

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. И.П. ПАВЛОВА

На правах рукописи

Ч У Р И Л О В А
АННА ВИКТОРОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ
ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА ЭКСПРЕССИЮ
ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ И
ПРО-АДАПТИВНЫХ БЕЛКОВ В МОЗГЕ КРЫС**

Специальность 03.03.01 – физиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2014

Работа выполнена в лаборатории регуляции функций нейронов мозга
ФГБУН Института физиологии имени И.П.Павлова РАН

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Самойлов Михаил Олегович

Официальные оппоненты: **Баранова Татьяна Ивановна**
доктор биологических наук, доцент, старший научный
сотрудник лаборатории системных адаптаций Кафедры
общей физиологии Санкт-Петербургского
Государственного Университета
Журавин Игорь Александрович
Доктор биологических наук, заведующий лабораторией
сравнительной физиологии и патологии центральной
нервной системы ФГБУН «Институт эволюционной
физиологии и биохимии имени И.М.Сеченова РАН»

Ведущая организация: ФГБУ НИИ нормальной физиологии имени
П.К.Анохина РАМН, Москва

Защита диссертации состоится «__» _____2015 года в _____ часов на заседании Диссертационного
совета по защите докторских и кандидатских диссертаций (Д 002.020.01) при ФГБУН
Институте физиологии им. И.П.Павлова РАН (199034, Санкт-Петербург, наб.Макарова, д.6).

С диссертаций можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им.И.П.Павлова РАН.

Автореферат разослан «__» _____2014 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
Доктор биологических наук

Н.Э.Ордян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ Нейроны переднего отдела головного мозга являются наиболее чувствительными клетками организма к различным повреждающим воздействиям, в частности гипоксии/ишемии. Тяжелые формы гипоксии вызывают целый ряд морфо-функциональных повреждений, обратимых и необратимых, что зависит от интенсивности и длительности воздействия. Тяжелая ишемия приводит к смерти нейронов по типу некроза или апоптоза (Fujimura et al., 2000). Гипоксия является важным компонентом патогенеза многих заболеваний, в том числе ишемической болезни сердца и инсульта головного мозга. Поэтому способы предотвращения или снижения влияния патогенного гипоксического фактора представляет собой актуальную задачу нейробиологии и медицины.

Одним из направлений решения данной проблемы является разработка новых фармакологических препаратов целенаправленного действия. Однако недостатком такого подхода является то, что действие какого-либо препарата направлено, как правило, на одно из звеньев гипоксического каскада, тогда как при гипоксии происходит генерализованный клеточный ответ. К тому же часть препаратов вызывает негативное побочное действие, аллергические реакции или со временем может вызывать привыкание организма и становится менее эффективными. Другим перспективным способом является повышение устойчивости нейронов мозга к действию неблагоприятных факторов за счет активации эволюционно сложенных генетически детерминированных эндогенных механизмов резистентности нейронов (Самойлов, 1999; Самойлов, Рыбникова, 2012). Способ основан на использовании более мягких (по сравнению с повреждающими) физиологических воздействий, которые значительно повышают адаптационные возможности нервной системы и организма в целом. Применение таких мягких подпороговых воздействий вызывает быстрое и существенное повышение неспецифической резистентности организма за счет мобилизации активности его защитных механизмов (Гаркави, 1990; Гаркави, Квакина, 1995; Меерсон, 1993). Именно на этой реакции организма основан феномен прекондicionирования (ПК). Первые работы по использованию гипоксического/ишемического ПК мозга появились в начале 90х годов прошлого столетия (Kitagawa et al., 1990; Kirino 1991; Самойлов и др., 1994). ПК представляет собой процедуру, в ходе которой на ткань *in vitro* или орган или организм в целом *in vivo* воздействуют достаточно сильным подпороговым стимулом, не вызывающим структурно-функциональных повреждений. Вслед за ПК-воздействием в клетках формируются механизмы толерантности к аналогичному стимулу или стимулу другой природы надпороговой интенсивности.

Существует много способов ПК, в том числе с использованием фармакологических/химических препаратов, гипер- или гипотермии, ишемии, гипоксии (нормобарической, гипербарической, гипобарической). Многие из вышперечисленных

способов ПК трудно применимы в практике из-за инвазивности метода (как, например, ишемическое ПК) или из-за возможности вызывать аллергические реакции или побочные эффекты (химические препараты). В то же время ПК с помощью умеренной гипобарической гипоксии (УГГ) является одним из наиболее перспективных способов, поскольку является легко дозируемым, неинвазивным и более физиологически близким для организма, так как гипобарическая гипоксия – естественное воздействие, встречающееся в природе при подъеме в горы на определенную высоту (Самойлов, Рыбникова, 2012). Вместе с тем, молекулярно-клеточные нейропротективные механизмы, индуцируемые ПК с помощью УГГ до сих пор недостаточно изучены. Известно, что в развитие протективных эффектов гипоксического ПК вовлекаются быстро индуцируемые, связанные с деятельностью внутриклеточных регуляторных систем, и отсроченные геном-зависимые процессы, обусловленные экспрессией про-адаптивных белков (Самойлов и др., 1999, 2001a; Самойлов, Рыбникова, 2012; Kirino, 2002; Obrenovitch, 2008; Steiger, Hangii, 2007; Shpargel et al., 2008). Трансформация ранних процессов (фаза индукции) в поздние (фаза экспрессии толерантности) осуществляется, по всей видимости, за счет активации транскрипционных факторов (ТФ) – ключевых регуляторов экспрессии генов. Ряд активационных и лиганд-зависимых ТФ, в том числе pCREB и NF-kappaB, глюко- (ГР) и минералокортикоидные рецепторы (МР), играют важную роль в различных внутриклеточных процессах, при обучении и формировании памяти, пролиферации и росте нейронов, в регуляции гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС). Одной из основных функций данных ТФ является их участие в процессах гибели и выживания нейронов при действии экстремальных воздействий. Известно, что эти ТФ регулируют экспрессию ряда про-адаптивных белков, к которым относятся белки, участвующие в пролиферации и росте нейронов, нейротрофины, антиоксиданты, анти-апоптотические факторы. В частности, нейротрофический фактор BDNF и антиапоптотический фактор Bcl-2 необходимы для нейропротекции при действии экстремальных факторов и их гены являются мишенями указанных ТФ. Таким образом, данные ТФ и белки их генов-мишеней вовлекаются в механизмы приспособления к неблагоприятным факторам. В частности, было показано их участие в формировании толерантности нейронов мозга к ишемии (Mabuchi et al., 2001; Blondeau et al., 2001; Krugers et al., 2000; Sugiura et al., 2004; Wu et al., 2003; Kokaia et al., 1995). Роль этих ТФ, а также белков BDNF и Bcl-2 в нейропротективных механизмах, индуцируемых гипоксическим ПК, недостаточно изучена, что явилось центральной задачей настоящего исследования.

Ранее в модели ишемии было показано, что два сеанса кратковременного прекодиционирующего ишемического воздействия были более эффективны, чем один, для коррекции последствий долговременной тяжелой ишемии (Kitagawa et al., 1990).

Представляется целесообразным исследовать влияние разных режимов гипоксического ПК, отличающихся, в частности, количеством сеансов предъявления УГГ, и сравнить их по эффективности оказываемого нейропротективного эффекта при действии повреждающей тяжелой гипоксии (ТГ). Очевидно, это должно отражаться и в различном паттерне экспрессии как самих ТФ, так и продуктов их генов-мишеней – нейропротективных белков. Анализ полученных результатов, с одной стороны, может дополнить теоретические представления о нейропротективных молекулярных механизмах, индуцируемых ПК, и вместе с тем будет способствовать выявлению наиболее эффективного режима ПК, что необходимо для дальнейшей разработки определенного способа ПК в клинической практике.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ Целью настоящей работы явилось исследование влияния различных режимов гипобарической гипоксии (повреждающей и протективной) на экспрессию активационных и лиганд-зависимых ТФ, вовлекаемых в процессы гибели/выживания нейронов, а также продуктов их генов мишеней – про-адаптивных белков, в неокортексе и гиппокампе крыс. Основные задачи исследования:

1. Изучить влияние тяжелой повреждающей гипоксии (ТГ) на морфологические характеристики нейронов неокортекса и гиппокапа крыс, а также оценить эффективность одного и трех сеансов ПК с помощью УГГ на коррекцию эффектов, индуцированных ТГ.

2. Исследовать влияние ТГ на паттерн экспрессии активационных (pCREB, NF-каппаВ p65, c-Rel) и лиганд-зависимых (ГР и МР) ТФ в неокортексе и гиппокампе непрекондиционированных крыс. Выявить особенности экспрессии данных ТФ в ответ на однократное или трехкратное ПК вслед за ТГ в неокортексе и гиппокампе крыс.

3. Охарактеризовать паттерн экспрессии продуктов генов мишеней исследуемых ТФ - про-адаптивных белков нейротрофина BDNF и антиапоптотического фактора Bcl-2 при действии непрекондиционированной ТГ, а также при предварительном однократном или трехкратном ПК с помощью УГГ в неокортексе и гиппокампе крыс.

4. Провести сравнительный анализ изменения экспрессии активационных и лиганд-зависимых ТФ, а также про-адаптивных белков BDNF и Bcl-2 при действии одного или трех сеансов умеренной гипобарической гипоксии, используемых в качестве ПК-воздействия, в неокортексе и гиппокампе крыс.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. Подавление или недостаточная экспрессия активационных транскрипционных факторов (ТФ) (pCREB, NF-каппаВ p65, c-Rel) и нарушение баланса в уровне экспрессии между лиганд-зависимыми ТФ (глюко- и минералокортикоидными рецепторами), а также обусловленное этим подавление экспрессии продуктов их генов мишеней - про-адаптивных

белков BDNF и Vcl-2, является одной из причин повреждения нейронов неокортекса и гиппокампа, вплоть до их гибели, при действии тяжелой гипоксии (ТГ).

2. Выраженная индукция экспрессии активационных и лиганд-зависимых ТФ, вовлеченных в механизмы выживания нейронов, а также про-адаптивных белков BDNF и Vcl-2 в неокортексе и гиппокампе крыс является одним из ключевых нейропротективных механизмов, активируемых трехкратным, но не однократным, прекодиционирующим воздействием при действии ТГ.

3. Трехкратное, но не однократное применение умеренной гипобарической гипоксии существенно модифицирует уровень экспрессии активационных и лиганд-зависимых ТФ, а также продуктов их генов-мишеней – про-адаптивных белков, что способствует формированию гипоксической толерантности нейронов неокортекса и гиппокампа и предотвращению повреждающего эффекта ТГ.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ В работе впервые охарактеризованы особенности повреждающего действия тяжелой гипобарической гипоксии, проявляющиеся в морфологических изменениях нейронов, а также в изменении содержания различных внутриклеточных факторов, регулирующих процессы гибели/выживания нейронов. Показано, что ТГ приводит к глубоким структурным повреждениям нейронов неокортекса и гиппокампа и вызывает в ранний период (3-24 ч) после воздействия подавление экспрессии активационных ТФ, про-адаптивных белков, таких как нейротрофический фактор BDNF и антиапоптотический фактор Vcl-2, а также нарушение баланса содержания ТФ ГР и МР.

Впервые проведен сравнительный анализ двух различных режимов ПК, однократного и трехкратного, по их эффективности коррекции нарушений ТГ. Было показано, что трехкратное ПК предотвращает структурные повреждения нейронов, индуцированные ТГ, тогда как однократное ПК не оказывает такого эффекта. Вместе с тем, выявлены специфические особенности экспрессии активационных и лиганд-зависимых ТФ, а также про-адаптивных белков в ответ на однократное или трехкратное ПК после ТГ. Было обнаружено, что ТГ у однократно ПК-крыс часто имеет схожее действие, что и у неПК-крыс, или не оказывает эффекта на уровень экспрессии исследуемых молекулярных факторов, тогда как у трехкратно ПК-животных ТГ преимущественно увеличивает их содержание.

Впервые установлено, что трехкратное, но не однократное, ПК также предотвращает нарушения регуляции ГГАС, вызванные ТГ и связанные с особенностями экспрессии ГР и МР. В частности, ТГ приводит к нарушению баланса их содержания в зубчатой извилине гиппокампа. Однократное ПК не предотвращает подавление экспрессии МР после ТГ. А трехкратное ПК нивелирует снижение уровня МР на фоне увеличения содержания ГР в

зубчатой извилине гиппокампа после ТГ, что важно для активации отрицательной обратной связи ГГАС.

Впервые установлено, что предъявление трех сеансов (но не одного) УГГ, используемой в качестве ПК-воздействия, индуцирует выраженную кооперативную активацию исследуемых ТФ и про-адаптивных белков, что имеет важное значение для формирования механизмов толерантности нейронов неокортекса и гиппокампа к повреждающим воздействиям.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ Работа посвящена исследованию актуальной проблемы нейробиологии – механизмам повышения адаптивных возможностей мозга. Полученные в настоящей работе результаты вносят вклад в понимание общих неспецифических механизмов адаптации и повышения резистентности нейронов к действию неблагоприятных факторов, в том числе тяжелых форм гипоксии. В работе проведен анализ вовлечения как ТФ, так и продуктов их генов-мишеней, в механизмы повреждающей и адаптогенной гипоксии, что позволяет составить более точное и полное представление о внутриклеточных процессах, происходящих при гипоксических воздействиях различной модальности. Выявленные особенности экспрессии молекулярных факторов в ответ на действие различных режимов гипобарической гипоксии, могут способствовать раскрытию и пониманию нейропротективных механизмов, лежащих в основе гипоксического ПК, создаваемого УГГ.

Практическая значимость работы определяется поиском новых немедикаментозных и эффективных способов повышения резервных возможностей организма. ПК с использованием УГГ является неинвазивным легко дозируемым воздействием, удобным в практическом применении. Такой способ ПК обладает анксиолитическим и антидепрессивным действием, его можно применять с профилактической целью при заболеваниях, имеющих в основе гипоксическое состояние: инсульты, инфаркты. Поэтому для дальнейшего применения ПК с помощью гипобарической гипоксии в клинической практике необходимо подобрать максимально эффективный режим, который при этом не имел повреждающего действия. Именно с этой целью в работе был проведен сравнительный анализ однократного и трехкратного ПК. Выявлено, что для развития полноценного нейропротективного эффекта необходимо предъявление нескольких (трех) сеансов ПК, тогда как одного сеанса недостаточно для индукции гипоксической толерантности и предотвращения повреждений нейронов в чувствительных образованиях мозга (неокортексе и гиппокампе) при действии ТГ. Данный режим ПК может быть рекомендован для применения в клинической практике.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА. Основная часть представленных в диссертации результатов получена и обработана автором самостоятельно. Разработка режимов предъявления гипобарической гипоксии крысам и планирование сроков забора материала, а также

статистическая обработка данных проводилась совместно с соавторами научных работ, опубликованных соискателем.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ Результаты работы были представлены и обсуждены на Российско-Польском рабочем симпозиуме «Гипоксическое, ишемическое preconditionирование мозга» (Санкт-Петербург, 2008); конференции молодых ученых, посвященной 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П.Павлова РАН «Механизмы адаптации физиологических систем организма к факторам среды» (Санкт-Петербург, 2010); Всероссийской молодежной конференции-школы «Нейробиология интегративных функций мозга», посвященной 120-летию создания физиологического отдела имени И.П.Павлова НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН (Санкт-Петербург, 2011); III конференции молодых ученых института Цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2012); 2 международной конференции «Высокогорная гипоксия и геном» (Терскол, 2012); II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012 г); Всероссийской молодежной конференции «Нейробиология интегративных функций мозга» (Санкт-Петербург, 2013); Всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург, 2014); заседаниях Отдела физиологии и патологии высшей нервной деятельности Института физиологии им. И.П.Павлова РАН (2010-2014гг).

СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ Диссертация состоит из глав введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов. Работа изложена на 155 страницах, иллюстрирована 58 рисунками и 2 таблицами. Список цитируемой литературы включает 427 источников. Основное содержание диссертации отражено в 18 публикациях (из них 9 научных статей в рецензируемых российских и зарубежных журналах и 9 тезисов).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на взрослых самцах крыс линии Вистар весом 200-250 г, содержащихся в стандартных условиях (температура окружающей среды 18-25⁰С, чередование суточной освещенности, свободный доступ к воде и пище). При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П.Павлова РАН. В эксперименте использовали модель гипобарической гипоксии,

создаваемую в барокамере проточного типа. Животным предъявляли два основных режима гипоксии: тяжелую повреждающую и умеренную адаптогенную. Первая группа крыс подвергалась воздействию тяжелой гипоксии (ТГ) при ступенчатом снижении давления до 180 мм рт. ст. продолжительностью 3 ч (количество животных n=18). При этом погибало в среднем 50% животных. Второй группе предъявляли один или три сеанса адаптогенной умеренной гипоксии (УГГ) при понижении давления до 360 мм рт. ст. продолжительностью 2 ч с интервалом между сеансами 2 ч (n=12). Гибель животных не наблюдалась. Третья группа подвергалась ТГ через 24 ч после одного сеанса прекондиционирующей УГГ (n=18). Гибель животных составляла в среднем 50%. Четвертая группа животных испытывала ТГ через 24 ч после последнего сеанса трехкратно прекондиционирующей УГГ (n=18). Гибель животных сокращалась до 15%. Контрольную группу крыс помещали в барокамеру на 3 ч без изменения атмосферного давления (n=12).

Животных декапитировали через 3, 24 ч и 3, 7 суток после не- и прекондиционированной ТГ, а также через 24 ч после последнего сеанса УГГ. Далее при температуре +4⁰С быстро извлекали мозг, выделяли области гиппокампа с прилежащим фронто-париетальным неокортексом и помещали их в фиксирующий раствор. Образцы ткани мозга далее обрабатывали согласно стандартному гистологическому протоколу и заливали в парафиновые блоки. При помощи микротомы изготавливали серии чередующихся срезов мозга во фронтальной плоскости толщиной 7 мкм на уровне -2.80 мм от брегмы (Paxinos, Watson, 1986). Полученные срезы монтировали на предметные стекла. Перед дальнейшим использованием стекла депарафинизировали.

В работе использовали гистологический метод окраски по Нислю и иммуноцитохимический метод. Для окраски по методу Ниссля препараты после удаления парафина окрашивали в водном 0.1%-м растворе толуидинового синего (несколько минут). С использованием данного метода проводилась оценка морфологических характеристик нейронов фронто-париетального неокортекса, а также дорзального (поле CA1) и вентрального (поле CA3/CA4) гиппокампа. Для проведения иммуноцитохимического анализа, с целью демаскировки антигена срезы помещали в цитратный буфер под давлением на 1 мин. Далее блокировали неспецифическое связывание с помощью нормальной сыворотки (1% BSA). Срезы в течение ночи инкубировали с первичными поликлональными антителами (в разведении 1:100) к pCREB, NF-κappaB(p65), NF-κappaB (c-Rel), MP, BDNF, Bcl-2 (Santa Cruz Bio), ГР (Calbiochem) при +4⁰С во влажной камере. Затем их обрабатывали вторичными биотинилированными антителами (Vector Lab., разведение 1:200) и авидин-биотиновым комплексом (ABC, Vector Lab.) по 30 мин при комнатной температуре. Для визуализации

реакции использовали диаминобензидиновый кит (DAB, Vector Lab.). После этого стекла высушивали, заключали под покрывное стекло в глицерин-желатиновый гель.

Анализ препаратов проводили с помощью морфометрической установки, состоящей из светового микроскопа Olympus CX31 (Olympus), цифровой камеры Progres CT1 (Jenoptic) и компьютера IBM PC с программным обеспечением ВидеоТест Мастер Морфология 5.2 (разработка ООО "Видео Тест", Санкт-Петербург). Используя программу ВидеоТест Мастер Морфология 5.2 производили подсчет числа иммунопозитивных клеток. Степень иммунореактивности клеток оценивали на основании показателей их оптической плотности. Иммунопозитивными автоматически считались клетки, оптическая плотность которых превышала показатель фона на заданное число условных единиц. Исходя из показателей оптической плотности, все иммунопозитивные клетки автоматически разделялись на 2 класса: интенсивно- иммунопозитивные и слабо- иммунопозитивные. Анализировали общее число иммунопозитивных клеток, и число иммунопозитивных клеток каждого класса. Результаты статистически обрабатывали с помощью пакетов анализа данных STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., USA) и Microsoft Excel'2007. Все результаты представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего. Все результаты и стандартная ошибка среднего выражены в процентах от среднего значения соответствующей контрольной группы, которое в каждом случае принято за 100%. Различия между выборками (опыт и контроль) считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические исследования. Результаты морфологических исследований выявили, что через 3 суток после ТГ у неПК- и однократно ПК-животных в дорзальном (области CA1/CA2) и вентральном (области CA3/CA4) гиппокампе, а также фронтально-париетальном неокортексе обнаруживались выраженные структурные повреждения нейронов. В этих областях мозга выявлялось значительное число гиперхромных и пикнотических клеток; нередко наблюдался перичеселлюлярный отек. В отдельных нейронах проявлялся хроматолиз, вакуолизация цитоплазмы. К 7 суткам после ТГ у неПК- и однократно ПК-крыс снижалось количество нейронов на 40% относительно контроля в полях CA1 и CA4 гиппокампа, клетки располагались более разреженно. В неокортексе выявлялось большое число гиперхромных нейронов. В отличие от этого, предьявляемые трехкратные ПК-воздействия в значительной мере предотвращали индуцируемые ТГ через 3-7 суток структурные повреждения нейронов гиппокампа и неокортекса. Таким образом, трехкратное ПК оказывается более эффективным по сравнению с однократным ПК с точки зрения коррекции структурных повреждений, индуцируемых ТГ. Подобный эффект обнаружен также ранее в модели ишемического

воздействия: предъявление нескольких сеансов ишемического ПК через сутки оказывает значительно более выраженное протективное действие, чем один сеанс ПК (Kitagawa et al., 1990).

Иммуноцитохимические исследования.

Влияние различных режимов гипобарической гипоксии на уровень экспрессии активационных ТФ рCREB и NF-κарраВ. ТГ у неПК-животных подавляла иммунореактивность к рCREB в неокортексе и не изменяла ее в отделах гиппокампа через 3-24 ч после воздействия (рис. 1 А). Однократное ПК не изменяло уровня экспрессии рCREB относительно контроля ни в неокортексе ни в гиппокампе крыс, а у трехкратно ПК-животных наблюдалось усиление экспрессии рCREB через 3-24 ч после ТГ в данных областях мозга (рис. 1 А). Вместе с тем, ТГ у неПК-животных не изменяла уровня экспрессии субъединицы NF-κарраВ (p65) на раннем сроке (3 ч), но приводила к ее увеличению в отдаленный период (3 суток) после воздействия в неокортексе и гиппокампе крыс (рис. 1 Б, В). В V слое неокортекса однократное ПК не оказывало влияния на уровень экспрессии p65 на всех сроках после ТГ, а в гиппокампе ТГ у однократно ПК-животных имела схожий эффект, что и у неПК-животных (рис. 1 Б, В). В отличие от этого, трехкратное ПК приводило к ранней индукции интенсивности экспрессии p65 и ее снижению к 3 суткам после ТГ как в неокортексе, так и гиппокампе крыс.

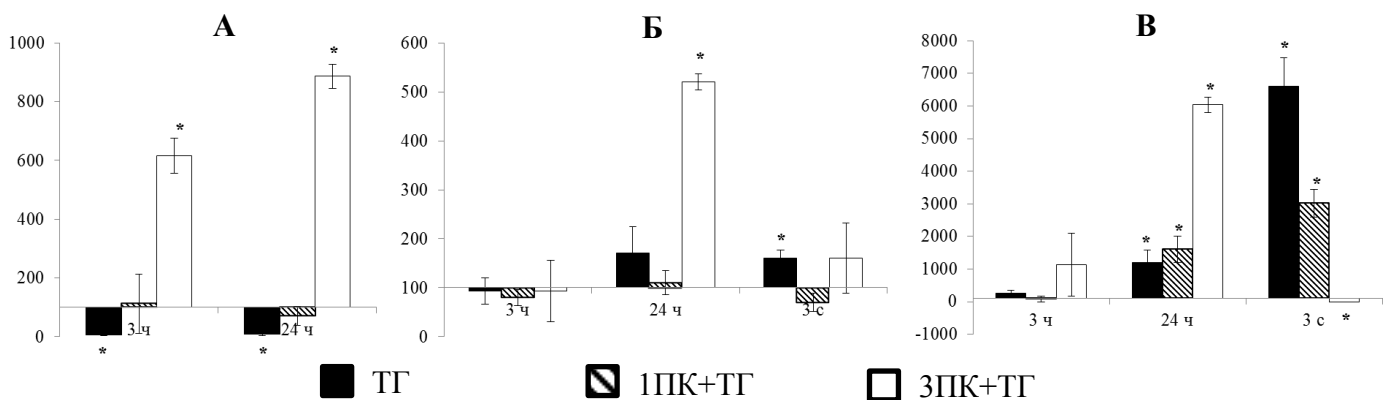


Рис. 1. Изменения количества интенсивно-иммунопозитивных к рCREB и NF-κарраВ(p65) клеток в неокортексе и гиппокампе крыс через 3 ч-3 суток после ТГ у неПК- и однократно или трехкратно ПК-крыс (в % от контроля). А – рCREB, V слой неокортекса; Б - NF-κарраВ(p65), V слой неокортекса; В - NF-κарраВ(p65), поле СА3 гиппокампа. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

Согласно современным представлениям, ТФ рCREB и NF-κарраВ отводится важная роль в индукции нейропротективных механизмов при действии повреждающих воздействий (Lee et al., 2009; Walton, Dragunow, 2000; Mattson, Meffert, 2006; Sarnico et al., 2009). В частности, ингибирование их активности приводит к увеличению числа гибнущих нейронов при действии повреждающего воздействия (Hara et al., 2003; Mattson et al., 1997). Очевидно, снижение экспрессии исследуемых ТФ в ответ на ТГ у неПК-животных в ранний период после

воздействия (3-24 ч), может способствовать развитию повреждений нейронов исследуемых образований мозга (неокортекса и гиппокампа), которые выявляются на 3-7 сутки после ТГ при морфологической окраске нейронов. Эти результаты также согласуются с данными, полученными в модели ишемического воздействия: тяжелая ишемия также приводит к подавлению экспрессии ТФ рCREB и NF- κ B в нейронах чувствительных образований мозга (Botchkina et al., 1999; Hara et al., 2003; Walton et al., 1996). Наряду с этим, наблюдаемое отсроченное увеличение экспрессии субъединицы p65 после ТГ у неПК-животных может быть связано как с отсроченными компенсаторными реакциями, так и с развитием патологических процессов. Подобный эффект описан для ряда других ТФ в том числе c-Fos, HIF-1, и др. (Баранова и др., 2009). Однократное ПК либо не оказывает влияния на уровень экспрессии активационных ТФ либо имеет схожий эффект с ТГ у неПК-животных. Напротив, у трехкратно ПК-животных отмечается ранняя индукция экспрессии данных ТФ после ТГ, что, очевидно, является одним из нейропротективных механизмов, индуцируемых трехкратным, а не однократным, ПК-воздействием вслед за ТГ. Эти результаты согласуются с данными, полученными при других способах ПК (Song et al., 2007; Goodman, Mattson, 1996). У трехкратно ПК-крыс также наблюдается нормализация уровней субъединицы p65 в отдаленный период после ТГ в гиппокампе, в отличие от неПК- и однократно ПК-крыс.

Известно, что механизмы формирования толерантности нейронов к гипоксии/ишемии связаны с индукцией экспрессии ряда про-адаптивных белков (Davis, Patel, 2003; Chiueh et al., 2005). рCREB и NF- κ B, как ТФ, активируют семейства генов про-адаптивных белков, к которым относятся *c-fos*, *zif-268*, гены пептидных антиоксидантов тиоредоксина 1 и Mn-SOD, антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-xL, нейротрофического фактора BDNF, белков ATF3 (activating transcription factor 3) и IAPs (inhibitors of apoptosis) (Sugiura et al., 2004; Zhang et al., 2011; Mattson, Meffert., 2006; Grilli, Memo, 1998). Ранее в нашей лаборатории было показано, что у трехкратно ПК-животных в ответ на ТГ происходит увеличение содержания белков c-Fos, NGFI-A, Bcl-2, Bcl-xL, тиоредоксинов, Mn-SOD в неокортексе и гиппокампе крыс (Строев, Самойлов, 2006; Rybnikova et al., 2002, 2005, 2006; Stroeve et al., 2004a,b, 2005). Таким образом, гиперэкспрессия продуктов про-адаптивных генов в ответ на ТГ в неокортексе и гиппокампе мозга трехкратно ПК-крыс, очевидно, в значительной мере обусловлены активацией CREB и NF- κ B. Вышеизложенное дает основания полагать, что индукция экспрессии ТФ рCREB и NF- κ B, наблюдаемая у трехкратно ПК-животных, может быть одним из важных механизмов, ответственных за формирование толерантности нейронов мозга к тяжелой гипоксии/ишемии и другим повреждающим воздействиям.

Влияние ТГ на уровень экспрессии лиганд-зависимых ТФ глюкоко- и минералокортикоидных рецепторов в нейронах неокортекса и гиппокампа неПК-, однократно или трехкратно ПК-крыс. У неПК крыс наблюдалось умеренное (на 300% от контроля) увеличение уровня экспрессии ГР на всех сроках после ТГ в V слое неокортекса (рис. 2 Аа). Однократное ПК характеризовалось постепенным возрастанием уровня экспрессии ГР к 3 суткам после ТГ (до 800% от контроля). В ответ на трехкратное ПК происходило существенное усиление иммунореактивности к ГР (до 1400% от контроля) на раннем сроке (24 ч) после ТГ в данной области мозга (рис. 2 Аа). В отделах вентральной (зубчатая извилина) и дорзального (поле СА1) гиппокампа паттерн экспрессии ГР был различным. ТГ у неПК-животных приводила к усилению экспрессии ГР через 24 ч после воздействия в поле СА1 гиппокампа, а в зубчатой извилине – напротив, вызывала снижение ее уровня (рис. 2 Аб, Ав). У однократно ПК-животных наблюдалось умеренное увеличение уровня экспрессии ГР на всех сроках после ТГ в этих областях гиппокампа. В случае трехкратного ПК в поле СА1 гиппокампа не происходило увеличения экспрессии ГР, в отличие от неПК- и однократно ПК-крыс после ТГ (рис. 2 Аб). В зубчатой извилине, напротив, отмечалось умеренное увеличение иммунореактивности к ГР в ранний период (3-24 ч), которое исчезало к 3 суткам после ТГ (рис. 2 Ав).

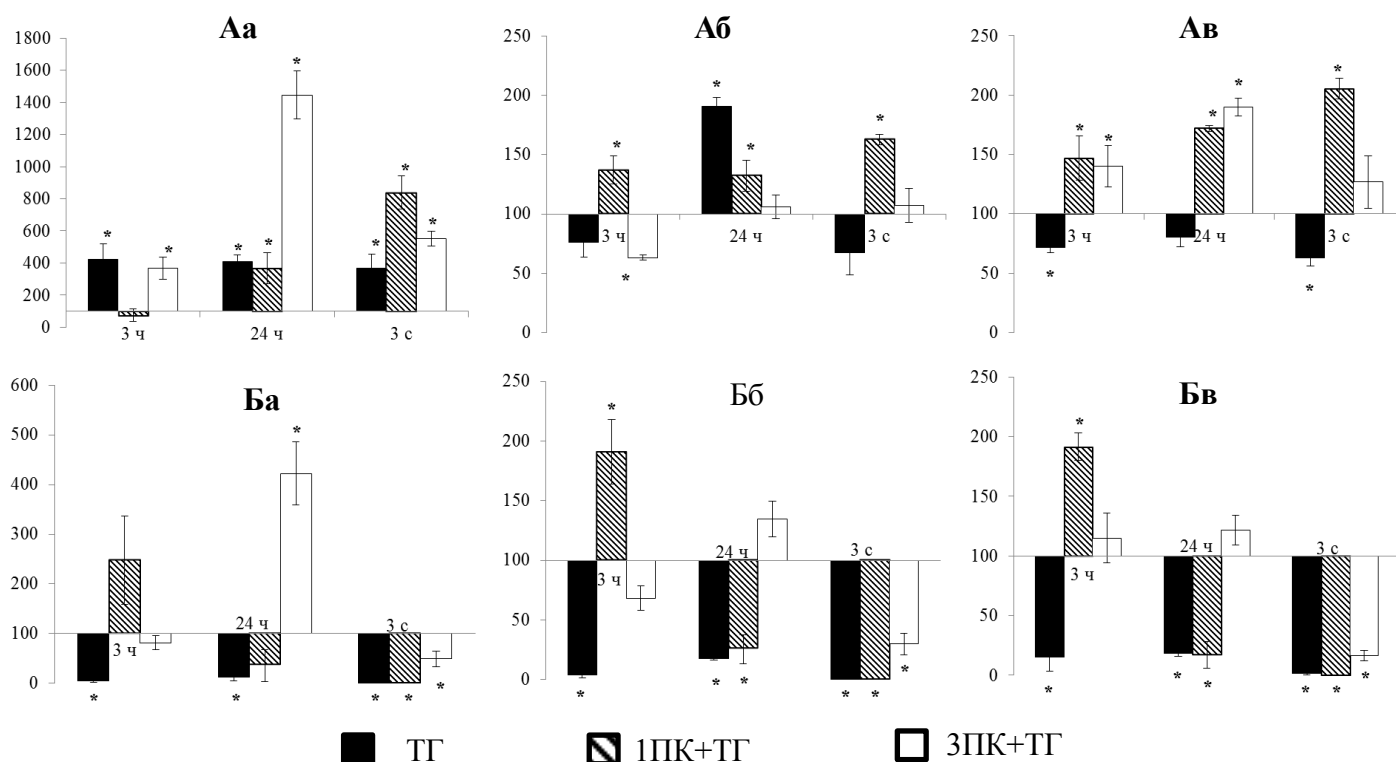


Рис. 2. Изменения количества интенсивно-иммунопозитивных к ГР (А) и МР (Б) клеток в неокортексе и гиппокампе крыс через 3 ч-3 суток после ТГ у неПК- и однократно или трехкратно ПК-крыс (в % от контроля). а – V слой неокортекса; б, в – поле СА1 и зубчатая извилина гиппокампа, соответственно. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

ТГ у неПК-крыс приводила к подавлению экспрессии МР в неокортексе и отделах вентрального и дорзального гиппокампа (рис. 2 Б). У однократно ПК-крыс уровень экспрессии МР умеренно (на 100% от контроля) увеличивался через 3 ч после ТГ, но к 24 ч – 3 суткам также значительно (на 90-100% от контроля) снижался в исследуемых областях. В отличие от этого, у трехкратно ПК-животных не происходило снижения уровня экспрессии МР на ранних сроках после ТГ, а в неокортексе иммунореактивность к МР даже существенно увеличивалась.

Кортикостероидные рецепторы (ГР и МР) играют ключевую роль в регуляции ГГАС, которая является основной системой адаптации организма и принимает участие в ответах на различные виды стрессов, а также в процессах обучения, памяти и поведении (De Kloet et al., 2005; Rogalska, 2010; Rybnikova et al., 2007a). Их согласованная активность направлена на нормальное функционирование ГГАС (De Kloet et al., 2008; Pryce, 2008). МР гиппокампа индуцируют тоническое ингибирование активности ГГАС, а ГР в зубчатой извилине и неокортексе вовлечены в механизмы глюкокортикоидной отрицательной обратной связи (Pryce, 2008; Rogalska, 2010; Furay et al., 2008). В настоящей работе установлено, что ТГ снижает содержание ГР и МР в зубчатой извилине. Очевидно, выявленные нарушения их экспрессии способствуют дисрегуляции активности ГГАС в ответ на ТГ. Напротив, у трехкратно ПК-животных уровень экспрессии ГР в зубчатой извилине и неокортексе повышается после ТГ, что, вероятно, обуславливает активацию глюкокортикоидной отрицательной обратной связи. Вместе с тем, у трехкратно ПК-животных, в отличие от неПК-животных, не наблюдается подавления экспрессии МР в зубчатой извилине гиппокампа после ТГ, тогда как у однократно ПК-животных отмечается снижение интенсивности экспрессии МР через 24 ч после ТГ.

Установлено, что изменение соотношения внутриклеточного содержания ГР и МР во многом влияет на регуляцию процессов гибели/выживания нейронов при действии различных повреждающих воздействий (Almeida et al., 2000; Crochemore et al., 2005; Rogalska, 2010). В частности, оверэкспрессия ГР приводит к гибели нейронов в гиппокампе (Sapolsky, Pulsinelli, 1985). МР опосредуют нейропротективный эффект, индуцируя увеличение экспрессии анти-апоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL, нейротрофических факторов и уменьшение экспрессии про-апоптотического белка p53 (Hansson et al., 2000; McCullers, Herman, 1998). Можно предположить, что обнаруженный в нашей работе сдвиг соотношения экспрессии ГР и МР (увеличение ГР и подавление МР) в чувствительных к гипоксии образованиях – неокортексе и гиппокампе, является одним из механизмов повреждающего действия ТГ. Однократное ПК, предотвращающее структурные повреждения нейронов неокортекса и гиппокампа, индуцируемые ТГ, приводит к увеличению уровня ГР на фоне подавления экспрессии МР в этих областях через 24 ч после ТГ. Выявлено, что активация экспрессии МР оказывает нейропротективное действие в условиях чрезмерно повышенного уровня ГР (Almeida et al.,

2000; Hassan et al., 1996). Показано, что сдвиг соотношения ГР и МР в сторону увеличения экспрессии МР, наряду с ингибированием ГР, защищает нейроны от ишемического инсульта (Krugers et al., 2000). Установленный факт предотвращения трехкратным ПК индуцируемого ТГ нарушения соотношения ГР и МР в неокортексе и гиппокампе, свидетельствует об эффективности именно такого режима ПК, в отличие от однократного ПК.

Влияние ТГ на уровень экспрессии про-адаптивных белков BDNF и Vcl-2 в нейронах неокортекса и гиппокампа неПК-, одно- или трехкратно ПК-крыс. ТГ у неПК-крыс либо не изменяла уровень экспрессии BDNF и Vcl-2 либо снижала его ранний период (3-24 ч) после воздействия, но приводила к активации экспрессии данных факторов в отдаленный период (3 суток) после ТГ как в неокортексе, так и гиппокампе крыс (рис. 3). Паттерн экспрессии данных факторов у однократно ПК-животных либо не отличался от контроля либо имел схожий характер, что и у неПК-животных после ТГ. В отличие от этого, для трехкратно ПК-животных было характерно увеличение уровня экспрессии как BDNF, так и Vcl-2 в ранний период после ТГ и нормализация ее уровней к 3 суткам в исследуемых областях мозга.

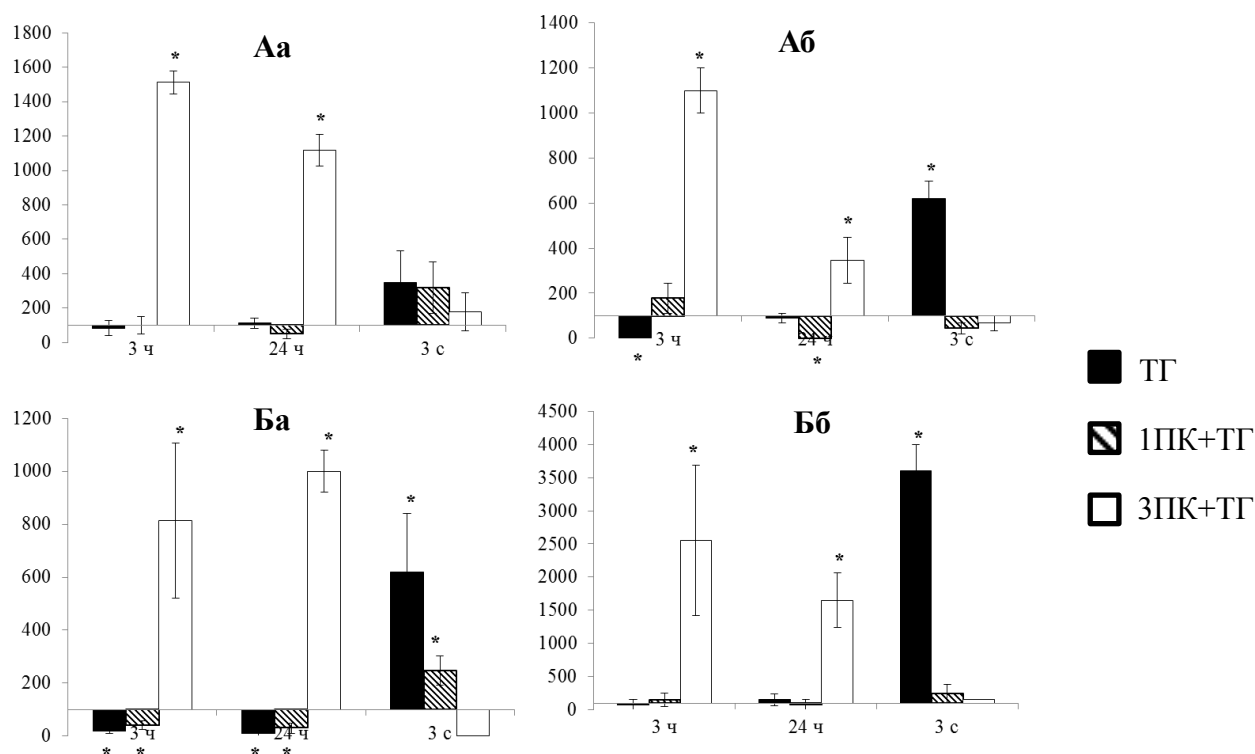


Рис. 3. Изменения количества интенсивно-иммунопозитивных к BDNF (А) и Vcl-2 (Б) клеток в неокортексе и гиппокампе крыс через 3 ч-3 суток после ТГ у неПК- и однократно или трехкратно ПК-крыс (в % от контроля). а – V слой неокортекса; б – поле СА4 гиппокампа. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

BDNF и Vcl-2 участвуют в регуляции процессов гибели/выживания нейронов, и роль в нейропротективных механизмах установлена (Marini et al., 2007; Mattson, 2008; Gillies, Kuwana, 2014; Ouyang, Giffard, 2004). BDNF реализует свое действие, связываясь с TrkB рецепторами и активируя три основных внутриклеточных сигнальных каскада - опосредуемого фосфолипазой

C, MAPK/ERK и фосфоинозитид-3-киназой/протеин киназой B (Kaplan, Miller, 2000; Chao, 2003; Reichardt, 2006). Таким образом, BDNF может влиять на индукцию экспрессии генов, модулировать возбудимость плазматической мембраны, за счет изменения кинетики ряда мембранных рецепторов, изменять активность ионных каналов. Антиапоптотический фактор Bcl-2 выполняет свою нейропротективную функцию путем регулирования проницаемости наружной митохондриальной мембраны, сохраняя ее целостность и предотвращая выход из митохондрии цитохрома c и других про-апоптотических факторов (Chipuk et al., 2010; Gillies, Kuwana, 2014).

Известно, что первые часы после ишемического инсульта являются критическими для запуска апоптотической программы гибели нейронов (Fujimura et al., 2000; Gewies, 2003). Очевидно, сниженный или базальный уровень экспрессии про-адаптивных белков BDNF и Bcl-2, наблюдаемый через 3-24 ч после ТГ у неПК- и однократно ПК-крыс, может являться одной из причин повреждения нейронов неокортекса и гиппокампа. Вместе с тем, обнаруженная активация экспрессии данных факторов через 3 суток после ТГ – к сроку, когда выявляются структурные изменения нейронов и их гибель (что следует из морфологических исследований), возможно, оказывается слишком поздней и недостаточной для предотвращения развития апоптоза либо носит отсроченный компенсаторный характер в нейронах, переживших ТГ. В отличие от этого, у трехкратно ПК-животных наблюдается выраженное увеличение экспрессии BDNF и Bcl-2 в нейронах неокортекса и гиппокампа на раннем сроке после ТГ. Учитывая нейропротективную роль этих факторов, очевидно, ранняя индукция их экспрессии трехкратным, но не однократным, ПК является важным условием для предотвращения запуска программы апоптоза и выживания нейронов при действии ТГ. К 3 суткам после ТГ у трехкратно ПК-животных происходит нормализация уровня экспрессии данных факторов, что, очевидно, отражает возвращение системы в исходное состояние после действия стрессового стимула. Полученные результаты подтверждаются также рядом работ, выполненных в парадигме ишемического воздействия. В частности, показано, что уровень экспрессии мРНК BDNF повышен в пери-инфарктной области после ишемии, а в инфарктном ядре – снижен (Kokaia et al., 1995). Активация Bcl-2 происходит в ответ на действие умеренной ишемии или в пери-инфарктной области после действия тяжелой повреждающей ишемии и имеет протективный эффект (Sugiura et al., 2004; Wu et al., 2003).

Особенности экспрессии активационных, лиганд-зависимых ТФ и про-адаптивных белков BDNF и Bcl-2 при действии одного или трех сеансов умеренной гипобарической гипоксии.

Наряду с исследованием эффектов ТГ и прекоиндиционированной ТГ на экспрессию ряда молекулярных факторов также была проведена серия экспериментов по изучению влияния

самой адаптогенной УГГ, применяемой без последующего воздействия ТГ. Сравнивая эффекты однократного и трехкратного предъявления УГГ можно заключить, что однократная УГГ преимущественно не оказывает выраженного увеличения уровня экспрессии активационных и лиганд-зависимых ТФ, про-адаптивных белков, а в ряде случаев вызывает ее снижение в неокортексе и гиппокампе крыс. На рис.4 демонстрируются результаты исследований, наглядно иллюстрирующие различия эффектов однократного и трехкратного предъявления УГГ в неокортексе и гиппокампе крыс. В то же время, трехкратное применение УГГ индуцирует выраженную активацию экспрессии исследуемых молекулярных факторов в данных областях мозга. Следовательно, последующее предъявление ТГ происходит на фоне повышенного содержания в клетке ТФ и про-адаптивных белков. Принимая во внимание важную роль данных молекулярных факторов в механизмах нейропротекции, можно полагать, что увеличение уровня их экспрессии, очевидно, необходимо для формирования толерантности нейронов мозга к гипоксии и предотвращения повреждений, вызванных ее предъявлением. Вместе с тем, только трехкратные, а не однократные, воздействия УГГ способны индуцировать экспрессию этих факторов.

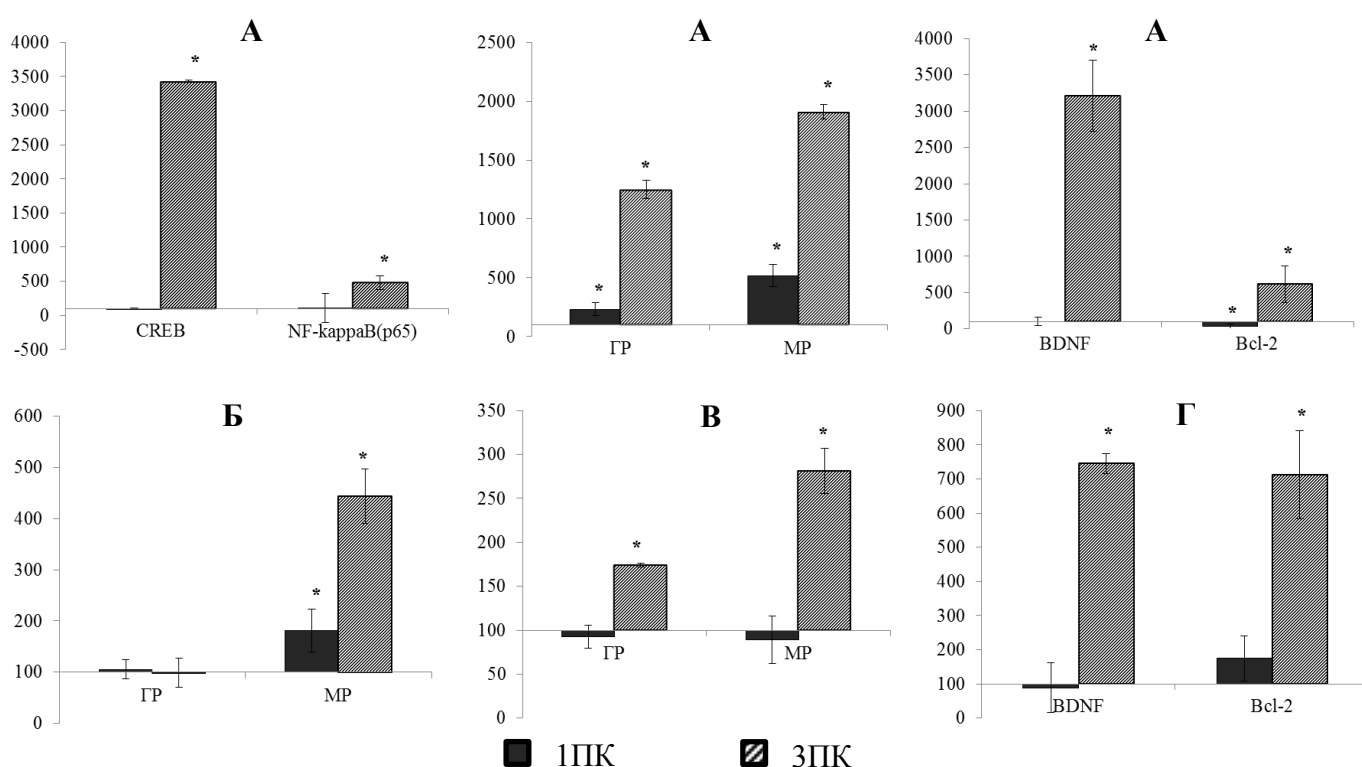


Рис. 4. Интенсивность экспрессии активационных, лиганд-зависимых ТФ и про-адаптивных белков в областях неокортекса и гиппокампа крыс через 24 ч после предъявления одного или трех сеансов УГГ (в % от контроля). А – V слой неокортекса; Б – CA1; В – зубчатая извилина; Г – CA4 гиппокампа. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

Обобщая полученные в работе результаты экспериментальных исследований, следует отметить, что впервые проведен анализ влияния различных режимов гипобарической гипоксии (повреждающего и адаптогенного) на ряд молекулярных факторов (активационных, лиганд-зависимых ТФ, про-адаптивных белков), вовлекаемых в процессы адаптации и выживания нейронов мозга и организма в целом. Интерпретация характера их вовлечения в эти процессы базировалась на морфологических данных. Обнаруженные особенности экспрессии ТФ и про-адаптивных белков свидетельствуют о вовлечении данных факторов в молекулярные механизмы, индуцируемые гипоксическим ПК. Полученные результаты также подтверждают представление о том, что развитие полноценного протективного эффекта гипоксического ПК связано с особенностями его предъявления, в частности, кратности сеансов (Самойлов, 1999; Самойлов, Рыбникова, 2012; Kitagawa et al., 1990). Для эффективной кооперативной активации ТФ и про-адаптивных белков при формировании механизмов толерантности нейронов мозга необходимо использовать определенный режим ПК-воздействия, в частности, как показано в работе, трехкратное воздействие УГГ.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что тяжелая гипобарическая гипоксия (ТГ) (180 мм.рт.ст., 3 ч) приводит к выраженным повреждениям нейронов неокортекса и гиппокампа к 3-7 суткам после ТГ, что проявляется их хроматолизом, вакуолизацией цитоплазмы, наличием гиперхромных пикнотических клеток и частичной гибелью нервных клеток. Трехкратное, но не однократное, прекондиционирование (ПК) предотвращает нарушения морфологии нейронов после ТГ.

2. Установлено, что ТГ, в основном, подавляет или не изменяет экспрессию активационных транскрипционных факторов (ТФ) pCREB и NF-κappaB (p65 и c-Rel) в клетках неокортекса и гиппокампа в ранний период (3-24 ч) после воздействия. У однократно ПК-животных не выявляется существенных изменений экспрессии активационных ТФ после ТГ, а у трехкратно ПК-животных отмечается выраженное усиление их экспрессии на этом сроке.

3. Выявлено, что ТГ у неПК и одократно ПК-крыс вызывает выраженное подавление экспрессии минералокортикоидных рецепторов (МР) в неокортексе и поле СА1 гиппокампа на фоне увеличения глюкокортикоидных рецепторов (ГР) в этой области гиппокампа через 3-24 ч после воздействия. Такое нарушение баланса содержания ГР и МР, очевидно, является одним из механизмов повреждения нейронов. Трехкратное ПК индуцирует умеренную активацию ГР и МР в неокортексе и препятствует подавлению экспрессии МР в поле СА1 гиппокампа вслед за ТГ.

4. Обнаружено, что ТГ у неПК-крыс подавляет уровень экспрессии ГР – в зубчатой извилине гиппокампа, участвующей в регуляции гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной

системы. В отличие от этого, у трехкратно ПК-животных обнаружено выраженное повышение уровня экспрессии ГР в зубчатой извилине, что, очевидно, способствует нормализации активности ГГАС после ТГ.

5. Установлено, что ТГ у неПК и однократно ПК-крыс приводит к существенному уменьшению содержания нейротрофического фактора BDNF в неокортексе и гиппокампе и антиапоптотического фактора Bcl-2 в неокортексе в ранний период после воздействия. Напротив трехкратное ПК выражено увеличивает уровень их экспрессии как в неокортексе, так и гиппокампе крыс через 3-24 ч после ТГ.

6. Обнаружено, что трехкратная умеренная гипобарическая гипоксия (360 мм рт.ст., 3 раза по 2 ч с перерывом между сеансами 24 ч), используемая в качестве ПК-воздействия, в отличие от однократной, индуцирует выраженную кооперативную экспрессию активационных и лиганд-зависимых ТФ, а также продуктов их генов-мишеней – проадаптивных белков BDNF и Bcl-2, в неокортексе и гиппокампе крыс через 24 ч после воздействия, что обуславливает формирование механизмов гипоксической толерантности нейронов мозга и способствует нейропротекции при предъявлении ТГ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах

1. Rybnikova E., Gluschenko T., Tulkova E., Churilova A., Jaroshevich O., Baranova K., Samoilov M. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappaB in the neocortex of rats before and following severe hypoxia // J. Neurochem. - 2008. - V.106, №3. - С.1450-1458.
2. Чурилова А.В., Рыбникова Е.А., Глущенко Т.С., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Влияние умеренной гипобарической гипоксии в режиме прекондиционирования на экспрессию транскрипционных факторов pCREB и NF-kB в гиппокампе мозга крыс до и после тяжелой гипоксии // Морфология. - 2009. - Т.136, №6. - С.38-42. (переведено в Neurosci Behav Physiol. - 2010. - V.40, №8. - P.852-857).
3. Rybnikova E., Gluschenko T., Churilova A., Pivina S., Samoilov M. Expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in hippocampus of rats exposed to various modes of hypobaric hypoxia: Putative role in hypoxic preconditioning // J. Brain Res. - 2011. - V.1381. - P.66-77.
4. Чурилова А.В., Глущенко Т.С., Самойлов М.О. Изменения нейронов гиппокампа и неокортекса крыс под влиянием различных режимов гипобарической гипоксии // Морфология. - 2012. - Т.141, №1. - С.7-11.
5. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Чурилова А.В. Сигнальные молекулярные и гормональные механизмы формирования протективных эффектов гипоксического прекондиционирования // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2012. - №3. - С.3-10.

6. Самойлов М.О., Чурилова А.В., Глущенко Т.С., Рыбникова Е.А. Влияние различных режимов гипобарической гипоксии на экспрессию кортикостероидных рецепторов в гиппокампе крыс // Физиол.журн. им. И.М. Сеченова. - 2012. - Т.98, №11. - С.1380-1395.

7. Самойлов М.О., Чурилова А.В., Глущенко Т.С., Баранова К.А. Паттерн нейрональной экспрессии транскрипционных факторов NF-kB при предъявлении различных режимов гипобарической гипоксии // Украинский физиологический журнал. - 2013. - Т.59, №6.

8. Samoilov M, Churilova A, Gluschenko T, Rybnikova E. Neocortical pCREB and BDNF expression under different modes of hypobaric hypoxia: role in brain hypoxic tolerance in rats // Acta Histochem. - 2014. - V.116, №5. - P.949-957.

9. Чурилова А.В., Глущенко Т.С., Самойлов М.О. Изменение экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 в неокортексе и гиппокампе у крыс под влиянием различных режимов гипобарической гипоксии // Морфология. – 2014. – Т.146, №5. – С.7-13.

Тезисы докладов

1. Чурилова А.В., Глущенко Т.С., Рыбникова Е.А. Влияние умеренной гипобарической гипоксии в режиме прекондиционирования на экспрессию транскрипционных факторов pCREB и NFkB в неокортексе и гиппокампе крыс до и после тяжелой гипоксии // Гипоксическое, ишемическое прекондиционирование мозга: Российско-Польский рабочий симп., посв. 50-летию юбилею сотрудничества Польской и Российской Академии Наук в рамках Дней Польской науки в России; Санкт-Петербург-Колтуши, 11-14 декабря 2008 г.: Материалы симп. СПб., 2008.-С. 127-131.

2. Чурилова А.В. Модификации экспрессии транскрипционного фактора NFkB в гиппокампе крыс при формировании толерантности мозга к гипоксии// Механизмы адаптации физиологических систем организма к факторам среды: конференция молодых ученых, посвященная 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П.Павлова РАН; 21-22 декабря 2010 г. Тезисы докладов, СПб, 2010. – С.116.

3. Чурилова А.В. Влияние гипобарической гипоксии, предъявляемой крысам в различных режимах, на экспрессию глюко- и минералокортикоидных рецепторов в зоне CA1 гиппокампа// Материалы Всероссийской молодежной конференции-школы «Нейробиология интегративных функций мозга», посвященной 120-летию создания физиологического отдела имени И.П.Павлова НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН; 21-25 ноября 2011г. Медицинский академический журнал, СПб. Т.11. Спецвыпуск. 2011 г. С. 59.

4. Чурилова А.В., Самойлов М.О. Роль кортикостероидных рецепторов вентрального гиппокампа в реализации проадаптивных эффектов гипоксического прекондиционирования// III конференция молодых ученых института цитологии РАН, 15–16 мая 2012 г. Журн. Цитология. Т.54 №4. С.363. 2012 г.

5. Чурилова А.В. Влияние различных режимов гипобарической гипоксии на экспрессию транскрипционных факторов pCREB и NF-kB в неокортексе мозга крыс.// 2 международная конференция «Высокогорная гипоксия и геном».14-17 августа 2012 г. Физиологический журнал, Киев. Т58. №4. -С. 88. 2012

6. Чурилова А.В. Особенности экспрессии минералокортикоидных рецепторов в неокортексе крыс при предъявлении различных режимов гипобарической гипоксии.// Материалы II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия». 12-14 ноября 2012 г. Медицинский академический журнал. 2012. Т. 12. № 3. С. 52-54.

7. Чурилова А.В., Самойлов М.О. Гипоксическое прекондиционирование: особенности экспрессии активационных транскрипционных факторов в гиппокампе крыс при предъявлении различных режимов гипобарической гипоксии// Фундаментальные науки-Медицине. Сборник статей (материалы Международной научной конференции). 2013. С. 376-379.

8. Чурилова А.В. Особенности экспрессии pCREB и BDNF в ответ на одно- и многократные прекондиционирующие воздействия в нейронах неокортекса крыс до и после тяжелой гипобарической гипоксии// Всероссийская молодежная конференция «Нейробиология интегративных функций мозга». 12-14 ноября 2013 г. Сборник тезисов докладов. 2013 г. - С 70.

9. Чурилова А.В., Глущенко Т.С., Самойлов М.О. Паттерн экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 в неокортексе и гиппокампе крыс при предъявлении различных режимов гипобарической гипоксии// Всероссийская конференция с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга». 24-26 июня 2014 г. Тезисы докладов. 2014 г. – С. 145.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГГАС – гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальная система;

ГР – глюкокортикоидные рецепторы;

МР – минералокортикоидные рецепторы;

ПК-прекондиционирование;

ТГ – тяжелая гипоксия;

ТФ – транскрипционные факторы;

УГГ – умеренная гипобарическая гипоксия.