирования (ПостК) на процессы клеточной гибели в гиппокампе и сенсомоторной коре крыс использовали биохимический метод электрофоретического анализа фрагментации ДНК, а также определяли соотношение количества апоптотических клеток к общему количеству клеток гистохимическим методом TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling - dUTP концевое мечение ДНК терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазой).

4.01.01.01. Изучение динамики фрагментации ДНК

Фрагментация ДНК в гиппокампе крыс выявлена уже через два дня после окончания сеанса тяжелой гипоксии (Рисунок 11, А). Это проявлется в формировании характерной «апоптотической «лестницы» на электрофореграмме, детектируемой по пикам на профиле люминесценции. При этом по крайней мере в течение четырех дней после ТГ фрагментация ДНК остается на высоком уровне. Напротив, в гиппокампе животных, переживших один, два и три сеанса гипоксического ПостК, фрагментация ДНК не выявлена, что указывает на наличие противоапоптотического эффекта ПостК (Рисунок 11, А) для этой структуры мозга.

В отличие от гиппокампа, в неокортексе как посткондиционированных крыс, так и животных, переживших ТГ без ПостК, не выявлено изменения фрагментации ДНК по сравнению с контролем (Рисунок 11, Б), что указывает на меньшую чувствительность неокортекса крыс к повреждающему действию ТГ по сравнению с гиппокампом, либо на повышенную регенеративную способность данной структуры мозга.

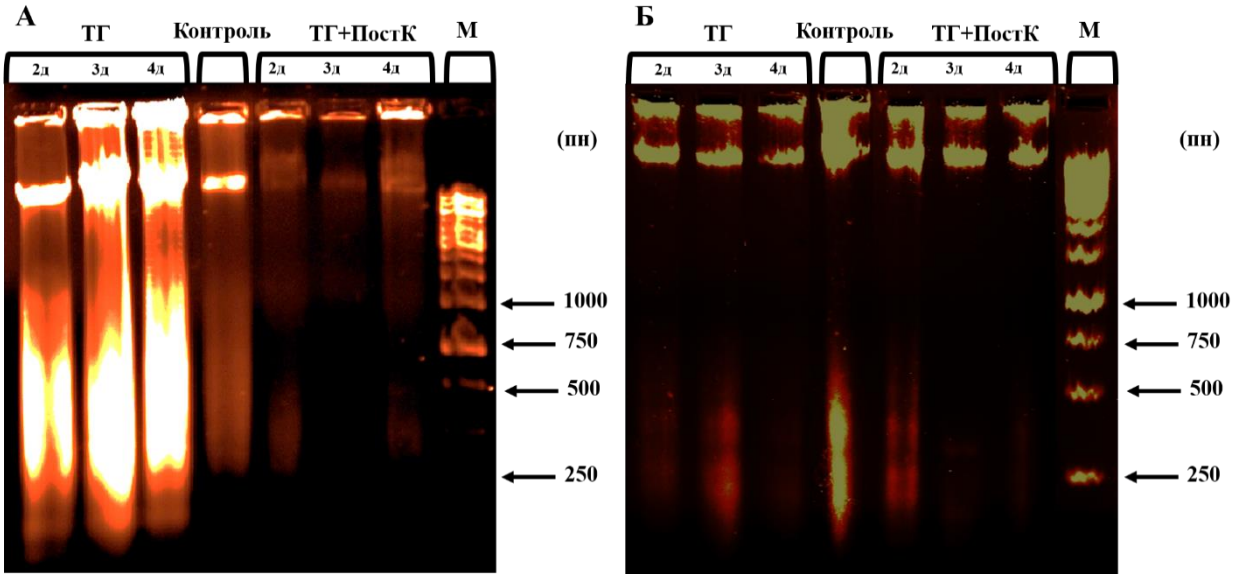
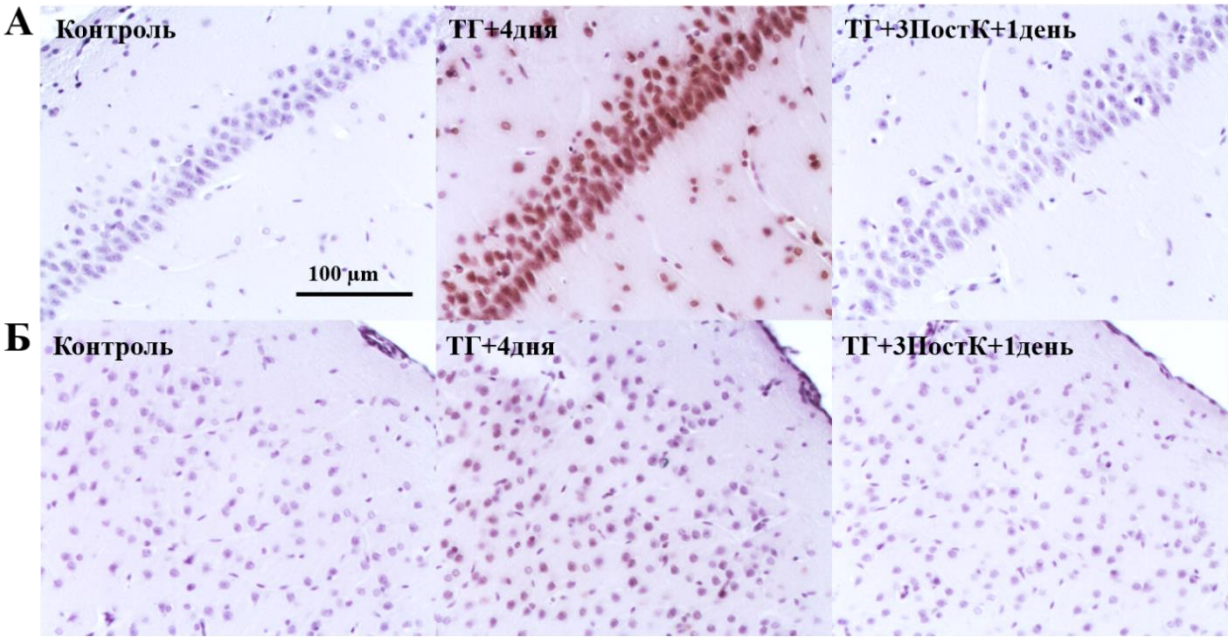


Рисунок 11. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с сеансами посткондиционирования (ТГ+ПостК) на фрагментацию ДНК в гиппокампе (А) и неокортексе (Б) крыс (электрофоретическое разделение в 2% агарозе; количество ДНК в каждой пробе: 5мкг).

4.01.01.02. Изучение количества TUNEL позитивных клеток

Гистохимическим методом анализа апоптотических процессов по соотношению TUNEL-позитивных клеток к общему количеству клеток не выявлено апоптотических процессов в течение первых трех дней после ТГ. Однако, через 4 дня реоксигенации у крыс, переживших непосткондиционированную ТГ, наблюдается интенсивное повреждение клеток гиппокампа и менее выраженное повреждение второго слоя сенсомоторной коры, сопровождающееся отсроченным запуском апоптоза (Рисунок 12). Так в CA1 поле гиппокампа крыс, переживших ТГ, через 4 дня после воздействия количество TUNEL-позитивных клеток составляет 43% от общего количества клеток. Во втором слое сенсомоторной коры крыс, переживших ТГ, интенсивность апоптотических процессов менее выражена, чем в гиппокампе (6% TUNEL-позитивных клеток относительно общего количество через 4 дня после реоксигенации).

ПостК, предъявляемое после ТГ, оказывает выраженный нейропротективный эффект, предотвращая отсроченное развитие апоптотических процессов в гиппокампе (0,42% TUNEL-позитивных клеток через 4 дня после ТГ) и неокортексе (TUNEL-позитивные клетки не выявлены) (Рисунок 12).



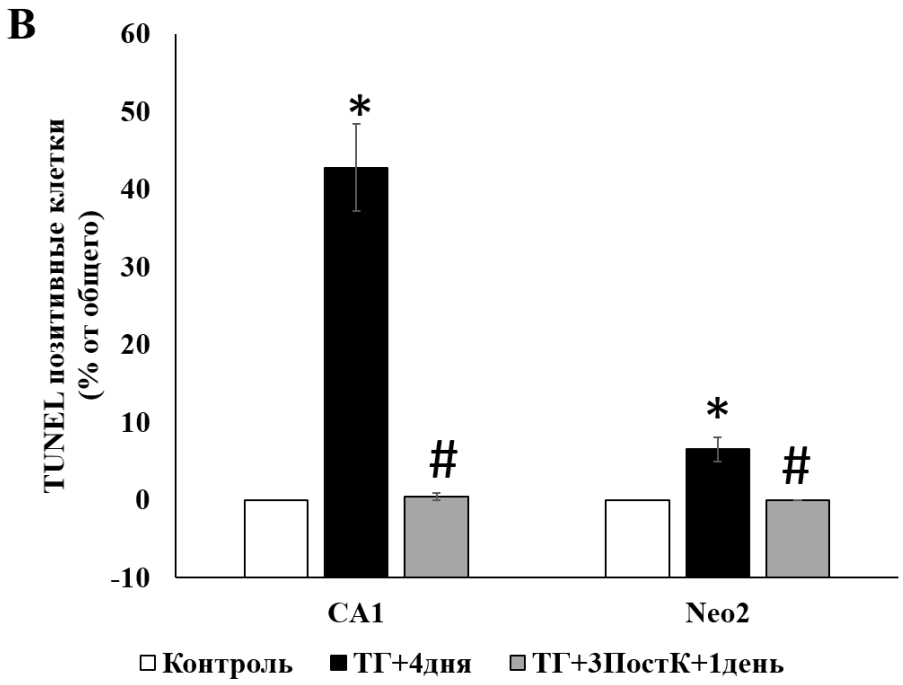


Рисунок 12. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с тремя сеансами гипоксического посткондиционирования (ТГ+3ПостК) на количество TUNEL-позитивных клеток. Микрофотографии (40х) CA1 поля гиппокампа (А) и второго слоя неокортекса (Б) контрольных крыс (Контроль), через 4 дня после тяжелой гипоксии (ТГ+4дня) и через день после тяжелой гипоксии в сочетании с трехкратным посткондиционированием умеренной гипобарической гипоксией (ТГ+3ПостК+1день). Маркер, 100 мкм; График количестваTUNEL-позитивных клеток в CA1 поле гиппокампа и 2м слое неокортекса (В). Количество TUNEL-позитивных клеток выражено в % от общего количества клеток.

* Различия достоверны по отношению к контролю, p≤0.05; # Различия достоверны по отношению к ТГ, p≤0.05.

На данном этапе работы благодаря анализу фрагментации ДНК и количества TUNEL-позитивных клеток был установлен факт повышенной интенсивности повреждения нейронов гиппокампа по сравнению с неокортексом в результате воздействия ТГ. В то же время предъявление ПостК пережившим ТГ крысам способствует предотвращению фрагментации ДНК и уменьшению количества TUNEL-позитивных клеток как в CA1 поле гиппокампа, так и во втором слое неокортекса.

4.01.02. Содержание проадаптивных белков Bcl-2 и BDNF

С применением иммуногистохимического метода исследовали измененение содержания маркеров нейропротекции, антиапоптотического белка Bcl-2 и нейротрофина BDNF, в CA1 поле гиппокампа и втором слое сенсомоторной коры крыс. Среднюю оптическую плотность иммунопозитивных к Bcl-2 и BDNF определяли через 75 и 96 часов после тяжелой гипоксии (ТГ) и, соответственно, через 3 и 24 часа после третьего сеанса постконционирования (ПостК).

Содержание проадаптивных белков Bcl-2 и BDNF в CA1 поле гиппокампа

Через 75 часов после ТГ средняя оптическая плотность иммунопозитивных по Bcl-2 клеток в CA1 поле гиппокампа крыс достоверно не отличается от контроля. Через 96 часов реоксигенации количество Bcl-2 в данной структуре мозга уменьшается до 20% от контроля (Рисунок 13, А).

В дорзальном гиппокампе (CA1 поле) крыс спустя 3 часа после последнего сеанса ПостК (соответственно, через 75 часов после ТГ в этой группе) средняя оптическая плотность иммунопозитивных к Bcl-2 клеток возрастает в три раза. Через 24 часа после завершения трехкратного ПостК (соответственно, через 96 часов после ТГ) количество Bcl-2 также увеличено и составляет 400% от базального уровня (Рисунок 13, А).

Воздействие ТГ не приводит к изменению средней оптической плотности экспрессирующих BDNF клеток в CA1 поле гиппокампа спустя 75 часов после воздействия (Рисунок 13, Б). Через 96 часов после реоксигенации количество BDNF в дорзальном гиппокампе также не имеет достоверных отличий с контролем.

У ПостК животных выявлена up-регуляция содержания BDNF (Рисунок 13, Б). Так через 3 часа после последнего сеанса ПостК количество BDNF возрастает до 500% от контроля, а через 24 часа было в четыре раза выше базального уровня.

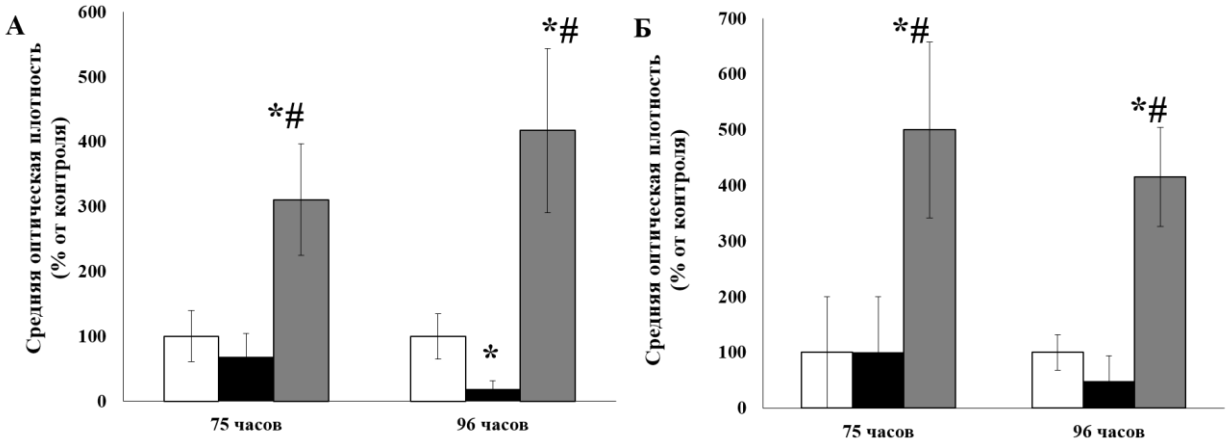


Рисунок 13. Средняя оптическая плотность иммунопозитивных к Bcl-2 (А) и BDNF (Б) клеток в СА1 поле гиппокампа контрольных крыс (белые столбики) и через 75 и 96 часов после тяжелой гипобарической гипоксии у непосткондиционированных (черные столбики) и посткондиционированных животных (серые столбики). По оси абсцисс - время после тяжелой гипоксии; по оси ординат – средняя оптическая плотность иммунопозитивных клеток в % от контроля. *, различия с контролем статистически достоверны, $p \leq 0.05$; #, различия статистически достоверны по сравнению с ТГ, $p \leq 0.05$.

Гипоксия является одним из видов воздействия, нарушающего гомеостаз организма и вызывающего ответную реакцию, направленную на его восстановление. Но если эти нарушения слишком велики и клетка не способна их компенсировать, то запускаются механизмы ее повреждения и гибели. Тяжелые формы гипоксии способны вызывать целый ряд функциональных и структурных нарушений, обратимых и необратимых, что зависит от интенсивности и длительности воздействия. Настоящие результаты подтверждают результаты предыдущих работ о деструктивном влиянии ТГ на нейроны уязвимых образований мозга крыс, сопровождающемся смещением соотношения факторов регуляции выживания/гибели клетки в сторону проапоптотических белков на фоне подавления экспрессии антиапоптотических факторов (Rybnikova et al., 2006). Нами показано, что ТГ

приводит к снижению уровня антиапоптотического белка Bcl-2 в CA1 поле гиппокампа даже на поздних сроках после воздействия (75-96ч), результатом чего становится гибель около 30% нейронов данной области через 7 дня после воздействия (Rybnikova et al., 2012).

Применение ПостК УГГ в нашей модели в значительной степени способствует предотвращению нейрональной гибели (Rybnikova et al., 2012, раздел 4.01.01). Согласно полученным нами результатам, нейропротективный эффект ПостК может реализовываться за счет вызываемой им ярко выраженной up-регуляции антиапоптотического фактора Bcl-2, что согласуется с данными, полученными и в модели раннего ишемического ПостК (Xing et al., 2008).

Регуляция транскрипции Bcl-2 осуществляется адаптивными транскрипционными факторами CREB, NF-κB (Chiueh et al., 2005, Karin et al., 2002). Мобилизация CREB (за счет фосфорилирования) была продемонстрирована при изучении эффекта ишемического (Hara et al., 2003) и гипобарического (Чурилова и др., 2009) прекондиционирования. Следует отметить, что гипоксическое прекондиционирование, как ишемическое так и гипобарическое, увеличивало экспрессию NF-κB, хотя тяжелая гипоксия/ ишемия приводила к снижению его экспрессии (Blondeau et al., 2001, Чурилова и др., 2009).

По данным литературы NF-κB и CREB также активируют экспрессию нейротрофина BDNF (Herdegen et al., 1998, Knapska et al., 2004). В нашем исследовании получены результаты, согласно которым в CA1 поле гиппокампа крыс, переживших тяжелую гипобарическую гипоксию с последующим ПостК происходит значительное увеличение экспрессии этого нейротрофина, что свидетельствует о вероятном участии данного фактора в компенсаторном действии ПостК. Одной из мишеней рецептора BDNF (TrkB) является PI3K (phosphatidylinositide 3-kinases). Известно, что селективное ингибирование PI3K нивелирует нейропротективный эффект ишемического ПостК (Scartabelli et al., 2008). Наряду с Akt сигналлингом, взаимодействие BDNF с рецептором также может приводить к запуску MAP киназного (Erk1/2) каскада, способствующего активации транскрипции нейропротективных генов (Howe et al., 2001).

Таким образом, на данном этапе работы нами установлено, что реализация нейропротективного действия ПостК УГГ при коррекции постгипоксической патологии сопровождается over-экспрессией Bcl-2 и BDNF в CA1 поле гиппокампа, вероятно, выполняющих роль эффекторов нейропротективных процессов, способствующих структурно-функциональной реабилитации клеток гиппокампа после тяжелого повреждающего воздействия.

Содержание проадаптивных белков Bcl-2 и BDNF во втором слое неокортекса

Тяжелая гипоксия приводит к изменению содержания Bcl-2 и BDNF во втором слое неокортекса крыс. На Рисунке 14 представлены репрезентативные микрофотографии иммунопозитивных к Bcl-2 и BDNF клеток во втором слое сенсомоторной коры контрольных крыс и крыс, подвергавшихся воздействию ТГ и ТГ+3ПостК.

Результаты статистической обработки полученных микрофотографий показывают, что через 4 дня после ТГ наблюдается увеличение средней оптической плотности иммунопозитивных по Bcl-2 клеток во втором слое неокортекса до 376% относительно контроля (Рисунок 15, А), в то время как у ПостК животных происходит снижение этого показателя относительно ТГ, однако он остается выше контрольных значений (233% от контроля (Рисунок 15, А)).

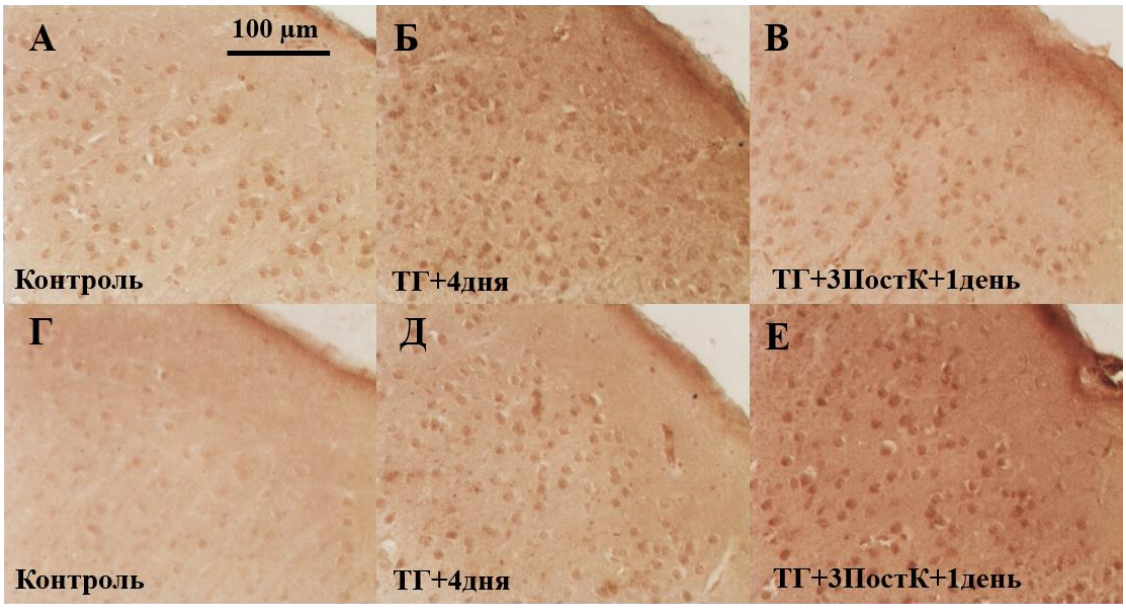


Рисунок 14. Микрофотографии (40х) второго слоя неокортекса контрольных крыс (Контроль) (А,Г), через 4 дня после тяжелой гипоксии (ТГ+4дня) (Б,Д) и через день после тяжелой гипоксии в сочетании с трехкратным посткондиционированием умеренной гипобарической гипоксией (ТГ+3ПостК+1день) (В,Е). Иммуногистохимическая реакция на Bcl-2 (А,Б,В) и BDNF (Г,Д,Е). Маркер, 100 мкм

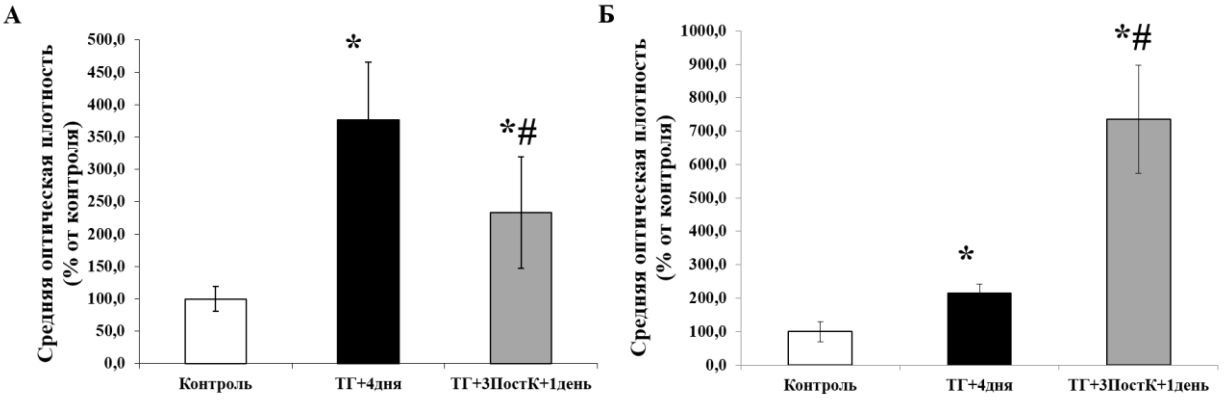


Рисунок 15. Средняя оптическая плотность иммунопозитивных к Bcl-2 (А) и BDNF (Б) клеток во втором слое неокортекса контрольных крыс (белые столбики) и через 96 часов после тяжелой гипобарической гипоксии у непосткондиционированных (черные столбики) и посткондиционированных животных (серые столбики). По оси абсцисс - время после тяжелой гипоксии; по оси ординат – средняя оптическая плотность иммунопозитивных клеток в % от контроля. *, различия с контролем статистически достоверны, $p \leq 0.05$; #, различия статистически достоверны по сравнению с ТГ, $p \leq 0.05$.

На четвертый день после воздействия ТГ наблюдается увеличение количества BDNF во втором слое неокортекса до 214,2% от контроля (Рисунок 14, Д, 15, Б). В то же время умеренная гипоксия в режиме ПостК приводит к увеличению содержания BDNF во втором слое неокортекса, в котором средняя оптическая плотность иммунореактивных к этому белку клеток многократно (более чем в 7 раз) превышает контрольные значения (Рисунок 15, Б).

Результаты проведенного исследования выявили особенности эффектов тяжелой повреждающей гипобарической гипоксии в отдаленный период и ее сочетанного действия с умеренной гипобарической гипоксией в режиме ПостК на паттерн экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и проадаптивного белка BDNF в клетках сенсомоторной коры крыс по сравнению с гиппокампом. В неокортексе крыс, переживших ТГ, в отличие от гиппокампа происходит отсроченное достоверное повышение содержания белков, ответственных за механизмы выживания нейронов, нейрональную пластичность, а именно нейротрофинов (BDNF) и антапоптотических факторов (Bcl-2) в неокортексе крыс. При этом в ранний период (3-24 часа) после тяжелого воздействия уровень экспрессии Bcl-2 и BDNF в неокортексе либо не изменялся, либо снижался. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что отсроченная активация экспрессии Bcl-2 и BDNF, очевидно,

отражает запуск адаптивных процессов у животных, переживших ТГ, то есть носит компенсаторный характер и характеризует восстановительный потенциал поврежденных, но выживших нейронов неокортекса. Тем не менее, следует отметить, что это не способствует полной структурно-функциональной реабилитации этой структуры мозга, поскольку прогрессирующая потеря нейронов продолжается по крайней мере до 7 дней (Самойлов и др., 2015), а нарушения поведения – до 10-11 дней после ТГ (Ватаева и др., 2004). Можно предположить, что для эффективной реабилитации необходима активация адаптационных механизмов на более ранних сроках после повреждающего воздействия.

4.01.03. Иммуногистохимический анализ содержания HIF1a и Г6ФДГ

Содержание регуляторной альфа субъединицы гипоксия-индуцируемого фактора-1 (HIF1a) и ключевого скрость-лимитирующего фермента ПФП, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г6ФДГ) в CA1 поле гиппокампа и втором слое сенсомоторной коры крыс изучали через 1, 2 и 4 дня после ТГ и через 1 день после первого и третьего сеансов ПостК иммуногистохимическим методом.

4.01.03.01. Содержание HIF1a в CA1 поле гиппокампа и втором слое неокортекса

С применением иммуногистохимического анализа содержания регуляторной альфа субъединицы HIF1, HIF1a, в CA1 поле гиппокампа (Рисунок 16, А, 17, А) нами было показано, что через 1 день после ТГ происходит увеличение средней оптической плотности иммунопозитивных к HIF1a клеток до 377% от контроля, после чего средняя оптическая плотность иммунопозитивных клеток снижается, составляя через 2 дня после реоксигенации 44%, а через 4 дня – 66% от контроля.

В неокортексе выявлена противоположная динамика (Рисунок 16, Б, 17, Б): через 1 день реоксигенации происходит уменьшение средней оптической плотности иммунопозитивных к HIF1a клеток до 55% от контроля, а в дальнейшем уровень HIF1a постепенно нормализуется, составляя через 2 дня после ТГ 79%, а через 4 дня – 102% от контроля.

В случае предъявления после ТГ гипоксического ПостК динамика HIF1 в гиппокампе существенно меняется (Рисунок 16, А, 17, А), а именно происходит нормализация уровня этого транскрипционного фактора через 2 дня после ТГ (115% от контроля) и up-регуляция через 4 дня (293% от контроля).

В неокортексе не выявлено изменений в динамике HIF1a в результате ПостК по сравнению с ТГ – средняя оптическая плотность иммунопозитивных к HIF1a клеток во 2м слое сенсомоторной коры крыс этой группы составила 81% и 131% от контроля, через 2 и 4 дня после ТГ, соответственно.

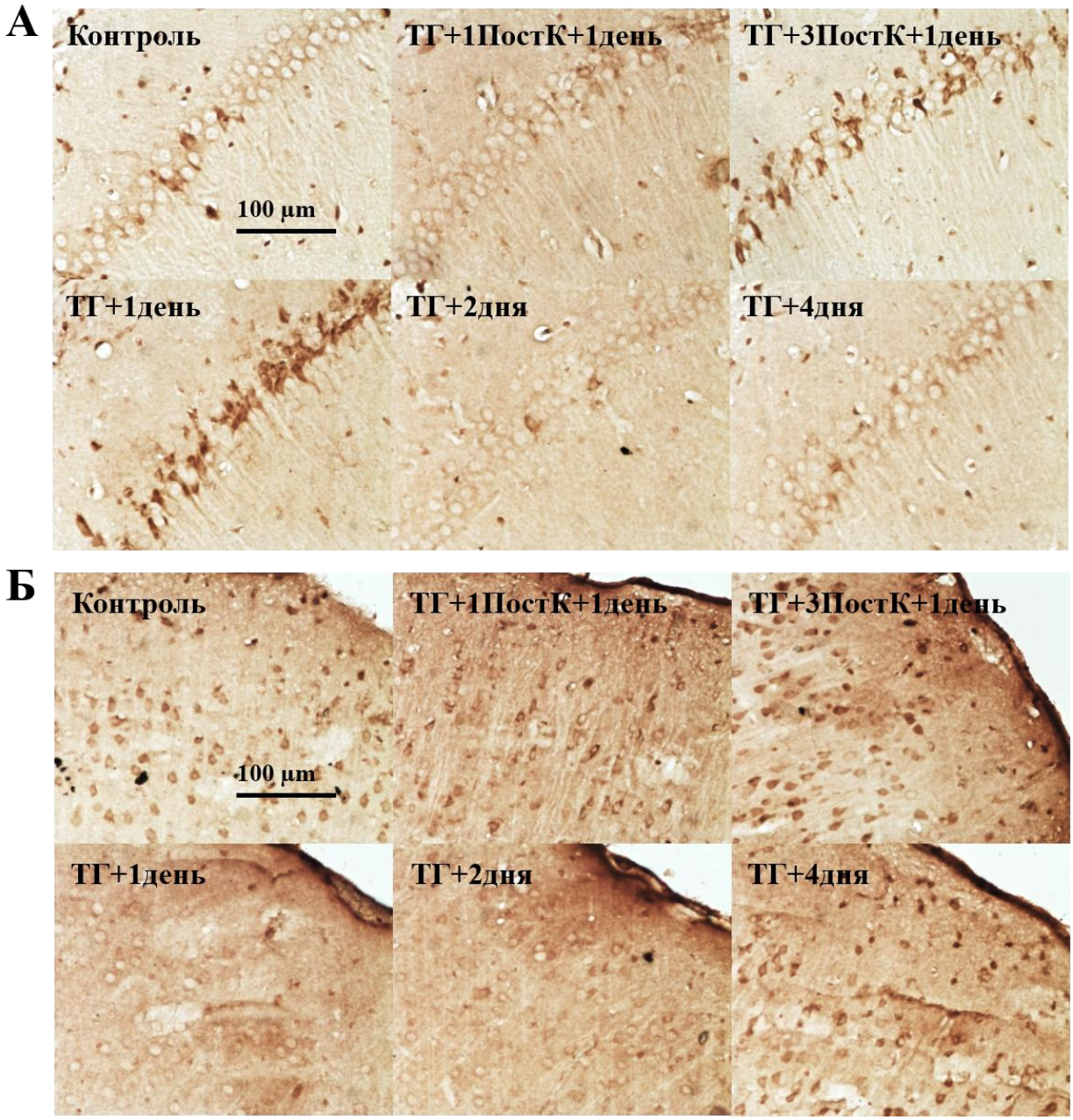


Рисунок 16. Микрофотографии (40х). Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с гипоксическим посткондиционированием (ТГ+ПостК) на количество HIF1a в СА1 поле гиппокампа (А) и втором слое неокортекса (Б) через 1,2 и 4 дня после ТГ. Маркер, 100мкм

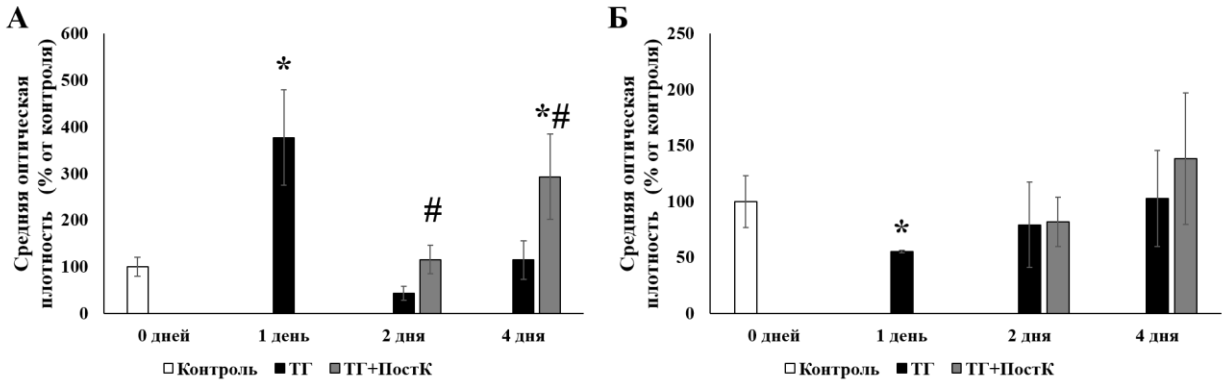


Рисунок 17. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с гипоксическим посткондиционированием (ТГ+ПостК) на среднюю оптическую плотность иммунопозитивных к HIF1a клеток в CA1 поле гиппокампа (А) и втором слое неокортекса (Б) через 1,2 и 4 дня после ТГ. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

Таким образом результаты этой серии экспериментов указывают на краткосрочную гиперактивацию HIF1a в гиппокампе и краткосрочную супрессию данного транскрипционного фактора в неокортексе крыс, переживших ТГ, что, как было показано ранее, сопровождается массированной гибелью нейронов гиппокампа и менее выраженной потерей нейронов неокортекса через 7 дней после воздействия (Rybnikova et al., 2012). В то же время предъявление ПостК пережившим ТГ крысам способствует стабилизации с последующей up-регуляцией HIF1a в CA1 поле гиппокампа после третьего сеанса УГГ, не оказывая эффекта на его уровень во втором слое сенсомоторной коры, где ТГ-индуцированное краткосрочное снижение экспрессии HIF1a нивелируется ко второму дню после воздействия вне зависимости от предъявления ПостК.

Учитывая тот факт, что методом электрофоретического анализа фрагментации ДНК установлено противоапоптотическое действие ПостК в гиппокампе крыс уже после первого сеанса УГГ, когда уровень HIF1a не отличается от контрольного, а также принимая во внимание различную степень выраженности апоптотических процессов в гиппокампе, где происходит краткосрочная стимуляция содержания HIF1a в ответ на ТГ, и неокортексе крыс, где наблюдается краткосрочная супрессия этого транскрипционного фактора на ранних сроках реоксигенации, можно предположить, что HIF1, ключевой регулятор адаптивных реакций на хроническую гипоксию, в условиях острой гипоксии с

последующей реоксигенацией способен вовлекаться в реализацию не столько адаптивных, сколько патологических эффектов ТГ.

4.01.03.02. Содержание Г6ФДГ в СА1 поле гиппокампа и втором слое неокортекса

При исследовании содержания скорость-лимитирующего фермента ПФП, Г6ФДГ, в СА1 поле гиппокампа (Рисунок 18, А), мы выявили отсроченное уменьшение средней оптической плотности иммунопозитивных к Г6ФДГ клеток до 84% от контроля через 4 дня после реоксигенации. При этом в неокортексе происходит уменьшение количества Г6ФДГ ко второму дню после ТГ (62% от контроля) и нормализация через 4 дня (96% от контроля) (Рисунок 18, Б).

ПостК предотвращает отсроченное снижение количества Г6ФДГ в СА1 поле гиппокампа (Рисунок 18, А), не влияя на динамику экспрессии этого белка в неокортексе (Рисунок 18, Б).

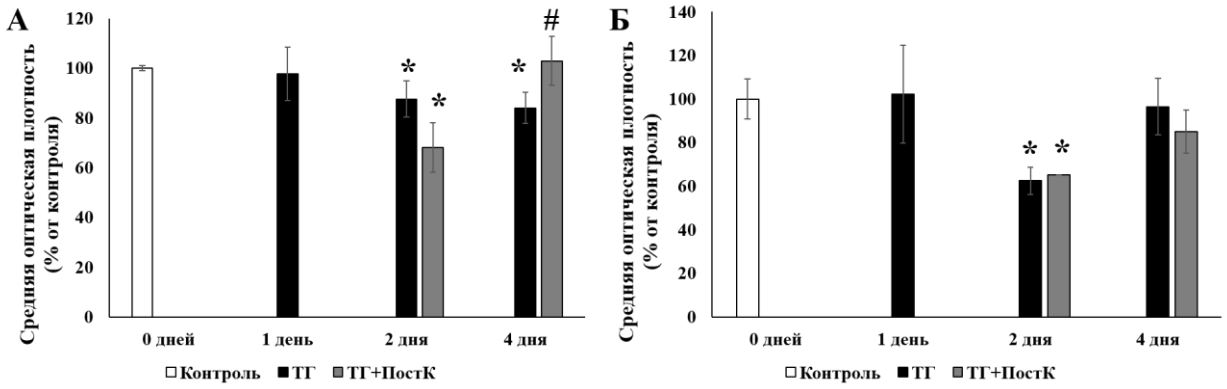


Рисунок 18. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с гипоксическим посткондиционированием (ТГ+ПостК) на среднюю оптическую плотность иммунопозитивных к Г6ФДГ клеток в СА1 поле гиппокампа (А) и втором слое неокортекса (Б) через 1,2 и 4 дня после ТГ. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

4.01.04. Анализ активности Г6ФДГ и количества НАДФН

Для оценки функционального состояния ПФП в гиппокампе и неокортексе крыс, переживших ТГ или ТГ в сочетании с ПостК, мы определили активность Г6ФДГ и измерили количество восстановленного НАДФ. Как видно на Рисунке 19, А, через 1 день после ТГ активность Г6ФДГ в гиппокампе возрастает до 135% от контроля. Однако в дальнейшем происходит снижение активности этого фермента до 65% через 4 дня после тяжелого гипоксического воздействия. Параллельно этому наблюдается устойчивое уменьшение количества продукта ПФП, НАДФН (Рисунок 19, Б)). Так через 1,2 и 4 дня после ТГ его количество в гиппокампе крыс составляет 38, 34 и 52% от контроля, соответственно. При этом трехкратное ПостК предотвращает снижение активности Г6ФДГ в гиппокампе через 4 дня после ТГ (114% от контроля) (Рисунок 19, А), вызывая постепенную нормализацию количества НАДФН (62% и 105% от контроля через 2 и 4 дня после ТГ, соответственно) (Рисунок 19, Б).

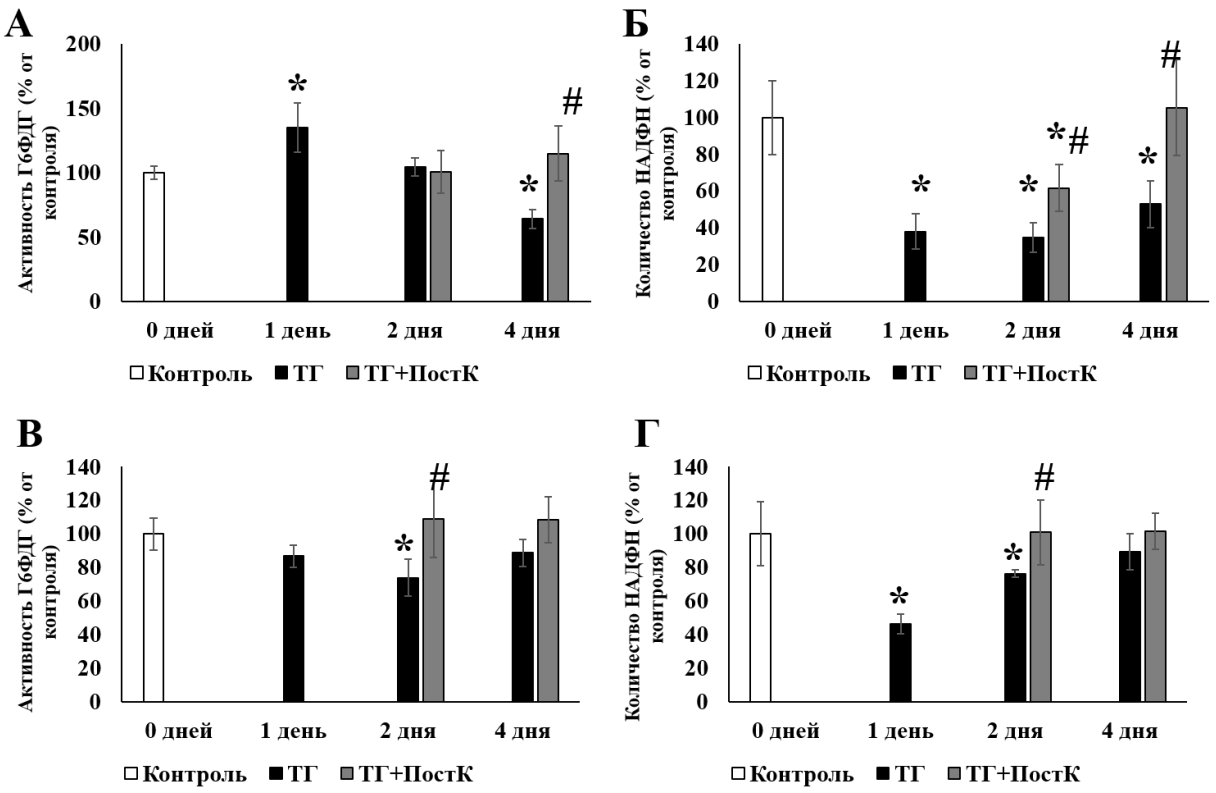


Рисунок 19. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с гипоксическим посткондиционированием (ТГ+ПостК) на активность Г6ФДГ (А,В) и количество НАДФН (Б,Г) в гиппокампе (А,Б) и неокортексе (В,Г) крыс. Активность Г6ФДГ и количество НАДФН нормализованы на количество общего белка и выражены в % от

контроля. *, Различия достоверны по отношению к контролю, p≤0.05; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, p≤0.05.

В неокортексе крыс, переживших ТГ, через 1 и 4 дня реоксигенации не выявлено достоверных изменений активности Г6ФДГ по сравнению с контролем (87% и 89% от контроля через 1 и 4 дня после ТГ, соответственно) (Рисунок 19, В). Однако через 2 дня после ТГ, аналогично данным по количеству Г6ФДГ, наблюдается небольшое уменьшение активности Г6ФДГ (74% от контроля). Количество НАДФН в неокортексе крыс было снижено в течение двух дней после ТГ (46% и 76% от контроля через 1 и 2 дня после ТГ, соответственно), не отличаясь достоверно от нормального уровня через 4 дня после ТГ (89% от контроля) (Рисунок 19, Г).

ПостК предотвращает снижение активности Г6ФДГ через 2 дня после ТГ (109% и 108% от контроля через 2 и 4 дня после ТГ, соответственно) (Рисунок 19, В), нормализуя количество НАДФН уже через 2 дня после ТГ (101% и 102% от контроля через 2 и 4 дня после ТГ, соответственно) (Рисунок 19, Г).

Пентозофосфатный путь безусловно является одним из важнейших элементов метаболизма мозга, в частности благодаря генерации восстановленного НАДФН, вовлеченного в процессы синтеза макромолекул, поддержание антиоксидантных систем и обеспечение нормального окислительно-восстановительного статуса (Fernandez-Fernandez et al., 2012, Ben-Yoseph et al., 1996). Так недавно была показана существенная роль ПФП в предотвращении последствий окислительного стресса, индуцированного депривацией кислорода и глюкозы in vitro (Sun et al., 2017), а in vivo получены сведения, указывающие на перспективность использования продукта ПФП, НАДФН, при ранней терапии постинсультных состояний (Li et al., 2017).

В данной работе нами выявлена сходная динамика содержания и активности ключевого фермента ПФП, Г6ФДГ и экспрессии HIF1a в гиппокампе и неокортексе крыс, переживших ТГ с и без последующих сеансов ПостК. Так, краткосрочное увеличение количества HIF1a в CA1 поле гиппокампа крыс, переживших ТГ, сопровождается увеличением активности Г6ФДГ. Однако параллельно в этой структуре мозга наблюдается стабильное уменьшение количества НАДФН, что может быть результатом HIF1-зависимой стимуляции гликолиза как на уровне транскрипции, так и за счет гипоксия-опосредованной стимуляции активности PFKFB-3 (Semenza, 2001, Fernandez-Fernandez et al., 2012). В то же время ПостК, способствующее стабилизации с последующей up-регуляцией уровня HIF1a

в СА1 поле гиппокампа, также вызывает постепенную нормализацию количества и активности Г6ФДГ и нормализует интенсивность процессов восстановления НАДФН. Кроме того, нами в очередной раз подтвержден факт того, что сенсомоторная кора является более резистентной к гипоксии структурой мозга, чем гиппокамп. Согласно результатам настоящей работы, снижение экспрессии HIF1a во втором слое неокортекса крыс, переживших ТГ, наблюдается только в течение первого дня после реоксигенации, а в дальнейшем уровень HIF1a в этой структуре нормализуется, так же, как и нормализуется содержание и активность Г6ФДГ и количество НАДФН, что согласуется с менее выраженным по сравнению с гиппокампом накоплением TUNEL-позитивных клеток и, вероятно, способствует предотвращению окислительного стресса. В свою очередь ПостК способствует небольшому ускорению восстановления исследуемых параметров до контрольных значений (активность Г6ФДГ, количество НАДФН).

Полученные нами данные указывают на корреляцию между HIF1 и ПФП. Однако также выявлена прямая зависимость между содержанием HIF1a и интенсивностью апоптических процессов в структурах мозга крыс, переживших ТГ. При этом установлено вовлечение нормализации активности ПФП в реализацию эффектов ПостК. В связи с этим на данном этапе работы возникло предположение о HIF1-независимой прямой регуляции ПФП гипоксией и реоксигенацией – изучению этого вопроса посвящены следующие разделы настоящей работы.

4.01.05. Анализ окислительно-восстановительного статуса и количества общего глутатиона

Согласно нашей гипотезе дефицит активности ПФП в гиппокампе (но не в неокортексе) крыс, переживших ТГ, должен приводить к долгосрочному смещению окислительно-восстановительного статуса клеток в сторону окисленного состояния и способствовать уменьшению количества свободного глутатиона, а нормализация его активности вследствие ПостК - к нормализации этих параметров.

Для оценки наличия окислительного стресса нами был измерен окислительно-восстановительный статус цитозольной фракции гиппокампа и неокортекса крыс по соотношению тиоловых групп к общему содержанию белка. Как видно из Рисунка 20, А, дефицит эффективности пентозофосфатного пути в гиппокампе крыс, переживших ТГ, действительно сопровождается долгосрочным смещением окислительно-

восстановительного статуса клеток в сторону окисленного состояния. Так через 1, 2 и 4 дня после ТГ данный показатель составляет 75%, 42% и 57% от контроля, соответственно.

Устойчивое уменьшение количества глутатиона в гиппокампе (14%, 15% и 11% от контроля через 1, 2 и 4 дня после ТГ, соответственно) (Рисунок 20, Б) также подтверждает развитие состояния окислительного стресса в этой структуре мозга крыс в результате ТГ и последующей реоксигенации.

ПостК нормализует количество тиоловых групп в гиппокампе (89% и 103% от контроля через 2 и 4 дня после ТГ, соответственно) (Рисунок 20, А), вызывая существенное, хоть и не достигающее контрольных значений, увеличение количества глутатиона через 4 дня после ТГ (74% от контроля) (Рисунок 20, Б).

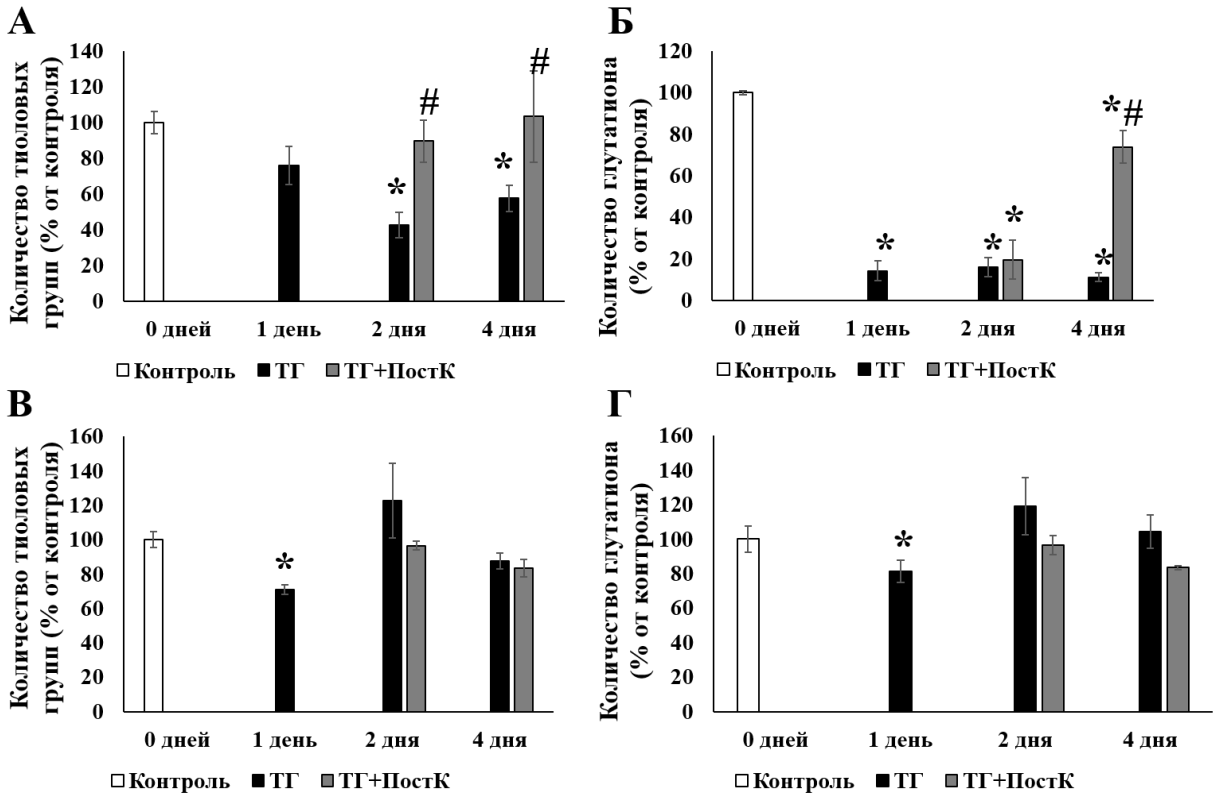


Рисунок 20. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с гипоксическим посткондиционированием (ТГ+ПостК) на количество тиоловых групп (А,В) и количество глутатиона (Б,Г) в гиппокампе (А,Б) и неокортексе (В,Г) крыс. Количество тиоловых групп и глутатиона нормализованы на количество общего белка и выражены в % от контроля. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

Маркеры окислительного стресса в неокортексе крыс, переживших ТГ, выявлены только через 1 день реоксигенации. Так количество тиоловых групп и глутатиона на этой временной точке составляет 71% и 81% от контроля (Рисунок 20, В,Г), соответственно. В дальнейшем, через 2 и 4 дня после непосткондиционированной ТГ, эти показатели достоверно не отличаются от базального уровня (123% и 87% от контроля для тиоловых групп и 119% и 104% от контроля для глутатиона, через 2 и 4 дня после ТГ, соответственно).

ПостК не вызывает достоверного изменения количества тиоловых групп в неокортексе по сравнению с непосткондиционированной ТГ (96% и 83% от контроля через 2 и 4 дня после ТГ, соответственно) (Рисунок 20, В), однако приводит к небольшому уменьшению количества глутатиона через 4 дня реоксигенации.

Таким образом, нами выявлена сходная динамика содержания и активности ключевого фермента ПФП - Г6ФДГ и ПФП-опосредованных процессов, а именно изменения содержания восстаноленного НАДФ, и окислительно-восстановительного статуса, в гиппокампе и неокортексе крыс, переживших ТГ с последующими сеансами ПостК или без них. Так отсроченное уменьшение количества и активности Г6ФДГ на фоне уменьшения уровня НАДФН в гиппокампе приводит к формированию состояния окислительного стресса, выражающегося в смещении редокс статуса клеток в сторону закисления и уменьшении количества глутатиона в этой структуре мозга и сопровождается запуском апоптотических процессов. В то же время ПостК, обладающее аниапоптотическим действием и способствующее нормализации количества и активности Г6ФДГ, нормализует наработку НАДФН, предотвращает снижение уровня тиоловых групп, способствуя нормализации количества глутатиона. Так как основным фактором патогенеза острых форм гипоксии/ишемии признана интенсификация свободно-радикального окисления и последующий окислительный стресс (Maiti et al., 2006, Nita et al., 2001, Sugawara et al., 2003), стимуляция эффективности антиоксидантных систем через нормализацию активности ПФП, опосредованную ПостК, вероятно представляет собой важный механизм нейропротекции.

В то же время в неокортексе крыс, переживших ТГ, где наблюдается быстрая нормализация содержания и активности Г6ФДГ, а также стабилизация количества НАДФН, а также не происходит долгосрочных изменений количества тиоловых групп и глутатиона, что согласуется с менее выраженным по сравнению с гиппокампом накоплением TUNEL-позитивных клеток и, вероятно, способствует предотвращению окислительного стресса. В свою очередь ПостК не влияет ни на количество тиоловых групп, ни на содержание общего

глутатиона в этой структуре мозга, оказывая в итоге менее выраженный по сравнению с гиппокампом противоапоптотический эффект.

4.01.06. Определение интенсивности процессов перекисного окисления липидов

При анализе эффектов ТГ на процессы свободнорадикального окисления в ранний период реоксигенации, когда забор материала осуществляли сразу после сеанса ТГ, показано, что ТГ оказывает разный эффект на гиппокамп и сенсомоторную кору. Так в гиппокампе наблюдается интенсификация процессов ПОЛ (Рисунок 21): количество диеновых коньюгатов увеличивается до 130% от контроля, что сопровождается увеличением коэффициента Клейна до 131% и ведет к накоплению Шиффовых оснований, количество которых достигает 170% от базального уровня. В то же время в неокортексе достоверных изменений процессов ПОЛ не выявлено.

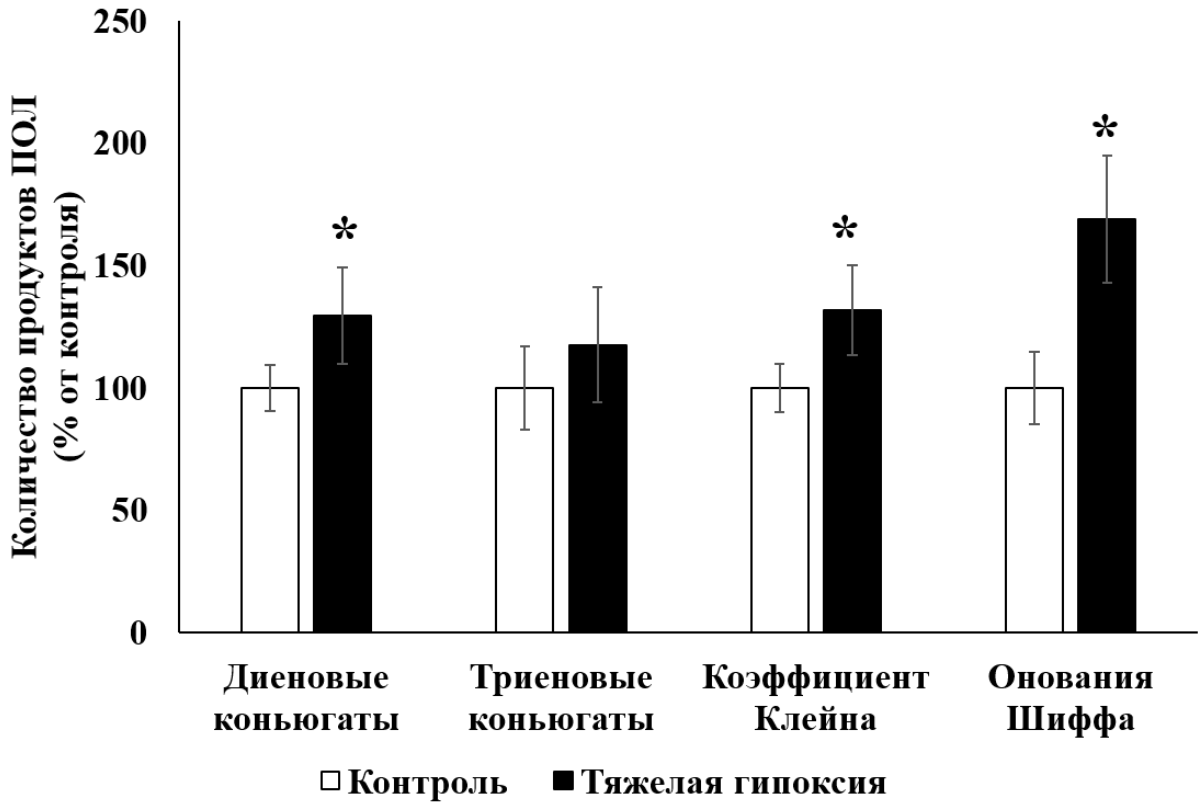


Рисунок 21. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) на количество диеновых и триеновых коньюгатов, коэффициент Клейна и количество основыний Шиффа в гиппокампе крыс. Количество продуктов перекисного окисления липидов нормализованы на количество общего фосфора фосфолипидов и выражены в % от контроля. * Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$.

В дальнейшем в гиппокампе крыс, переживших тяжелую гипоксию, на протяжении 4 дней после воздействия не выявлено достоверных отличий количества оснований Шиффа по сравнению с контролем (Рисунок 22, А), но при этом через 1 день после третьего сеанса посткондиционирования этот показатель в гиппокампе крыс составляет всего 30% от контроля (Рисунок 22, А), что указывает на антиоксидантный эффект ПостК для этой структуры мозга и согласуется с данными о мобилизации ПФП.

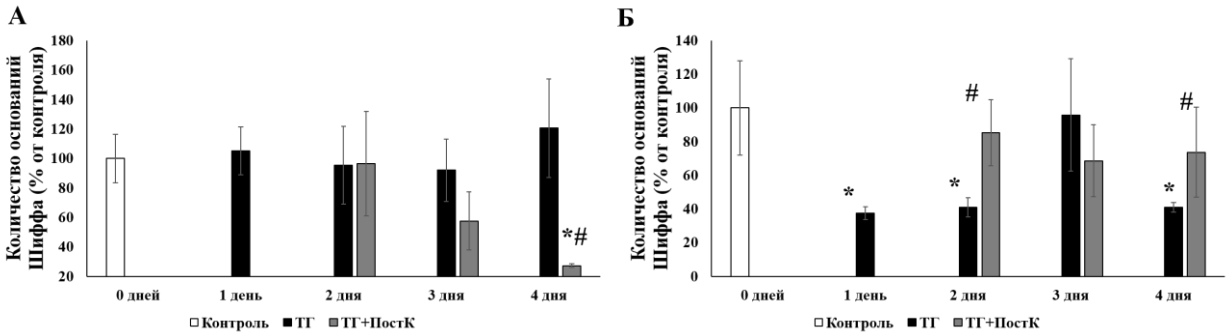


Рисунок 22. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с гипоксическим посткондиционированием (ТГ+ПостК) на количество оснований Шиффа в гиппокампе (А) и неокортексе (А) крыс. Количество оснований Шиффа нормализовано на количество общего фосфора фосфолипидов и выражено в % от контроля *, - различия с контролем статистически достоверны, $p \leq 0.05$; #, различия статистически достоверны по сравнению с ТГ, $p \leq 0.05$

При этом в неокортексе крыс в течение 4 дней после ТГ количество оснований Шиффа достоверно ниже, чем в контроле (Рисунок 22, Б). Через 3 дней после ТГ, а также на всех исследуемых сроках ТГ+ПостК достоверных отличий количества оснований Шиффа по сравнению с контролем не выявлено.

Поскольку в ходе проведенных исследований было установлено существенное различие между ответами клеток гиппокампа и неокортекса крыс на гипоксические воздействия, указывающее на относительную устойчивость неокортекса к тяжелой гипоксии и, как следствие, на отсутствие эффектов гипоксического посткондиционирования на эту структуру мозга, дальнейшие исследования, посвященные изучению роли HIF1 в реализации эффектов ТГ, а также оценки взаимосвязи между этим транскрипционным фактором, пентозофосфатным путем и опосредованными пентозофосфатным путем функциями, были проведены на гиппокампе.

4.02. Изучение роли HIF1 в реализации эффектов тяжелой гипоксии в гиппокампе крыс

4.02.01. Количество TUNEL позитивных клеток в CA1 поле гиппокампа

Посредством ингибирования трансляции HIF1 топотеканом нами был изучено участие данного транскрипционного фактора в развитии апоптотических процессов в гиппокампе крыс, переживших ТГ. Как было продемонстрировано в предыдущем разделе, ТГ вызывает отсроченное повреждение клеток CA1 поля гиппокампа: через 1 день после ТГ TUNEL-позитивные клетки не выявлены, однако через 4 дня после ТГ их количество достигает 47% от общего количества клеток (Рисунок 23, 24).

Однако, введение ингибитора HIF1 перед сеансом повреждающей гипоксии приводит к существенному уменьшению количества TUNEL-позитивных клеток (1,79% от общего количества клеток) (Рисунок 23, 24)

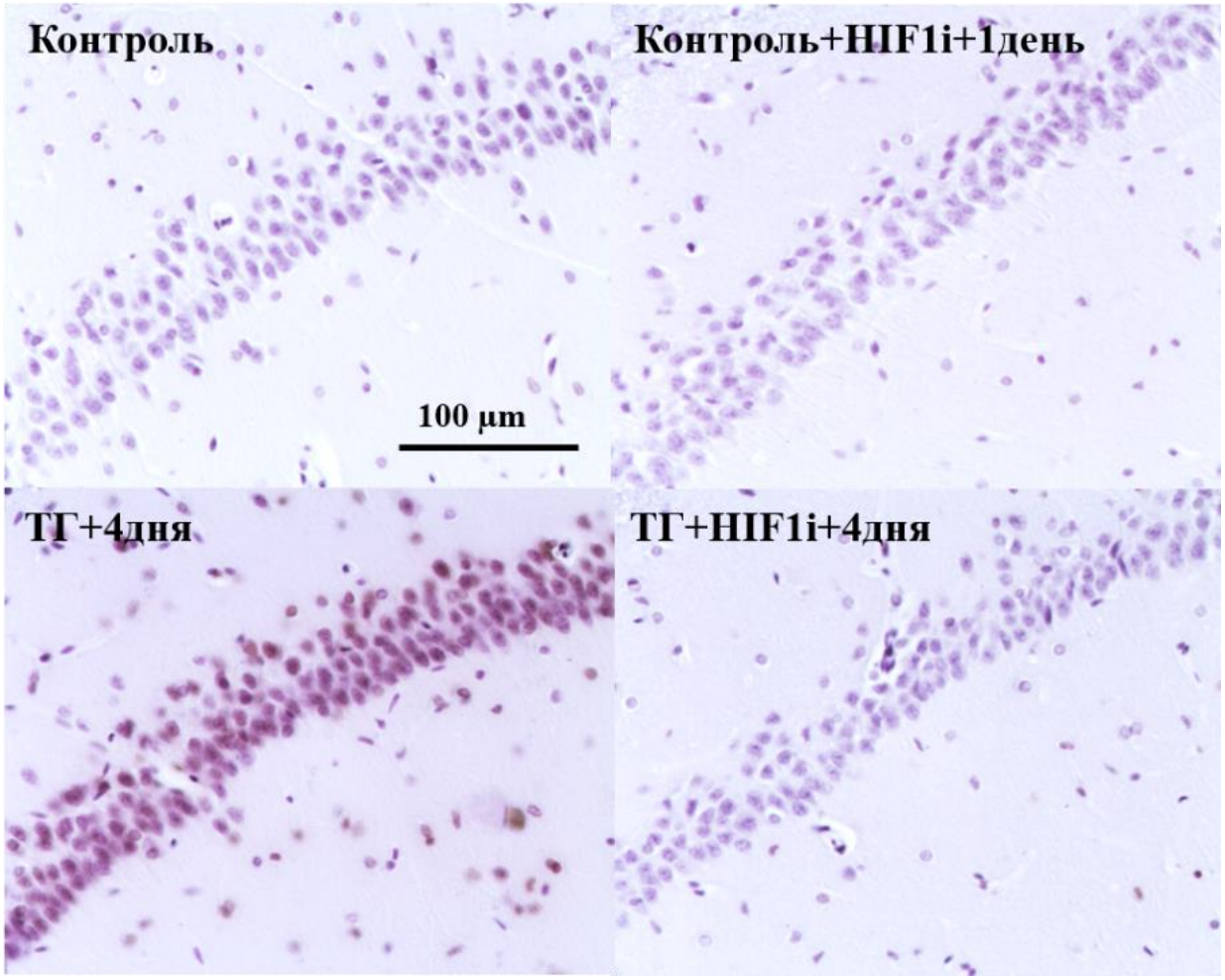


Рисунок 23. Микрофотографии (40х). Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием HIF1 (ТГ+HIFi) на количество TUNEL-позитивных клеток через 4 дня после реоксигенации в CA1 поле гиппокампа крыс. Маркер, 100 мкм.

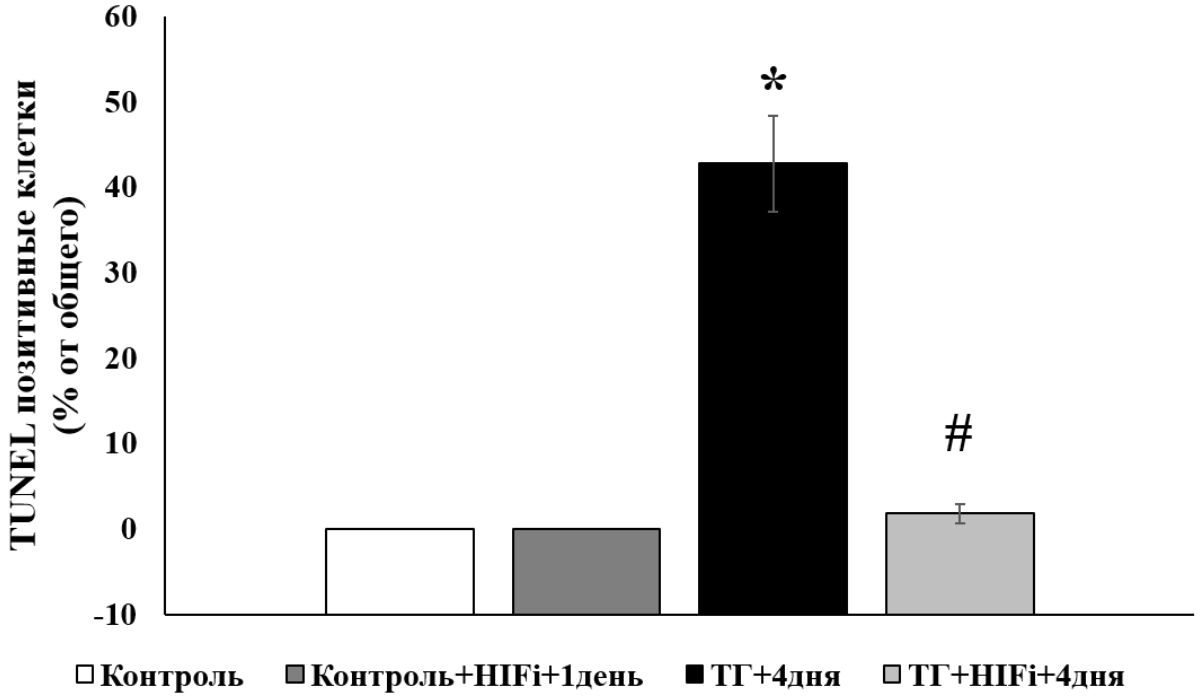


Рисунок 24. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием HIF1 (ТГ+HIFi) на количество TUNEL-позитивных клеток через 4 дня после реоксигенации в CA1 поле гиппокампа крыс. Количество TUNEL-позитивных клеток выражено в % от общего количества клеток. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

Среди множества гипотетических нейропротективных стратегий при коррекции постинсультных патологий наиболее логичным на первый взгляд является использование фармакологических агентов, направленных на мобилизацию активности HIF1 (Siddiq et al. 2005). Однако постинсультные больные уже находятся в состоянии реокигенации, когда метаболические перестройки, запускаемые этим транскрипционным фактором, потенциально могут носить дезадаптивный характер. На данном этапе выполнения исследования нами получены свидетельства запуска апоптоза в гиппокампе крыс в отсроченный постгипоксический период, а также представлены результаты, согласно которым инъекция ингибитора HIF1 перед ТГ оказывает мощный противоапоптотический эффект, что согласуется с ранее полученными данными о вовлечении HIF1 в реализацию патогенеза постишемических патологий (Chen et al., 2009, Sun Y., et al. 2017).

4.02.02. Влияние ингибирования HIF1 на содержание HIF1a, эритропоэтина и Г6ФДГ в CA1 поле гиппокампа

Содержание HIF1a, белкового продукта его транскрипционной активности, цитокина эритропоэтина, и ключевого скрость-лимитирующего фермента пентозофосфатного пути, Г6ФДГ в CA1 поле гиппокампа крыс изучали через 1,2 и 4 дня после ТГ и ТГ в сочетании с предварительным ингибированием HIF1 (ТГ+HIF1i).

С помощью иммуногистохимического анализа содержания HIF1a в CA1 поле гиппокампа (Рисунок 25, 26) нами было показано, что через 1 день после ТГ происходит увеличение средней оптической плотности иммунопозитивных к HIF1a клеток до 180% от контроля, после чего средняя оптическая плотность иммунопозитивных клеток снижается (Рисунок 26)).

При введении крысам ингибитора HIF1 перед сеансом ТГ через 1 день после начала реоксигенации up-регуляция HIF1a не наблюдается (Рисунок 25, 26), что можно было ожидать, исходя из сведений о механизме действия топотекана, блокирующего трансляцию этого транскрипционного фактора. В отсроченном периоде после ТГ уровень HIF1a не отличается от контроля (Рисунок 25, 26), однако происходит уменьшение содержания эритропоэтина, белкового продукта транскрипционной активности HIF1 (59, 58, 44% от контроля через 1, 2 и 4 дня после ТГ, соответственно) (Рисунок 27, 28).

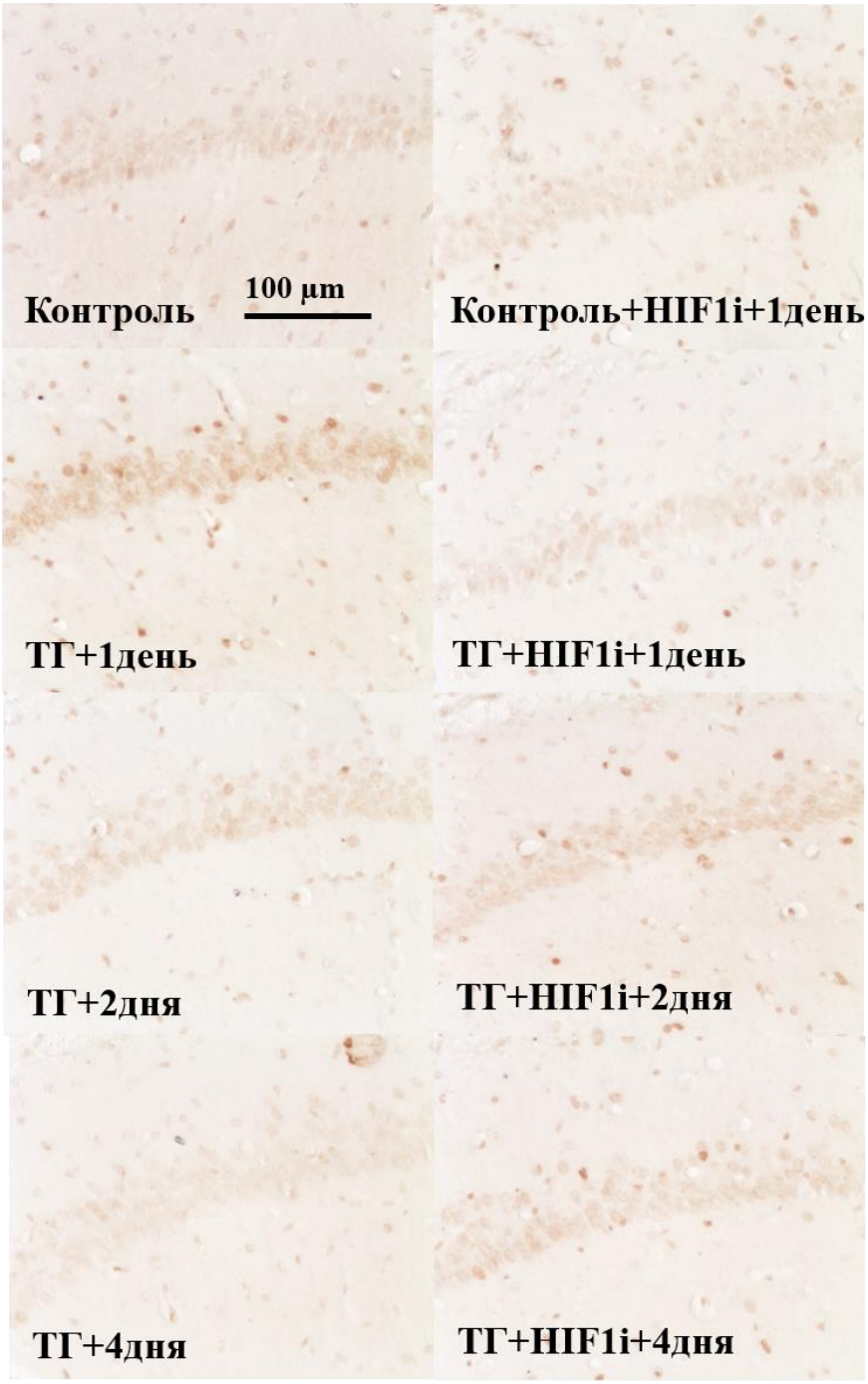


Рисунок 25. Микрофотографии (40x). Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием HIF1 (ТГ+HIF1i) на количество HIF1a в CA1 поле гиппокампа через 1,2 и 4 дня после ТГ. Маркер, 100мкм

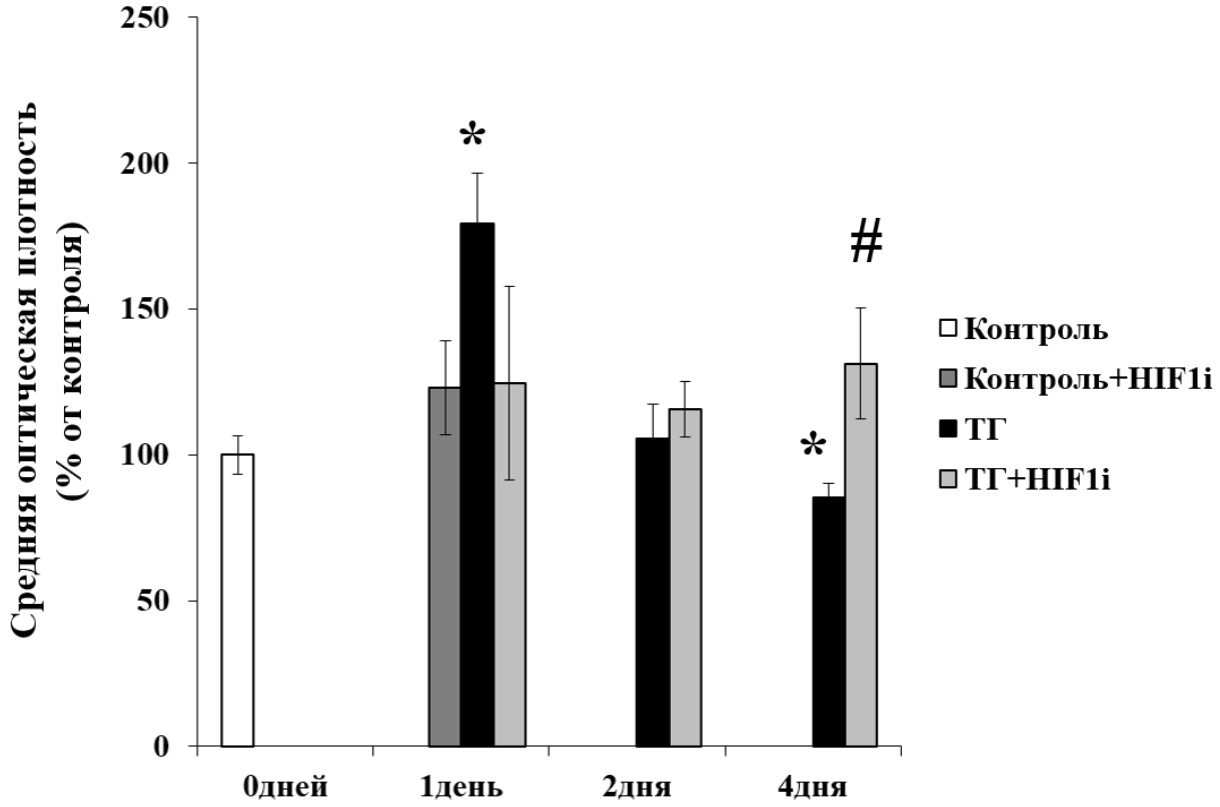


Рисунок 26. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием HIF1 (ТГ+HIF1i) на среднюю оптическую плотность иммунопозитивных к HIF1a клеток в CA1 поле гиппокампа через 1,2 и 4 дня после ТГ. *, Различия достоверны по отношению к контролю, p≤0.05; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, p≤0.05.

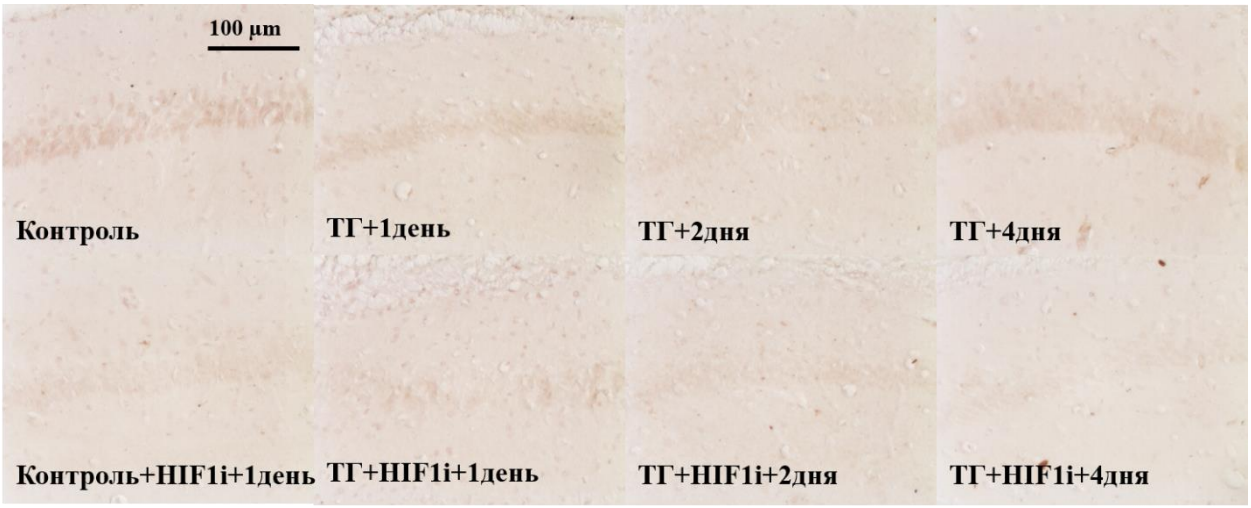


Рисунок 27. Микрофотографии (40x). Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием HIF1 (ТГ+HIF1i) на количество эритропоэтина в CA1 поле гиппокампа через 1,2 и 4 дня после ТГ. Маркер, 100мкм

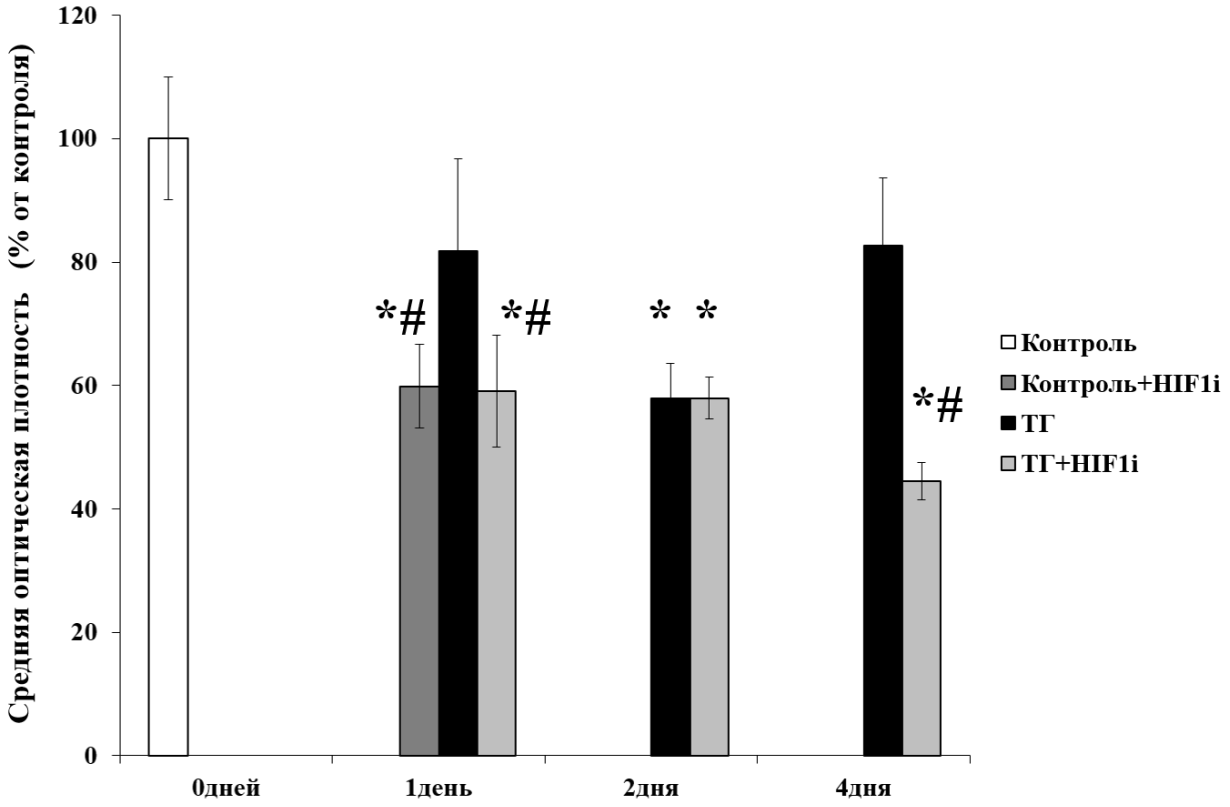


Рисунок 28. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием HIF1 (ТГ+HIF1i) на среднюю оптическую плотность иммунопозитивных к эритропоэтину клеток в СА1 поле гиппокампа через 1,2 и 4 дня после ТГ. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

При исследовании содержания скорость-лимитирующего фермента пентозофосфатного пути, Г6ФДГ (Рисунок 29), нами было обнаружено уменьшение средней оптической плотности иммунопозитивных к Г6ФДГ клеток до 84% от контроля через 4 дня после ТГ.

В свою очередь ингибирование HIF1 перед ТГ предотвращает дефицит экспрессии Г6ФДГ в СА1 поле гиппокампа (83, 122 и 116% от контроля через 1, 2 и 4 дня после ТГ, соответственно; отличия от контроля недостоверны).

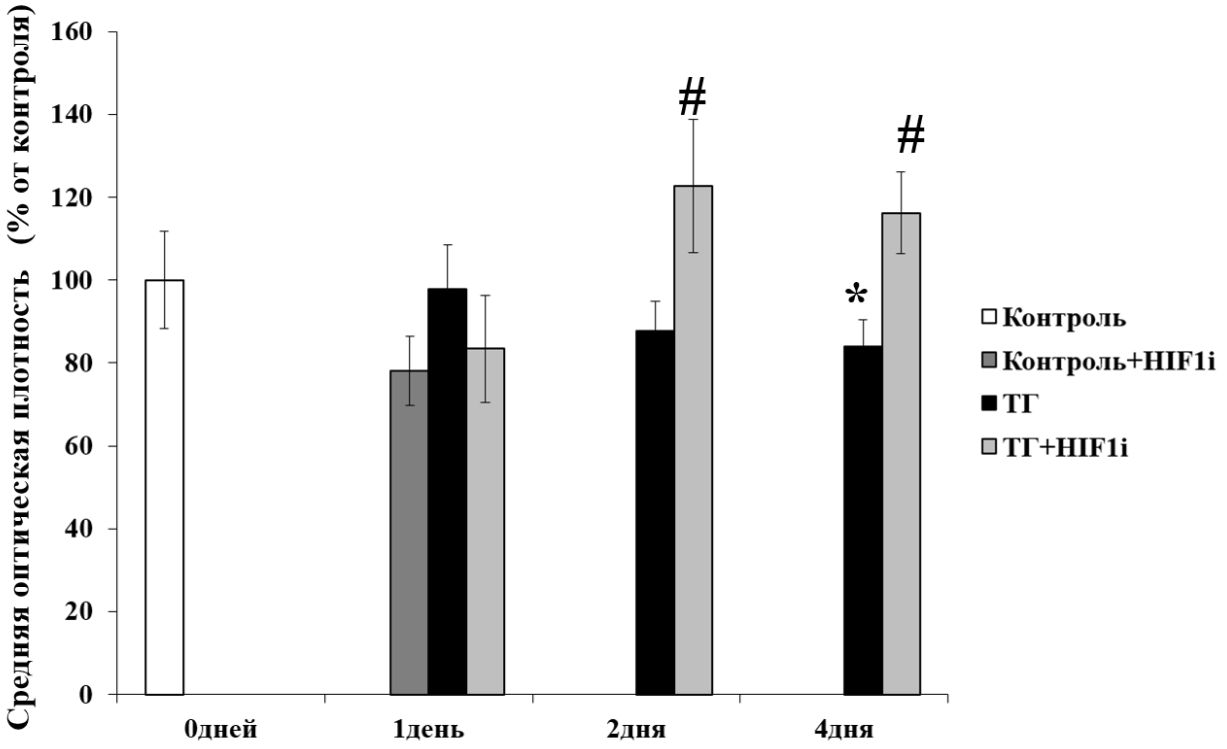


Рисунок 29. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием HIF1 (ТГ+HIF1i) на среднюю оптическую плотность иммунопозитивных к Г6ФДГ клеток в CA1 поле гиппокампа через 1,2 и 4 дня после ТГ. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

Эти эксперименты позволили нам подтвердить ранее представленные результаты (раздел 4.01), согласно которым ТГ приводит к over-экспрессии HIF1a через 1 день после реоксигенации. Инъекция ингибитора HIF1 вызывает долгосрочную супрессию белкового продукта транскрипционной активности HIF1, эритропоэтина, что свидетельствует об эффективности используемого ингибитора. В то же время ингибирование HIF1 непосредственно перед ТГ предотвращает уменьшение содержание Г6ФДГ, что позволяет выдвинуть предположение, противоположное ранее (на основании результатов раздела 4.01) высказанной гипотезе, согласно которому существует отрицательная регуляция ферментов ПФП гипоксия-индуцируемым факторм-1.

.

4.02.03. Анализ активности Г6ФДГ и количества НАДФН

Для оценки функционального состояния пентозофосфатного пути в гиппокампе крыс, переживших ТГ, следующую за инъекцией ингибитора HIF1 или без нее, мы определили активность Г6ФДГ и измерили количество восстановленного НАДФ. Как показано на Рисунке 30, А, через 1 день после ТГ активность Г6ФДГ возрастает до 135% от контроля. Однако в дальнейшем происходит снижение активности этого фермента до 65% через 4 дня реоксигенации. Параллельно этому наблюдается устойчивое уменьшение количества продукта пентозофосфатного пути, НАДФН (Рисунок 30, Б). Так через 1,2 и 4 дня после ТГ его количество в гиппокампе крыс составляет 38, 34 и 52% от контроля, соответственно.

При этом ингибирование HIF1 вызывает сначала снижение активности Г6ФДГ через 1 день после гипоксического воздействия (64% от контроля), а затем постепенную нормализацию активности (86 и 91% от контроля, через 2 и 4 дня после ТГ, соответственно) (Рисунок 30, А)). Количество НАДФН как в случае ингибирования HIF1 перед ТГ, так и при введении ингибитора не подвергавшимся гипоксии крысам, значительно повышен (183, 193 и 159% от контроля через 1,2 и 4 дня после ТГ и 205% от контроля через 1 день после введения негипоксированным крысам) (Рисунок 30, Б).

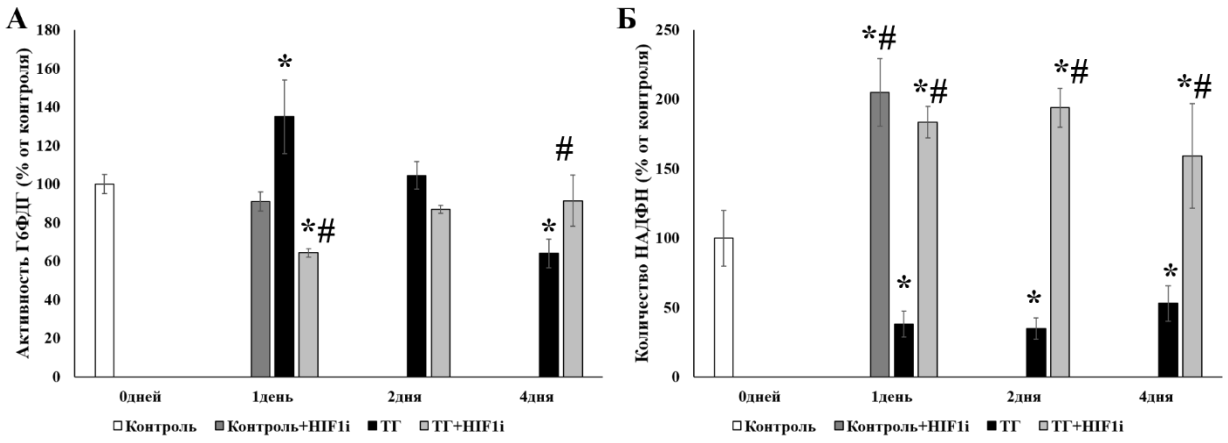


Рисунок 30. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием HIF1 (ТГ+HIF1i) на активность Г6ФДГ (А) и количество НАДФН (Б) в гиппокампе крыс. Активность Г6ФДГ и количество НАДФН нормализованы на количество общего белка и выражены в % от контроля. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

Таким образом, использование ингибитора HIF1a непосредственно перед ТГ предотвращает отсроченное уменьшение активности Г6ФДГ, а также способствует устойчивому накоплению НАДФН, вероятно, как за счет стимуляции ПФП, так и в результате подавления гликолиза, являющегося HIF1- зависимым метаболическим путем, конкурирующим с ПФП за субстрат (Semenza, 2001, Fernandez-Fernandez et al., 2012). Можно предположить, что повышение эффективности ПФП, вызванное ингибированием HIF1, должно способствовать предотвращению ранее выявленного состояния окислительного стресса в гиппокампе крыс, переживших ТГ, а также может лежать в основе нейропротективного действия ингибирования HIF1.

4.02.04. Анализ окислительно-восстановительного статуса, количества общего глутатиона и оснований Шиффа

Для оценки окислительного стресса нами был оценен окислительно-восстановительный статус цитозольной фракции гиппокампа крыс по соотношению тиоловых групп к общему содержанию белка. Как видно из Рисунка 31, А, снижение эффективности ПФП в гиппокампе крыс, переживших ТГ, сопровождается долгосрочным смещением окислительно-восстановительного статуса клеток в сторону окисленного состояния. Так через 1, 2 и 4 дня после ТГ данный показатель составляет 75, 42 и 57% от контроля, соответственно. В то же время инъекция инибитора HIF1 перед ТГ предотвращает этот эффект, и на всех исследованных временых точках для данной группы не выявлено достоверных изменений редокс статуса относительно базального уровня (Рисунок 31, А).

Количество общего глутатиона через 1, 2 и 4 дня после реоксигенации в гиппокампе крыс, переживших ТГ без инъекции ингибитора, составляет всего 14, 15 и 11% от контроля, соответственно, что свидетельствует о ярко выраженном окислительном стрессе (Рисунок 31, Б). При этом инъекция ингибитора HIF1 перед ТГ существенно ослабляет снижение уровня глутатиона. В этом случае количество глутатиона составляет 59, 58 и 54% от контроля через 1, 2 и 4 дня после ТГ, соответственно (Рисунок 31, Б).

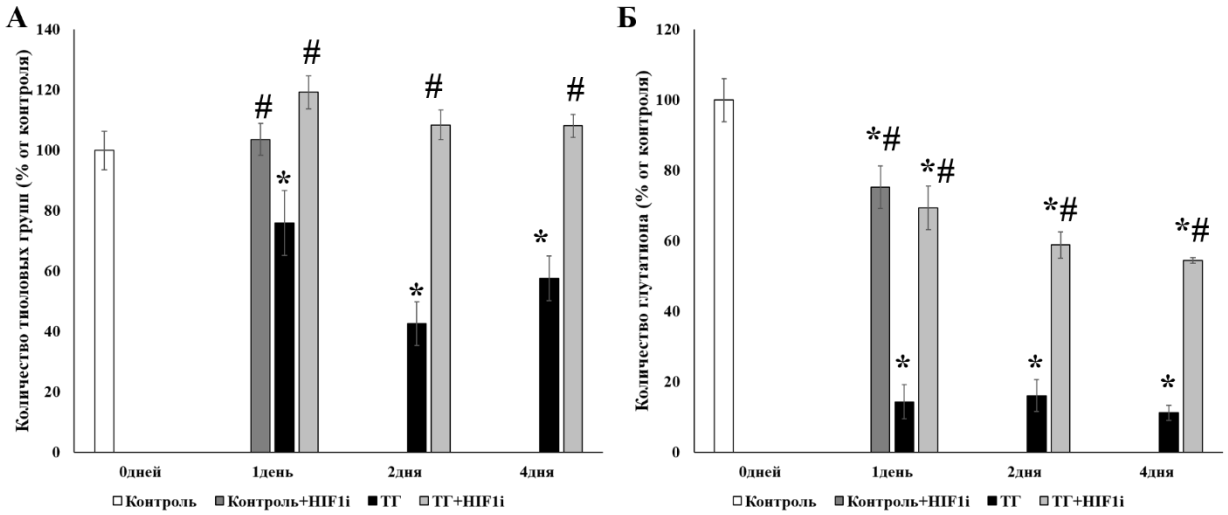


Рисунок 31. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием HIF1 (ТГ+HIF1i) на количество тиоловых групп (А) и количество глутатиона (Б) в гиппокампе крыс. Количество тиоловых групп и глутатиона нормализованы на количество общего белка и выражены в % от контроля. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

При оценке интенсивности перекисного окисления липидов, мы использовали основания Шиффа в качестве маркера. Использование ингибитора HIF1 способствует ослаблению свободнорадикального окисления в течение 2 дней после ТГ (Рисунок 32).

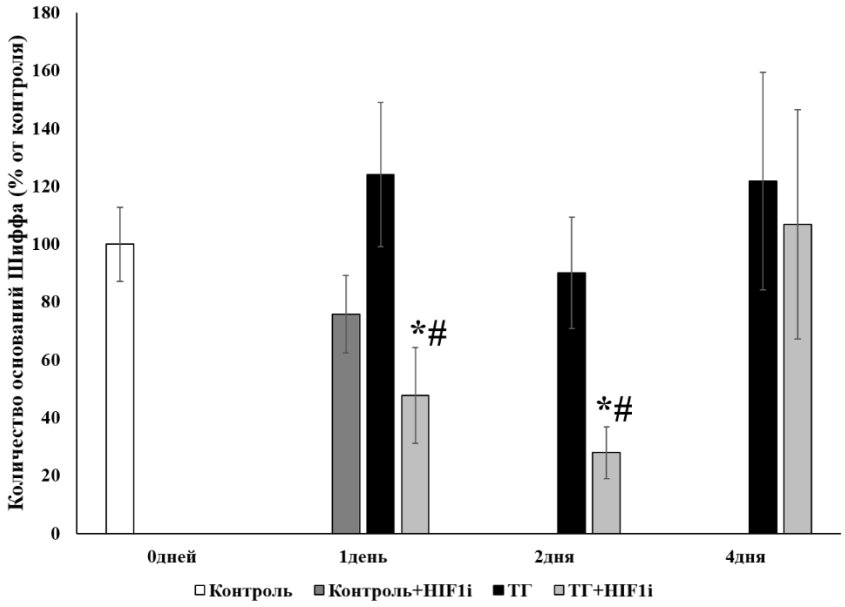


Рисунок 32. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием HIF1 (ТГ+HIF1i) на количество оснований Шиффа в гиппокампе крыс. Количество оснований Шиффа нормализовано на количество общего фосфора

фосфолипидов и выражено в % от контроля *, различия с контролем статистически достоверны, p≤0.05; #, различия статистически достоверны по сравнению с тяжелой гипоксией, p≤0.05

Таким образом, отсроченное уменьшение количества и активности Г6ФДГ и снижение уровня НАДФН в результате ТГ сопровождается формированием долгосрочного окислительного стресса в гиппокампе крыс, что выражается в уменьшении количества тиоловых групп и общего глутатиона и завершается массированной клеточной гибелью. В то же время использование ингибитора HIF1 перед ТГ предотвращает краткосрочную стимуляцию этого транскрипционного фактора, нормализует работу ПФП, а именно способствует повышению количества НАДФН и предотвращает окислительный стресс, тем самым ослабляя интенсивность процессов свободнорадикального окисления липидов и нивелируя апоптотические процессы.

4.03. Использование модели трехкратной умеренной гипобарической гипоксии для анализа роли HIF1 в регуляции транскрипции мРНК Г6ФДГ

С использованием метода ПЦР в реальном времени мы провели исследование взаимосвязи между активностью HIF1 и транскрипцией Г6ФДГ в гиппокампе. В качестве HIF1-позитивной модели мы использовали режим трехкратной умеренной гипобарической гипоксии (3УГГ) (Samoilov et al., 2015) на фоне инъекции ингибитора HIF1 либо без нее.

Как видно на Рисунке 33, количество мРНК Г6ФДГ существенно увеличивается через 3 часа и 24 часа после последнего сеанса УГГ. При этом, ведение ингибитора HIF1 непосредственно перед гипоксическими сеансами усиливает этот эффект как через 3 часа, так и через 24 часа после последнего гипоксического эпизода. В то же время введение ингибитора HIF1 контрольным крысам не оказывает влияния на экспрессию мРНК Г6ФДГ по сравнению с контролем.

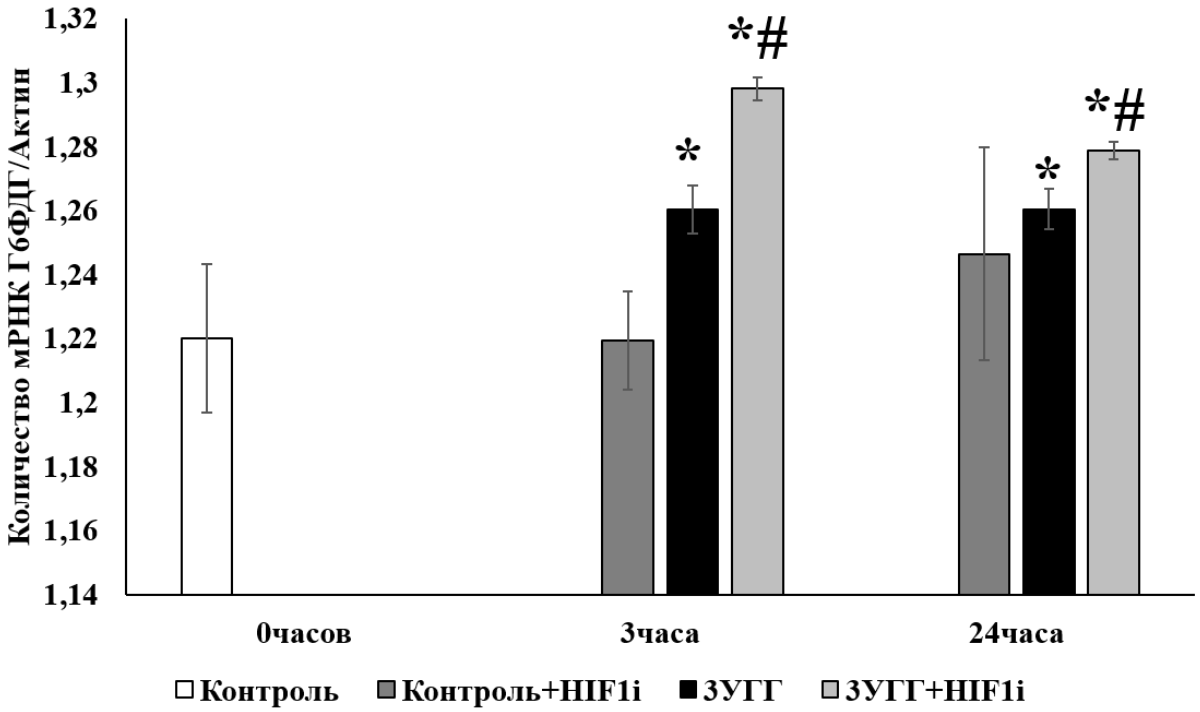


Рисунок 33. Влияние трехкратной умеренной гипобарической гипоксии (3УГГ) и 3УГГ в сочетании с ингибированием HIF1 (3УГГ+HIF1i) на уровень мРНК Г6ФДГ в гиппокампе крыс через 3 и 24 часа после воздействия. Количество мРНК Г6ФДГ нормализовано на количество мРНК актина-бета. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к группе 3УГГ, $p \leq 0.05$.

Таким образом, с использованием HIF1-позитивной модели 3УГГ in vivo, мы показали наличие обратной связи между активностью HIF1 и транскрипцией первого скорость-лимитирующего фермента ПФП, Г6ФДГ, подтвердив ранее полученные нами данные (результаты раздела 4.02) о стимуляции ПФП в гиппокампе крыс, переживших ТГ, посредством ингибирования HIF1. Вопрос о конкретных механизмах положительной регуляции ПФП гипоксией и реоксигенацией остается открытым и требует дальнейших исследований.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения настоящей работы, посвященной расшифровке нейропротективных механизмов гипобарического ПостК, а также оценке вклада HIF1 в реализацию постгипоксических эффектов, нами было показано, что тяжелая гипобарическая гипоксия (ТГ) аналогично ишемическим моделям приводит к ап-регуляции HIF1a через 1 день реокесигенации, однако в дальнейшем вызывая уменьшение его количества. Также в результате гистохимического анализа TUNEL+ клеток и электрофоретического анализа фрагментации ДНК нами подтверждены ранее полученные в нашей лаборатории данные о ТГ-зависимой индукции апоптоза (Rybnikova et al., 2006, 2012). При этом как инъекция ингибитора HIF1 перед ТГ, так и применение ПостК предотвращают развитие апоптотических процессов.

Важнейшим элементом метаболизма мозга, вовлеченным в поддержание антиоксидантных систем и обеспечение нормального окислительно-восстановительного статуса за счет генерации восстановленного НАДФ, признан пентозофосфатный путь (ПФП) метаболизма глюкозы (Fernandez-Fernandez et al., 2012, Ben-Yoseph et al., 1996). В частности, недавно была показана существенная роль ПФП в предотвращении последствий окислительного стресса, индуцированного депривацией кислорода и глюкозы in vitro (Sun S., et al. 2017). В настоящем исследовании, с использованием HIF1-позитивной модели трехкратной умеренной гипобарической гипоксии in vivo, мы показали обратную связь между активностью HIF1 и транскрипцией первого скорость-лимищеготирую фермента ПФП, Г6ФДГ, а также позитивную регуляцию экспрессии гена этого фермента гипоксией и реоксигенацией.

В модели ТГ краткосрочное увеличение количества HIF1a непосредственно после реоксигенации хоть и сопровождалось увеличением активности Г6ФДГ, но не приводило к эффективной наработке НАДФН, возможно за счет гиперактивации конкурирующего с ПФП за субстрат гликолиза, как HIF1-зависимо на уровне транскрипции, так и вследствие опосредованной гипоксией стимуляции активности PFKFB-3 (Semenza, 2001, Fernandez-Fernandez et al., 2012). В свою очередь уменьшение количества и активности Г6ФДГ и снижение уровня НАДФН в отсроченный постгипоксический период сопровождалось формированием долгосрочного окислительного стресса в гиппокампе крыс, приводя к массированной клеточной гибели.

В связи с этим, ингибирование HIF1 перед ТГ, также, как и использование ПостК умеренной гипобарической гипоксией предположительно могли поспособствовать

предотвращению патологии, индуцируемой тяжелой повреждающей гипоксией. В результате проведенных нами исследований установлено, что использование ингибитора HIF1 перед ТГ предотвращает краткосрочную стимуляцию этого транскрипционного фактора, нормализует работу ПФП, усиливая восстановление НАДФ и нивелируя окислительный стресс, способствуя снижению свободнорадикального окисления липидов и предотвращая запуск клеточной гибели по типу апоптоза. ПостК также стабилизирует функционирование ПФП, вероятно HIF1-независимым путем, нормализует редокс статус, количество глутатиона и предотвращает развитие апоптотических процессов.

Функциональная значимость показанной нами роли ПФП в обеспечении защитных реакций мозга на последствия тяжелых форм гипоксии косвенно подтверждается недавно опубликованными данными о протективном эффекте введения НАДФН в ранний постинсультный период (Li et al., 2017). Полученные нами данные объясняют этиологию данного явления, расширяя современные представления о механизмах постгипоксических патологий и способствуя пониманию путей реализации антиапоптотического и антиоксидантного действия гипоксического посткондиционирования. Использование ингибиторов HIF1 в ранний постинсультный период, а также введение НАДФН пациентам, пережившим инсульт, может оказаться эффективной нейропротективной стратегией.

На Рисунке 34 представлено схематическое обобщение основных результатов, полученных нами в ходе выполнения настоящей работы.

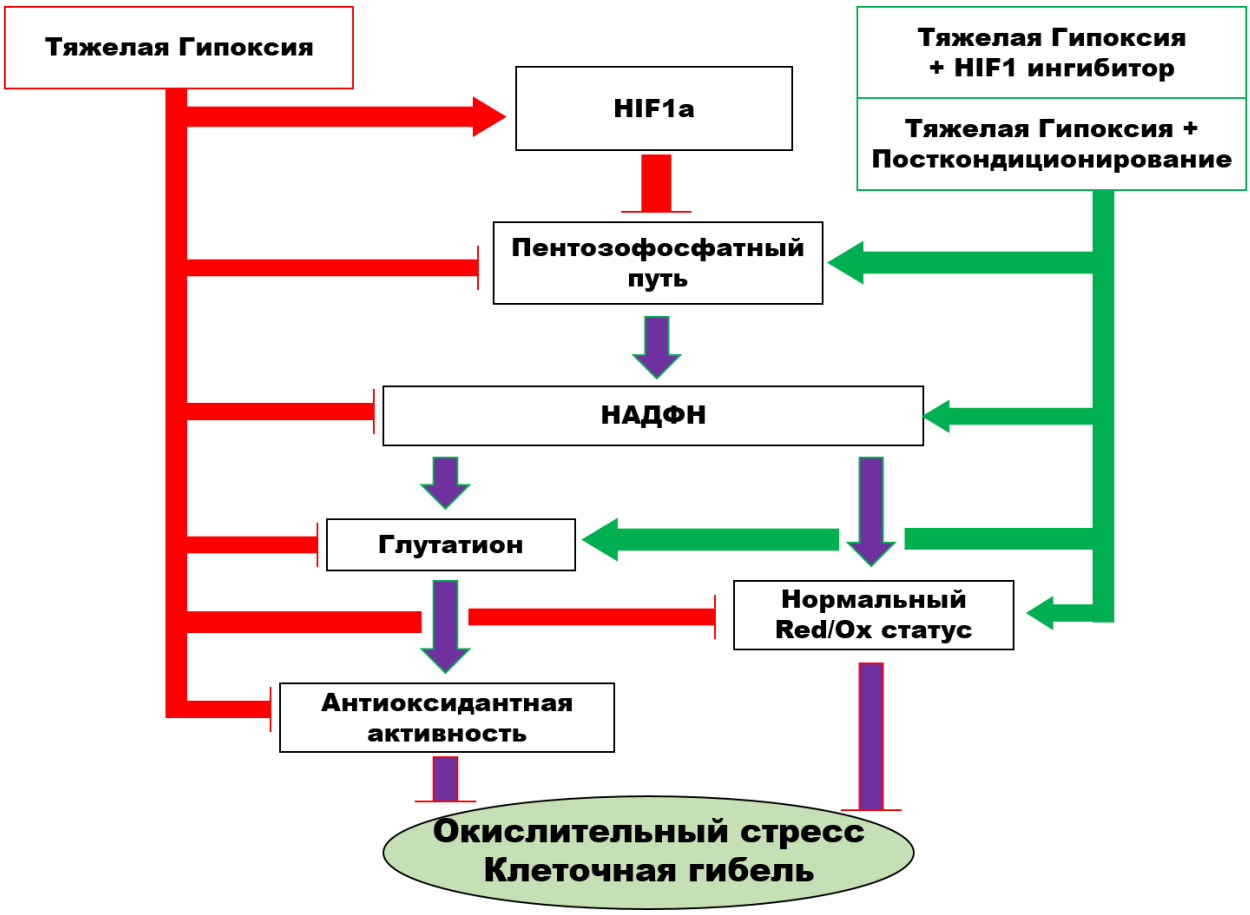


Рисунок 34. Схема регуляции пентозофосфатного пути и связанных с пентозофосфатным путем процессов в гиппокампе крыс, переживших тяжелую гипоксию, тяжелую гипоксию в сочетании с гипоксическим посткондиционированием либо на фоне ингибирования HIF1.

6. ВЫВОДЫ

1. Тяжелая гипоксия вызывает развитие процессов клеточной гибели в мозге крыс, наиболее выраженно проявляющиеся в гиппокампе. Гипоксическое посткондиционирование оказывает противоапоптотическое действие в гиппокампе и неокортексе.
2. Тяжелая гипоксия вызывает уменьшение содержания противоапоптотического белка Bcl-2 в гиппокампе крыс, не оказывая влияния на нейротрофин BDNF в этой структуре мозга, в то же время повышая содержание Bcl-2 и BDNF во втором слое сенсомоторной коры. Гипоксическое посткондиционирование способствует увеличению содержания белков Bcl-2 и BDNF как в гиппокампе, так и в неокортексе крыс, переживших тяжелую гипоксию.
3. Тяжелая гипоксия вызывает гиперэкспрессию HIF1a в CA1 поле гиппокампа в ранний период реоксигенации, ведя к отсроченному снижению содержания и активности Г6ФДГ, уровня НАДФН, общего глутатиона и снижению окислительно-восстановительного статуса в гиппокампе крыс, не оказывая долгосрочного влияния на эти показатели в неокортексе. Предъявление крысам, пережившим тяжелую гипоксию, умеренной гипобарической гипоксии в режиме посткондиционирования предотвращает отсроченное уменьшение содержания и активности Г6ФДГ, в то же время, способствуя нормализации количества НАДФН, общего глутатиона, редокс статуса и снижению процессов свободнорадикального окисления липидов в гиппокампе, но не сенсомоторной коре крыс.
4. Инъекция ингибитора HIF1 крысам перед тяжелой гипоксией способствует предотвращению процессов клеточной гибели в гиппокампе.
5. Инъекция ингибитора HIF1 крысам перед тяжелой гипоксией предотвращает отсроченное уменьшение содержания и активности Г6ФДГ, в то же время способствуя увеличению количества НАДФН, нормализации уровня общего глутатиона, редокс статуса и снижению процессов свободнорадикального окисления липидов в гиппокампе.
6. В модели трехкратной умеренной гипобарической гипоксии установлено наличие обратной связи между активностью HIF1 и экспрессией гена Г6ФДГ. В то же время выявлено увеличение количества мРНК Г6ФДГ в ответ на трехкратную умеренную гипобарическую гипоксию и реоксигенацию.

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа

ГЭБ - гематоэнцефалический барьер

НАДФ(Н) - никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ПААГ – полиакриламидный гель

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПостК УГГ, ПостК – посткондиционирование умеренной гипобарической гипоксией

ПреК – прекондиционирование

ПФП – пентозофосфатный путь

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТГ – тяжелая повреждающая гипоксия

УГГ – умеренная гипобарическая гипоксия

ЦНС – центральная нервная система

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

Bcl2 – белки семейства Bcl2-подобных белков, ассоциированных с митохондриальной индукцией апоптоза

BDNF – brain-derived neurotrophic factor – нейротрофический фактор мозга

HIF1(a) – гипоксия-индуцируемый фактор-1 (альфа)

TUNEL - terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling - dUTP концевое мечение ДНК терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазой

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ватаева Л.А. Влияние тяжелой гипоксии на эмоциональное поведение крыс: корректирующий эффект прекондиционирования/ Л.А. Ватаева, Е.И. Тюлькова, М.О. Самойлов//ДАН. - 2004. - Т. 395 - 109-111 с.
2. Ван Лир Э. Гипоксия/ Э. Ван Лир, К. Сгикней// Медицина. – 1967. - 368с.
3. Владимиров Г.Е. Дыхательная функция крови и тканевое дыхание при пониженном атмосферном давлении/ Г.Е. Владимиров // Основы авиационной медицины. - 1939. - 43-49 с.
4. Гусев Е. Изучение уровня ауто-антител к глутаматным рецепторам в сыворотке крови у больных в остром периоде ишемического инсульта/ Е. Гусев, В. Скворцова, Г. Изыкенова // Журнал неврол. и психиат. – 1996. – Т. 106 - № 5 - 30-34 с.
5. Ещенко Н.Д. Биохимия развивающегося мозга. Избранные разделы/ Н.Д. Ещенко, Ф.Е. Путилина, О.В. Галкина// Изд-во С.-Петерб. ун-та. - 2013. -252 с.
6. Захаров Л.Н. Техника безопасности в химических лабораториях/ Л.Н. Захаров// Химия. - 1991. - 336 с.
7. Зенько М. Экспрессия нейротрофина BDNF в гиппокампе и неокортексе крыс при формировании постстрессорного тревожного состояния и его коррекция гипоксическим посткондиционированием/ М. Зенько, Е. Рыбникова, Т. Глущенко// Морфология. – 2014. – Т. 146 - № 5 - 14-18 с.
8. Маслов Н. Нейропротекторный эффект ишемического посткондиционирования и дистантного прекондиционирования. Перспективы клинического применения/ Н. Маслов, Ю. Лишманов// Ангиология и сосудистая хирургия. – 2012. – Т. 18 - № 2 - 27-34 с.
9. Самойлов М. Адаптивные эффекты прекондиционирования нейронов мозга/ М. Самойлов, Е. Лазаревич, Д. Семенов// Рос. Физиол. Журнал им. И.М.Сеченова. – 2001. – Т. 87 - № 6 - 714-729 с.
10. Самойлов М. Прекондиционирование модифицирует активность митоген-активируемых протеинкиназ и транскрипционного фактора c-jun в гиппокампе крыс вслед за тяжелойгипобарической гипоксией/ М. Самойлов, Е. Рыбникова, Н. Ситник// Нейрохимия. – 2007. – Т. 24. - № 1 - 52-59 с.
11. Самойлов М. О. Молекулярно-клеточные и гормональные механизмы индуцированной толерантности мозга к экстремальным факторам среды/ М.О. Самойлов, Е.А. Рыбникова// Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. – 2012. – Т. 98 - № 1 - 108-126 с.
12. Самойлов М.О. Морфологические отличия эффектов разных режимов прекондиционирования, направленных на коррекцию повреждения нейронов гиппокампа

при действии тяжелой гипобарической гипоксии / М.О. Самойлов, А.В. Чурилова, Т.С. Глущенко// Морфология. - 2015. - Т. 148 - № 6 - 23-27 с.

13. Сеченов И.М. Напряжение кислорода в легочном воздухе при разных условиях/ И.М. Сеченов// Собр.соч. М. : Изд.МГУ. - 1907. 226-231 с.
14. Сиротинин Н.Н. От изучения горной болезни к лечению высокогорным климатом болезней, связанных с кислородным голоданием/ Н.Н. Сиротинин//Науч. сес., посвящ. 25-летней деятельности Эльбрусской экспедиции: Тез. докл. Нальчик. – 1960. - 26-27 с.
15. Сиротинин Н.Н. Высшая нервная деятельность при кислородном голодании/ Н.Н. Сиротинин//Высшая нервная деятельность и кортико-висцеральные взаимоотношения в норме и патологии. Киев. - 1955. - 38-46 с.
16. Сиротинин Н.Н. Повышение резистентности организма к экстремальным воздействиям, связанным с гипоксией, путем акклиматизации к высокогорному климату/ Н.Н. Сиротинин// Учен. Записки Кабардино-Балкарск. Ун-та. - 1966. - № 33 - 147-153 с.
17. Сиротинин Н.Н. Влияние на организм перорального введения кислородной пены/ Н.Н. Сиротинин//Энтеральная оксигенотерапия (Материалы респ. науч. практ. конф.). Киев. - 1968. - 6-11 с.
18. Стрельцов В.В. Влияние кислородного голодания на центральную нервную систему/ В.В. Стрельцов// Под занменем марксизма. - 1940. - № 10 - 162-174 с.
19. Строев С. Экспрессия и ферментативная активность Cu,Zn-супероксиддисмутазы после тяжелой гипоксии в мозге крыс. Эффект прекондиционирования/ С. Строев, Т. Глущенко, Е. Тюлькова// Нейрохимия. – 2003. – Т. 20 - № 3 - 190-195 с.
20. Федин А. Интенсивная терапия ишемического инсульта/ А. Федин, С. Румянцева// М: Медицинская книга. – 2004. – 284 с.
21. Чистякова Н В. Гипоталамо-гипофизарно-надпочичниковая ось и генетические варианты, влияющие на ее активность/ Н.В. Чистякова, К.В. Савостьянов// Генетика. – 2011 – Т. 47 - № 8 – 1013-1025 с.
22. Чурилова А. Влияние умеренной гипобарической гипоксии в режиме прекондиционирования на экспрессию транскрипционных факторов pCREB и NF-kB в гиппокампе мозга крыс до и после тяжелой гипоксии/ А. Чурилова, Е. Рыбникова, Т. Глущенко// Морфология. – 2009. – Т. 136 - № 6 - 38-42 с.
23. Adamczyk S. Sevoflurane pre- and post-conditioning protect the brain via the mitochondrial KATP channel/ S. Adamczyk, E. Robin, M. Simerabet, E. Kipnis, B. Tavernier, B. Vallet, R. Bordet and G. Lebuffe// British Journal of Anaesthesia. – 2010. – Т. 104 - № 2 - 191–200 p.
24. Akerboom T. Assay of Glutathione, Glutathione Disulfide, and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples/ T. Akerboom, P.M. Theodorus, and H. Sies// In Methods in Enzymology.

Volume 77. Detoxification and Drug Metabolism: Conjugation and Related Systems. Academic Press. – 1981. - 373–381 p.

25. Alessi D. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorilates an activates protein kinase B/ D. Alessi, S. James, C. Downes// Curr. Biol. – 1997. – T. 7 - № 4 - 261-269 p.
26. Aronowski J. Reperfusion injury: Demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats/ J. Aronowski, R. Strong, J. Grotta// Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. -1997. – T. 17 - № 10 - 1048-1056 p.
27. Ban H. Hypoxia-inducible factor inhibitors: a survey of recent patented compounds (2004 - 2010)/ H. Ban, Y. Uto, H. Nakamura// Expert Opin Ther Pat. – 2011. – T. 21 - 131-46 p.
28. Bariohay B. BDNF plays a role as an anorexigenic factor in the dorsal vagal complex/ B. Bariohay, B. Lebrun, E. Moyse// Endocrinology. – 2005. – T. 146 - № 12 - 5612-5620 p.
29. Bartlett G. Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glycericacids/ G. Bartlett// J. Biol. Chem. – 1959. – T. 234 - 449–458 p.
30. Benveniste H. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis/ H. Benveniste, J. Drejer, A. Schousboe// J. Neurochem. – 1984. – T. 43 - 1369-1374 p.
31. Ben-Yoseph O. Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress/ O. Ben-Yoseph, P. Boxer, B. Ross// J Neurochem. – 1996. – T. 66 - 2329-2337 p.
32. Block F. Dextromethorphan reduces functional deficits and neuronal damage after global ischemia in rats/ F. Block, M. Schwarz// Brain Res. – 1996. – T. 741 - 153-159 p.
33. Blondeau N. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance/ N. Blondeau, C. Widmann, M. Lazdunski// J. Neurosci. – 2001. – T. 21 - 4668–4677 p.
34. Bokura H. Long-term cognitive impairment associated with caudate stroke/ H. Bokura, R. Robinson// Stroke. – 1997. – T. 28 - 970-975 p.
35. Brenner D. Mitochondrial cell death effectors/ D. Brenner, T. Mak// Curr. Opin. Cell Biol. – 2009. – T. 21 - № 6 - 871–877 p.
36. Caldeira E. Biofunctionalization of Cellulosic Fibres with L-Cysteine: Assessment of Antibacterial Properties and Mechanism of Action against Staphylococcus Aureus and Klebsiella Pneumoniae/ E. Caldeira// Journal of Biotechnology. – 2013. – T. 16 - № 4 - 426–35 p.
37. Chatagner A. Erythropoietin and neuroprotection/ A. Chatagner, P.S. Huppi, R. Ha-Vinh Leuchter, S. Sizonenko// Arch. Pediatr. – 2010. – T. 17 - № 3 - 78-84 p.

38. Chavez J. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in the brain of rats during chronic hypoxia/ J. Chavez, F. Agani, P. Pichiule, J. LaManna// J. Appl. Physiol. – 2000. – T. 89 - 1937-1942 p.
39. Chen D. Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function/ D. Chen, M. Li, J. Luo, W. Gu// J. Biol. Chem. – 2003. – T. 278 - 13595-13598 p.
40. Chen C. Early inhibition of HIF-1alpha with small interfering RNA reduces ischemic-reperfused brain injury in rats/ C. Chen, Q. Hu, J. Yan, X. Yang, X. Shi, J. Lei, L. Chen, H. Huang, J. Han, J. Zhang, C. Zhou// Neurobiol. Dis. – 2009. – T. 33 - 509-517 p.
41. Chiueh C. Induction of thioredoxin and mitochondrial survival proteins mediates preconditioning-induced cardioprotection and neuroprotection/ C. Chiueh, T. Andoh, P. Chock// Ann. N Y Acad. Sci. – 2005. – T. 1042 - 403-418p.
42. Danielisova V. The changes in endogenous antioxidant enzyme activity after postconditioning/ V. Danielisova, M. Nemethova, M. Gottlieb// Cell. Mol Neurobiol. – 2006. – T. 26 - № 8 - 1181-1191 p.
43. Dengler V. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors / V. Dengler, M. Galbraith, J. Espinosa// Crit Rev Biochem Mol Biol, - 2014. – T. 49 - № 1 - 1–15 p.
44. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes/ M. Deponte// Biochim Biophys Acta. – 2013. – T. 1830 - 3217-3266 p.
45. Dosenko V. Proteasome inhibitors eliminate protective effect of postconditioning in cultured neonatal cardiomyocytes/ V. Dosenko, V. Nagibin, L. Tumanovskaya// Fiziol Zh. – 2006. – T. 52 - 15–24 p.
46. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain/ R. Dringen// Prog Neurobiol. – 2000. – T. 62 - 649-671 p.
47. Esposito E. Effects of Postconditioning on Neurogenesis and Angiogenesis During the Recovery Phase After Focal Cerebral Ischemia/ E. Esposito, K. Hayakawa, T. Maki, K. Arai, H. Eng// Stroke. – 2015. – T. 46 – 2691-2694 p.
48. Fernandez-Fernandez S. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes/ S. Fernandez-Fernandez, A. Almeida, J. Bolaños// Biochem J. – 2012. – T. 443 - 3-11 p.
49. Fisher M. New perspectives on developing acute stroke therapy/ M. Fisher, R. Ratan// Ann Neurol. – 2003. – T. 53 - 10–20 p.
50. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipidsfrom animal tissues/ J. Folch// J. Biol. Chem. – 1957. – T. 226 - 497–509 p.
51. Gamdzyk M. Hypobaric Hypoxia Postconditioning Reduces Brain Damage and Improves Antioxidative Defense in the Model of Birth Asphyxia in 7-Day-Old Rats/ M. Gamdzyk, D.

Makarewicz, M. Słomka, A. Ziembowicz, E. Salinska// Neurochem Res. – 2014. – T. 39 - 68–75 p.

52. Gao X. The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways/ X. Gao, H. Zhang, T. Takahashi// J. Neurochem. – 2008. – T. 105 - 943–955 p.
53. Gao X. Protective effects of ischemic postconditioning compared with gradual reperfusion or preconditioning/ X. Gao, C. Ren, H. Zhao// J Neurosci Res. – 2008. – T. 86 - 2505–2511 p.
54. Gao L. Inhibition of Autophagy Contributes to Ischemic Postconditioning-Induced Neuroprotection against Focal Cerebral Ischemia in Rats/ L. Gao, T. Jiang, J. Guo, Y. Liu, G. Cui, L. Gu, L. Su, Y. Zhang// PLOS ONE. – 2012. - T. 7 - № 9 - e46092.
55. Goto K. Effects of cycloheximide on delayed neuronal death in rat hippocampus/ K. Goto, A. Ishige, K. Sekiguchi// Brain Res. – 1990. - T. 534 - 299-302 p.
56. Grewal S. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons/ S. Grewal, R. York, P. Stork// Curr. Opin. in Neurobiology. – 1999. – T. 9 - № 5 - 544-553 p.
57. Guo S. Glucose up-regulates HIF-1 alpha expression in primary cortical neurons in response to hypoxia through maintaining cellular redox status/ S. Guo, O. Bragina, Y. Xu, Z. Cao, H. Chen, B. Zhou, M. Morgan, Y. Lin, B. Jiang, K. Liu, H. Shi// J Neurochem. – 2008. – T. 105 - 1849-1860 p.
58. Hara T. CREB is required for acquisition of ischemic tolerance in gerbil hippocampal CA1 region/ T. Hara, J. Hamada, S. Yano// J.Neurochem. – 2003. – T. 86 - 805–814 p.
59. Halestrap A. A pore way to die: The role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection/ A. Halestrap// Biochemical Society Transactions. – 2010. – T. 38 - № 4 - 841-860 p.
60. Hartley D. Glutamate receptor-induced Ca2+ accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration/ D. Hartley, M. Kurth, L. Bjerkness// J. Neurosci. – 1993. – T. 13 - 1993-2000 p.
61. Herdegen T. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins/ T. Herdegen, J. Leah// Brain Res. Rev. – 1998. – T. 28 - № 3 - 370–490 p.
62. Howe C. NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway/ C. Howe, J. Valletta, A. Rusnak// Neuron. – 2001. – T. 32 - № 5 - 801-814 p.

63. Iliodromitis E. Protection from postconditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs/ E. Iliodromitis, M. Georgiadis, M. Cohen// Basic Res Cardiol. – 2006. – T. 101 - 502–507 p.
64. Iwatsuki K. STAT5 activation correlates with erythropoietin receptor-mediated erythroid differentiation of an erythroleukemia cell line/ K. Iwatsuki, T. Endo, H. Misawa// J Biol Chem. - 1997. – T. 272 - № 13 - 8149-8152 p.
65. Jiang B. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia- inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension/ B. Jiang, J. Zheng, S. Leung// J Biol Chem. – 1997. – T. 272 - № 31 - 19253-60 p.
66. Jiang X. Neuroprotection against spinal cord ischemia-reperfusion injury indused by different ischemic-postconditioning methods: roles of phosphoinositide-3-kinase-Akt and ERK/ X. Jiang, E. Shi// Anesthesiology. – 2009. – T. 111 - № 6 - 1197-1205 p.
67. John F. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha/ F. John, O'Rourke, Ya-Min// J Biol Chem. – 1999. – T. 274 - № 4 - 2060-2071 p.
68. Jonassen A. Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling/ A. Jonassen, M. Sack, O. Mjos// Circ. Res. – 2001. – T. 89 - № 12 - 1191-1198 p.
69. Jourdain P. L-Lactate protects neurons against excitotoxicity: implication of an ATP-mediated signaling cascade/ P. Jourdain, I. Allaman, K. Rothenfusser, H. Fiumelli, P. Marquet, P. Magistretti// Scientific Reports. – 2016. – T. 6 - № 19 – 21250 p.
70. Karin M. NF-kappaB at the crossroads of life and death/ M. Karin, A. Lin// Nat. Immunol. – 2002. – T. 3 - 221-227 p.
71. Kim J. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia/ J. Kim, I. Tchernyshyov, G. Semenza, C. Dang// Cell Metab. – 2009. – T. 3 - 177-185 p.
72. Kin H. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine/ H. Kin, A. Zatta, M. Lofye// Cardiovasc Res. – 2005. – T. 67 - 124–133 p.
73. Kislin M. Changes in lipid peroxidation in the hippocampus and neocortex after severe hypobaric hypoxia/ M. Kislin, E. Tulkova, M. Samoilov// Neurochem J. – 2009. – T. 3 - 184-190 p.
74. Kislin M. Dynamics of lipid peroxidation of membranes in cells and mitochondrial fraction of neocortex in non- and preconditioned rats after severe hypobaric hypoxia/ M. Kislin, E. Tulkova, M. Samoilov// J Evol Physiology and Biochem. – 2011. – T. 47 - 187-192 p.
75. Knapska E. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK?/ E. Knapska, L. Kaczmarek// Prog. Neurobiol. – 2004. – T. 74 - № 4 - 183–211

p.

76. Kristian T. Calcium in ischemic cell death/ T. Kristian, E. Siesjo// Stroke. – 1998. – T. 29 - 705-718 p.
77. Kodama T. Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression/ T. Kodama, N. Shimizu, N. Yoshikawa, Y. Makino, R. Ouchida, K. Okamoto, T. Hisada, H. Nakamura, C. Morimoto, H. Tanaka// J Biol Chem. – 2003. – T. 278 - 33384-33391 p.
78. Krolikowski J. Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo/ J. Krolikowski, D. Weihrauch, M. Bienengraeber// Can J Anaesth. – 2006. – T. 53 - 174–182 p.
79. Kumar R. Mitochondrial dynamics following global cerebral ischemia/ Kumar, R., Bukowski, M., Wider, J., Reynolds, C., Calo, L., Lepore, B., Tousignant, R., Jones, M., Przyklenk, K., Sanderson, T.// Mol Cell Neurosci. – 2016. – T. 76 - 68-75.
80. Leconte C. Delayed hypoxic postconditioning protects against cerebral ischemia in the mouse/ C. Leconte, E. Tixier, T. Freret// Stroke. – 2009. – T. 40 - 3349–3355 p.
81. Lester H. Psychiatric drugs bind to classical targets within early exocitotic pathways: therapeutic effects/ H. Lester, J. Miwa, R. Srinivasan// Biol. Psychiatry. – 2012. – T. 72 - 907-915 p.
82. Li M. Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, a Pentose Phosphate Pathway Product, Might Be a Novel Drug Candidate for Ischemic Stroke/ M. Li, Z. Zhou, M. Sun, L. Cao, J. Chen, Y. Qin, J. Gu, F. Han, R. Sheng, J. Wu, Y. Ding, Z. Qin// Stroke. – 2017. – T. 47 - 187-195 p.
83. Li Z. Ischaemic Postconditioning Rescues Brain Injury Caused by Focal Ischaemia/ Reperfusion via Attenuation of Protein Oxidization/ Z. Li, J. Yu, F. Yang, Y. Luo and P. Ge// The Journal of International Medical Research. – 2012. – T. 40 - 954 – 966 p.
84. Loboda A. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical/ A. Loboda, A. Jozkowicz, Dulak// J.Mol Cells. – 2010. – T. 29 - № 5 - 435-442 p.
85. Lukyanova L. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia/ L. Lukyanova, Y. Kirova// Front Neurosci. – 2015. – T. 9. – 00320.
86. Ma X. Advances in research of the neuroprotective mechanisms of cerebral ischemic postconditioning/ X. Ma, J. Song, M. Zhang, J. An, Y. Zhao and B. Zhang// International Journal of Neuroscience. – 2015. – T. 125 – 161-169 p.
87. Maiti P. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain/ P. Maiti, S. Singh, A. Sharma, S. Muthuraju, P. Banerjee, G. Ilavazhagan// Neurochem Int. – 2006. – T. 49 - 709-716 p.
88. Sugawara T. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia/ T. Sugawara, P. Chan// Antioxid Redox Signal. – 2003. – T. 5 - 597-607 p.

89. Maslov L. Postconditioning is a universal protective phenomenon/ L. Maslov, T. Krig, V. Diwan// Patologicheskaia Fiziologiia i Èksperimental'naia Terapiia. – 2009. – T. 3 - 2-6 p.
90. Masson N. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation/ N. Masson, C. Willam, P. Maxwell// EMBO J. – 2001. – T. 20 - № 18 - 5197-5206 p.
91. McCubrey J. Targeting the Raf/MEK/ERK pathway with small-molecule inhibitors/ J. McCubrey, M. Milella, A. Tafuri// Current Opinion in Investigational Drugs. – 2008. – T. 9 - № 6 - 614-630 p.
92. McMurtrey R. Isoflurane preconditioning and postconditioning in rat hippocampal neurons/ R. McMurtrey, Z. Zuo// Brain Research. – 2010. – T. 1358 – 184-190 p.
93. Meijer T. Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy/ T. Meijer, J. Kaanders, P. Span, J. Bussink // Clin Cancer Res. – 2012. – T. 18 - 5585-94 p.
94. Nagel S. Neuroprotection by dimethyloxalylglycine following permanent and transient focal cerebral ischemia in rats/ S. Nagel, M. Papadakis, R. Chen, L. Hoyte, K. Brooks, D. Gallichan, N. Sibson, C. Pugh, A. Buchan// J Cereb Blood Flow Metab. – 2010. – T. 31 - 132-143 p.
95. Nemethova M. Ischemic postconditioning in the rat hippocampus: mapping of proteins involved in reversal of delayed neuronal death/ M. Nemethova, V. Danielisova, M. Gottlieb// Arch Ital Biol. – 2010. – T. 148 - 23–32 p.
96. Nita D. Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat/ D. Nita, V. Nita, S. Spulber, M. Moldovan, D. Popa, A. Zagrean, L. Zagrean// J Cell Mol Med. – 2010. – T. 5 - 163-170 p.
97. Nitatori T. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis/ T. Nitatori, N. Sato, S. Waguri// J. Neurosci. – 1995. T. 15 - 1001-1011 p.
98. Obal D.The influence of mitochondrial KATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo/ D. Obal, S. Dettwiler, C. Favoccia// Anesth Analg. – 2005. – T. 101 - 1252–1260 p.
99. Ogunshola O. Epo and non-hematopoietic cells: what do we know?/ O. Ogunshola, A. Bogdanova// Methods Mol. Biol. - 2013. – T. 982 - 13-41 p.
100. Paxinos G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates/ G. Paxinos, C. Watson// Academic Press. - 1986.
101. Peng B. Remote ischemic postconditioning protects the brain from global cerebral ischemia/reperfusion injury by up-regulating endothelial nitric oxide synthase through the PI3K/Akt pathway/ B. Peng, Q. Guo, Z. He, Z. Ye, Y. Yuan, N. Wang, J. Zhou// Brain Research.

– 2012. – T. 1445 – 92-102 p.

102. Pereira R. SPI-1 transforming properties depend upon specifically activated forms of the EPOR/ R. Pereira, J. Raingeaud, M. Pironin// Oncogene. – 2000. – T. 19 - № 44 - 5106-5110 p.

103. Pradelli L. Mitochondrial control of caspase-dependent and - independent cell death/ L. Pradelli, M. Bénéteau, J. Ricci// Cell. Mol. Life Sci. – 2010. – T. 67 - № 10 - 1589–1597 p.

104. Rapisarda A Increased antitumor activity of bevacizumab in combination with hypoxia inducible factor-1 inhibition/ A. Rapisarda, M. Hollingshead, B. Uranchimeg, C. Bonomi, S. Borgel, J. Carter, B. Gehrs, M. Raffeld, R. Kinders, R. Parchment, M. Anver, R. Shoemaker, G. Melillo// Mol Cancer Ther. – 2009. – T. 8 - 1867-1877 p.

105. Ren C. Delayed postconditioning protects against focal ischemic brain injury in rats/ C. Ren, X. Gao, G. Niu// PLoS ONE. – 2008. – T. 3 - № 12 - e3851.

106. Ren C. Limb remote ischemic postconditioning protects against focal ischemia in rats/ C. Ren, Z. Yan, D. Wei, X. Gao, X. Chen, H. Zhao// Brain Research. – 2009. – T. 1288 – 88-94 p.

107. Rybnikova E. Mild preconditioning hypoxia modificates NGFI-A mRNA expression in the rat brain induced by severe hypoxia/ E. Rybnikova, E. Tulkova, M. Pelto-Huikko// Neurosci Lett. – 2002. - T. 329 - № 1 - 49-52 p.

108. Rybnikova E. The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats/ E. Rybnikova, N. Sitnik, T. Gluschenko// Brain Res. – 2006. – T. 1089 - № 1 - 195-202 p.

109. Rybnikova E. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappaB in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia/ E. Rybnikova, T. Gluschenko, E. Tulkova// J. Neurochem. – 2008. – T. 106 - 1450-1458 p.

110. Rybnikova E. Mild hypobaric hypoxia preconditioning up-regulates expression of transcription factors c-Fos and NGFI-A in rat neocortex and hippocampus/ E. Rybnikova, T. Gluschenko, E. Tulkova// Neurosci. Res. – 2009. – T. 65 - 360-366 p.

111. Rybnikova E. Expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in hippocampus of rats exposed to various modes of hypobaric hypoxia: Putative role in hypoxic preconditioning/ E. Rybnikova, T. Glushchenko, A. Churilova// Brain Res. – 2011. – T. 1381 - 66- 77 p.

112. Rybnikova E. Postconditioning by mild hypoxic exposures reduces rat brain injury caused by severe hypoxia/ E. Rybnikova, M. Vorobyev, S. Pivina// Neurosci Lett. – 2012. – T. 513 - № 1 - 100-105p.

113. Rybnikova E. Current insights into the molecular mechanisms of hypoxic pre- and postconditioning using hypobaric hypoxia/ E. Rybnikova, M. Samoilov// Front. Neurosci. – 2015. – T. 23 - № 9 – 388.

114. Samoilov M. The pattern of the expression of hypoxia-inducible factor (HIF-1α) in the neocortex and hippocampus of rats after the presentation of different modes of hypobaric hypoxia/ M. Samoilov, M. Sidorova, T. Glushchenko// Neurochemical Journal. – 2015. – T. 9 - 299–305 p.

115. Sanderson T. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation/ T. Sanderson, C. Reynolds, R. Kumar, K. Przyklenk, M. Hüttemann// Mol Neurobiol. – 2013. – T. 47 - 9-23 p.

116. Scartabelli T. Neuroprotection by group I mGlu receptors in a rat hippocampal slice model of cerebral ischemia is associated with the PI3K-Akt signaling pathway: a novel postconditioning strategy?/ T. Scartabelli, E. Gerace, E. Landucci// Neuropharmacology. – 2008. – T. 55 - 509–516 p.

117. Semenza G. HIF-1 and human disease: one highly involved factor/ G. Semenza// Genes Dev. – 2000. – T. 14 - 1983-1991 p.

118. Semenza G. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology/ G. Semenza// Trends Mol Med. – 2001. – T. 7 - 345-350 p..

119. Siddiq A. Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase inhibition. A target for neuroprotection in the central nervous system/ A. Siddiq, I. Ayoub, J. Chavez, L. Aminova, S. Shah, J. LaManna, S. Patton, J. Connor, R. Cherny, I. Volitakis, A. Bush, I. Langsetmo, T. Seeley, V. Gunzler, R. Ratan// J Biol Chem. – 2005. – T. 280 - 41732-41743 p.

120. Siesjo E. Free radicals and brain damage/ E. Siesjo, C. Agadh, F. Bengtsson// Brain Metab. Rev. – 1989. – T. 1 - 165-211 p.

121. Sheldon R. Hypoxic preconditioning protection is eliminated in HIF-1α knockout mice subjected to neonatal hypoxia-ischemia/ R. Sheldon, C. Lee, X. Jiang, R. Knox, D. Ferriero// Pediatr Res. – 2014. – T. 76 - 46-53 p.

122. Skyschally A. Ischemic postconditioning in pigs: No causal role for risk activation/ A. Skyschally, P. Van Caster, Boengler// Circ. Res. – 2009. – T. 104 - 15-18 p.

123. Song W. Ischemic postconditioning induced neuroprotection via up-regulation of endogenus antioxidant enzyme activities: experiment with rabbits/ W. Song, H. Dong, O. Cheng// Zhonghua Yi Xue Za Zhi. – 2008. – T. 88 - № 33 - 2355-2359 p.

124. Speer R. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases as targets for neuroprotection by "antioxidant" metal chelators: From ferroptosis to stroke/ R. Speer, S. Karuppagounder, M. Basso, S. Sleiman, A. Kumar, D. Brand, N. Smirnova, I. Gazaryan, S. Khim, R. Ratan.// Free Radic Biol Med. – 2013. – T. 62 - 26-36 p.

125. Staat P. Postconditioning the human heart/ P. Staat, G. Rioufol, C. Piot// Circulation. - 2005. – T. 112 - 2143–2148 p.

126. Stenqvist A. Genetic evidence for selective neurotrophin 3 signalling through TrkC but not TrkB in vivo/ A. Stenqvist, K. Agerman, F. Marmigere// EMBO Rep. – 2005. – T. 6 - 973-978 p.

127. Stroev S. Preconditioning enhances the expression of mitochondrial antioxidant thioredoxin-2 in forebrain of rats exposed to server hypobaric hypoxia/ S. Stroev, T. Gluschenko. E. Tjulkova// J. Neurosci. Res. - 2004a. – T. 78 - 563-569 p.

128. Stroev S. The augmentation of brain thioredoxin-1 expression after sever hypobaric hypoxia by the preconditioning in rats/ S. Stroev, E. Tjulkova, T. Gluschenko// Neurosci. Lett. - 2004b. – T. 370 - 224-229 p.

129. Sun S. Cannabidiol attenuates OGD/R-induced damage by enhancing mitochondrial bioenergetics and modulating glucose metabolism via pentose-phosphate pathway in hippocampal neurons/ S. Sun, F. Hu, J. Wu and S. Zhang// Redox Biol. – 2017. – T. 11 - 577–585 p.

130. Sun, Y. β2-Adrenergic Receptor-Mediated HIF-1α Upregulation Mediates Blood Brain Barrier Damage in Acute Cerebral Ischemia/ Y. Sun, X. Chen, X. Zhang, X. Shen, M. Wang, X. Wang, W. Liu, C. Liu, J. Liu and X. Jin// Front Mol Neurosci. – 2017. – T. 10 – 257 p.

131. Tian Y. Differential sensitivity of hypoxia inducible factor hydroxylation sites to hypoxia and hydroxylase inhibitors/ Y. Tian, K. Yeoh, M. Lee, T. Eriksson, B. Kessler, H Kramer, M. Edelmann, C, Willam, C. Pugh, C. Schofield, P. Ratcliffe// J Biol Chem. – 2011. – T. 286 - 13041-51 p.

132. Ulusu N. Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E/ N. Ulusu, M. Sahilli, A. Avci, O. Canbolat, G. Ozansoy, N. Ari, M. Bali, M. Stefek, S. Stolc, A. Gajdosik, C. Karasu// Neurochem Res. – 2003. – T. 28 - 815-823 p.

133. Vetrovoy O. Mild Hypobaric Hypoxic Postconditioning Increases the Expression of HIF1α and Erythropoietin in the CA1 Field of the Hippocampus of Rats That Survive after Severe Hypoxia/ O. Vetrovoy, E. Rybnikova, T. Glushchenko, K. Baranova and M. Samoilov// Neurochemical Journal. – 2014. – T. 8 - № 2 - 103–108 p.

134. Vetrovoi O. Effects of Hypoxic Postconditioning on the Expression of Antiapoptotic Protein Bcl-2 and Neurotrophin BDNF in Hippocampal Field CA1 in Rats Subjected to Severe Hypoxia/ O. Vetrovoi, E. Rybnikova, T. Glushchenko and M. Samoilov// Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2015. – T. 45 - № 4 - 367-370 p.

135. Vetrovoi O. Effects of Hypobaric Hypoxia in Various Modes on Expression of Neurogenesis Marker NeuroD2 in the Dentate Gyrus of Rats Hippocampus/ O. Vetrovoi, E. Rybnikova, T. Glushchenko and M. Samoilov// Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2016. – T. 160 - № 4 - 510-513 p.

136. Vetrovoy, O. Neuroprotective effect of hypobaric hypoxic postconditioning is accompanied by dna protection and lipid peroxidation changes in rat hippocampus/ O. Vetrovoy, E. Tulkova, K. Sarieva, E. Kotryahova, M. Zenko, E. Rybnikova// Neurosci Lett. – 2017. – T. 639 - 49-52 p.

137. Wang L. Mixed-lineage kinases: a target for the prevention of neurodegeneration/ L. Wang C. Besirli, E. Johnson// Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2004. – T. 44 - 451-474 p.

138. Wang H. The role of phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway in propofol-indused postconditioning against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats/ H. Wang, G. Wang// Brain Res. – 2009. – T. 1297 - 177-184 p.

139. Xing B. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat/ B. Xing, H. Chen, M. Zhang// Stroke. - 2008a. – T. 39 - 2362–2369 p.

140. Xing B. Ischemic post-conditioning protects brain and reduces inflammation in a rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion/ B. Xing, H. Chen, M. Zhang, D. Zhao, R. Jiang, X. Liu, S. Zhang// Journal of Neurochemistry. - 2008b. – T. 105 - 1737–1745 p.

141. Ying S. Brain-derived neurotrophic factor induces long- term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis/ S. Ying, M. Futter, K. Rosenblum// J. Neurosci. – 2002. – T.22 - № 5 - 1532-40 p.

142. Yuan Y. Ischemic postconditioning protects brain from ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through PI3K-Akt pathway / Y. Yuan, Q. Guo, Z. Ye, X. Pingping, N. Wang, Z. Song// Research Report. Brain Research. – 2011. - T. 1367 – 85-93 p.

143. Zhan L. Activation of Akt/FoxO and inactivation of MEK/ERK pathways contribute to induction of neuroprotection against transient global cerebral ischemia by delayed hypoxic postconditioning in adult rats/ L. Zhan, D. Li, D. Liang, B. Wu, P. Zhu, Y. Wang, W. Sun, E.Xu// Neuropharmacology. – 2012. – T. 63 - 873e88.

144. Zhang W. Involvement of Glutamate Transporter-1 in Neuroprotection against Global Brain Ischemia-Reperfusion Injury Induced by Postconditioning in Rats/ W. Zhang, Y. Miao, S. Zhou, B. Wang, Q. Luo and Y. Qiu// Int. J. Mol. Sci. – 2010. – T. 11 - 4407-4416 p.

145. Zhang W. Neuroprotective effects of ischemic postconditioning on global brain ischemia in rats through upregulation of hippocampal glutamine synthetase/ W. Zhang, Y. Miao, S. Zhou, J. Jiang, Q. Luo, Y. Qiu// Journal of Clinical Neuroscience. – 2011. – T. 18 - 685–689 p.

146. Zhao H. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats/ H. Zhao, R. SapolskY, G. Steinberg// J Cereb Blood Flow Metab. – 2006. – T. 26 - 1114–1121 p.

147. Zhao H. Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke/ H. Zhao// Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2009. – T. 29 - 873–885 p.

148. Zhao H. Attenuation of myocardial injury by postconditioning: role of hypoxia inducible factor-1a/ H. Zhao, X. Wang, Y. Wang// Basic Res Cardiol. – 2010. – T. 105 - 109–118 p.

149. Zhao H. From Rapid to Delayed and Remote Postconditioning: the Evolving Concept of Ischemic Postconditioning in Brain Ischemia/ H. Zhao, C. Ren, X. Chen and J. Shen// Curr Drug Targets. – 2012. – T. 13 - № 2 - 173–187 p.

150. Zhao Z-Q. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning/ Z-Q. Zhao, J. Corvera, M. Halkos// Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2003. – T. 285 - 579–588 p.

151. Zhao Z-Q. Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury/ Z-Q. Zhao, J. Vinten-Johansen// Cardiovasc Res. – 2006. – T. 70 - 200–211 p.

152. Zhou C. Delayed ischemic postconditioning protects hippocampal CA1 neurons by preserving mitochondrial integrity via Akt/GSK3beta signaling/ C. Zhou, J. Tu, Q. Zhang// Neurochem Int. – 2011. – T. 59 - 749–758 p.

153. Zhu P. The Roles of p38 MAPK/MSK1 Signaling Pathway in the Neuroprotection of Hypoxic Postconditioning Against Transient Global Cerebral Ischemia in Adult Rats/ P. Zhu, L. Zhan, T. Zhu, D. Liang, J. Hu, W. Sun, Q. Hou, H. Zhou, B. Wu, Y. Wang, E. Xu// Mol Neurobiol. – 2013.

154. Zhu T. Hypoxia-Inducible Factor 1a Mediates Neuroprotection of Hypoxic Postconditioning Against Global Cerebral Ischemia/ T. Zhu, L. Zhan, D. Liang, J. Hu, Z. Lu, X. Zhu, W. Sun, L. Liu, E. Xu// J Neuropathol Exp Neurol. – 2014. – T. 73 - № 10 - 975-986 p.