

На правах рукописи

ШИШКИНА ТАТЬЯНА ВИКТОРОВНА

**АНТИГИПОКСИЧЕСКОЕ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ
ГЛИАЛЬНОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ПРИ
МОДЕЛИРОВАНИИ ФАКТОРОВ ИШЕМИИ**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Санкт-Петербург - 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования "Национальный исследовательский нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского"

Научный руководитель:
доктор биологических наук

Ведунова Мария Валерьевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Науменко Владимир Сергеевич

заведующий лабораторией нейрогеномики поведения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Института цитологии и генетики СО РАН»

доктор биологических наук, профессор

Семенов Дмитрий Германович

ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Защита состоится «___» _____ 2017 года в «___» часов на заседании диссертационного совета Д002.020.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН" по адресу: 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова д.6) и на сайте <http://infran.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2017 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Ордян Наталья Эдуардовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение механизмов функционирования и адаптации нервной системы к условиям ишемии является сложной и актуальной задачей современной нейробиологии и медицины. Концептуально новым подходом, позволяющим приблизиться к пониманию процессов передачи и хранения информации, а также особенностей гомеостатической пластичности, являются исследования на уровне нейронных сетей. Именно нейронная сеть, согласно современным представлениям, является минимальной функциональной единицей центральной нервной системы (Schlingloff et al., 2014; Eskandari Sedighi et al., 2014; Tong et al., 2014).

Наиболее оптимальной моделью для реализации данного подхода являются первичные культуры нервных клеток. Совмещение первичных культур с инновационными методиками неинвазивной регистрации функциональной биоэлектрической и метаболической активности, прижизненной детекции экспрессии мРНК делает возможным на системном уровне исследовать как моррофункциональные изменения нейронных сетей в условиях моделирования патологических процессов, так и изучить возможные задействованные в этих процессах молекулярные механизмы.

Одним из наиболее распространенных факторов, поражающих работу головного мозга, является ишемия. Нарушение кислородного и субстратного обеспечения вследствие ишемии ведет к значительным моррофункциональным и метаболическим изменениям (нарушение синаптической передачи, активация свободно-радикальных процессов, эксайтотоксичность и др.), вызывающих гибель клеток нейронных сетей (Larsen, E. C., 2007; Иванов К. П., 2010). В связи с этим, огромное значение имеет поиск веществ, способных защитить клетки головного мозга от ишемического повреждения, а так же активировать репаративные процессы в отдаленном постишемическом периоде.

В настоящее время перспективным видится применение в качестве корректоров ишемического повреждения веществ эндогенного происхождения. Данный подход решает проблему развития иммунной реакции, побочных эффектов, увеличения токсической нагрузки на организм. В качестве соединений, обладающих потенциальной способностью уменьшить последствия ишемического воздействия, могут рассматриваться нейротрофические факторы - регуляторные белки, играющие ключевую роль в функционировании центральной нервной системы. Одним из представителей нейротрофических факторов является глиальный нейротрофический фактор (GDNF).

Глиальный нейротрофический фактор (GDNF) - один из наиболее важных факторов выживания нейронов, он способствует сохранению и дифференциации различных популяций клеток центральной и периферической нервной системы (Allen S.J. et al., 2013). GDNF способен оказывать защитное действие на клетки головного мозга при развитии нейродегенеративных процессов, регулировать образование и функциональные свойства нейронной сети (Duarte E.P. et al., 2012; Allen S.J. et al., 2013; Blits B. et al., 2015). Для некоторых нейротрофических факторов показана возможность напрямую влиять на синаптическую передачу, однако остается не выясненным, может ли GDNF оказывать подобные эффекты. Предполагается, что GDNF способен стимулировать промоторную активность GluR2-субъединиц АМРА-рецепторов, играющих важную роль в синаптогенезе и

формировании нейронной сети, а также в синаптической пластичности (Brene S. et al., 2000).

Таким образом, изучение на системном уровне возможности влияния GDNF на особенности функционирования, структурно-функциональной реорганизации, гомеостатическую пластичность нейронных сетей в норме и при моделировании стресс-факторов представляет фундаментальную основу для создания инновационной терапевтической стратегии коррекции повреждений головного мозга.

Цель работы:

Целью работы является изучение нейропротекторного действия глиального нейротрофического фактора (GDNF) при моделировании гипоксии и глюкозной депривации.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние GDNF на изменение спонтанной биоэлектрической активности нейронных сетей *in vitro* в норме.

2. Исследовать нейропротекторные эффекты GDNF на жизнеспособность и спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей первичных культур гиппокампа в раннем и отдаленном периоде при моделировании нормобарической гипоксии и глюкозной депривации *in vitro*.

3. Изучить влияние GDNF на возможность частичного восстановления спонтанной биоэлектрической активности первичных культур гиппокампа в отдаленном постгипоксическом периоде *in vitro*.

4. Исследовать влияние GDNF на экспрессию мРНК GluR2-субъединицы AMP-рецептора в культурах гиппокампа при моделировании нормобарической гипоксии *in vitro*.

5. Изучить влияние GDNF на устойчивость, а также на воспроизведение долговременной памяти у животных при моделировании гипоксии *in vivo*.

Научная новизна

В диссертации впервые проведено исследование влияния GDNF на спонтанную нейросетевую активность культур диссоциированных клеток гиппокампа в норме и при воздействии стресс-факторов (нормобарической гипоксии и глюкозной депривации).

Установлено, что превентивное добавление GDNF (1 нг/мл) в культуральную среду снижает негативные эффекты кислородного и субстратного голодаия, повышает жизнеспособность клеток культуры, сохраняет на определенном физиологическом уровне функциональную биоэлектрическую активность нейрон-глиальных сетей *in vitro*.

Впервые показано, что глиальный нейротрофический фактор увеличивает уровень экспрессии мРНК GluR2-субъединицы AMPA-рецепторов при моделировании острой нормобарической гипоксии *in vitro*.

В рамках диссертационного исследования было выявлено, что превентивное интраназальное введение GDNF повышает устойчивость животных в условиях кислородной недостаточности, что проявляется в увеличении времени жизни на моделируемой «высоте», сохранении следов долговременной пространственной памяти.

Практическая и теоретическая значимость работы

Полученные результаты расширяют имеющиеся знания о нейропротекторных эффектах, оказываемых GDNF в рамках нервной системы.

Показано, что при моделировании основных факторов ишемии (гипоксии и глюкозной депривации) *in vitro* превентивное введение GDNF повышает жизнеспособность клеток культуры, способствует сохранению функциональной активности и внутренней структуры нейронных сетей. Повышение устойчивости животных в условиях кислородной недостаточности также свидетельствует о наличие у GDNF нейропротекторных свойств.

Положения, выносимые на защиту

1. Не выявлено влияние GDNF на показатели спонтанной биоэлектрической активности в норме.

2. GDNF обладает выраженным нейропротекторным и, в частности, антигипоксическим эффектом, выражющимся в сохранении жизнеспособности и нейросетевой активности в условиях острой кислородной и глюкозной депривации, в процессе реоксигенации, а так же в отдаленном периоде.

3. GDNF не способен стимулировать функциональную репарацию нейронных сетей в отдаленный постгипоксический период.

4. GDNF оказывает стимулирующее действие на экспрессию GluR2-субъединицы AMPA-рецепторов.

5. Превентивное интраназальное введение глиального нейротрофического фактора повышает устойчивость животных к условиям гипобарической гипоксии, а также способствует сохранению долговременной пространственной памяти в постгипоксическом периоде.

Апробация работы. Полученные результаты были представлены на VI Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине» (Троицк, 2014), где в рамках конкурса работ молодых ученых был получен диплом лауреата за представленный доклад, Международной научной школе «Frontiers in modern neuroscience» (Нижний Новгород, 2014), 67-69й областной студенческой научной конференции «Биосистемы: Организация, Поведение, Управление» (Нижний Новгород, 2014-2016), 9th FENS Forum of Neuroscience (Милан, 2014), Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пущино, 2015) в рамках которой представленный доклад стал призером в конкурсе работ молодых ученых, V съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), IX международном симпозиуме «Neuroprotection and Neurorepair» (Лейпциг, 2016).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 29 печатных работ, из которых: 4 статьи в рецензируемых отечественных изданиях индексируемых в базе Web of science и Scopus, 2 тезиса докладов конференций, опубликованных в рецензируемых международных изданиях, индексируемых в базе Web of science и Scopus, 2 тезиса докладов, опубликованных в отечественном неиндексируемом журнале и 21 тезис докладов, опубликованных в сборниках конференций.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в постановке экспериментов, получении, обработке и анализе экспериментальных данных. Интерпретация экспериментальных данных выполнена лично автором, подготовка основных публикаций по результатам работы проводилась при его непосредственном участии.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа в объеме 130 страниц включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы – 143 источников, приложение. Работа иллюстрирована 46 рисунками и 2 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

Материалом для исследований *in vitro* послужили первичные культуры клеток гиппокампа, полученные от 18 дневных мышиных эмбрионов линии C57BL/6. Опыты *in vivo* проводились на половозрелых самцах мышей линии C57BL/6.

Метод культивирования диссоциированных клеток гиппокампа

Диссоциирование клеток достигалось путем обработки ткани гиппокампа 0,25% трипсином. Клетки суспензировались в питательной среде, состоящей из 92,75% нейробазальной среды, 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% биоактивной добавки B27, 0,25% глутамина. Культивирование клеток осуществлялось на покровных стеклах и мультиэлектродных матрицах. Исходная плотность клеток составляла 9000 кл./мм². Поддержание жизнеспособности культуры осуществлялось в условиях CO₂ инкубатора при температуре 35,5°C, газовой смеси: 95% воздуха и 5% CO₂, 100% влажности (Мухина и др., 2009, Vedunova et al., 2013).

Моделирование факторов ишемии *in vitro*

Моделирование факторов ишемии проводилось на 14 день развития культур *in vitro*. Гипоксия моделировалась путем замены нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода в течение 10 минут. Вытеснение кислорода из среды проводилось в герметичной камере с использованием инертного газа (аргон). Глюкозная депривация (ГД) моделировалась путем замены на 2 часа культуральной среды на среду, не содержащую глюкозу, пируват, лактат. Использовалась специально разработанная среда, соответствующая по составу NeurobasalTM, но не содержащая перечисленных энергетических субстратов (Мухина и др., 2009, Vedunova et al., 2013). Опытной группе за 20 минут до начала эксперимента, во время воздействия, и непосредственно после, в среду культивирования добавляли 1 нг/мл GDNF. Моделирование факторов ишемии в контрольной группе проводилось без добавления нейротрофического фактора. Интактная группа воздействию факторов ишемии не подвергалась.

Таблица 1

Распределение экспериментальных групп в исследованиях *in vitro*

Серия	Название группы	Период исследования, соответствующий DIV	Количество культур
Влияние GDNF на спонтанную биоэлектрическую активность первичных культур гиппокампа	Интактная	14	6
	GDNF (1 нг/мл)		6
Оценка антигипоксического и нейропротекторного действия GDNF при моделировании острой нормобарической гипоксии	Интактная	14 - 21	34
	Гипоксия контроль (без GDNF)		50
	Гипоксия + GDNF (1		56

	нг/мл)		
Оценка нейропротекторного действия GDNF при моделировании глюкозной депривации	Интактная	14 - 21	38
	ГД контроль (без GDNF)		42
	ГД + GDNF (1 нг/мл)		42

Оценка выживаемости нейронов после моделирования стресс-условий *in vitro*

Оценка жизнеспособности клеток первичной культуры гиппокампа проводилась на 1, 3 и 7 день после моделирования стрессогенных условий. Для изучения жизнеспособности проводилась окраска клеточных культур пропидий иодидом (окрашивает ядра мертвых клеток) и бис-бензимидом (окрашивает ядра всех клеток) с целью обнаружения погибших клеточных ядер из общего числа клеток в культуре. Доля мертвых клеток рассчитывалась как отношение числа мертвых клеток окрашенных пропидий иодидом к общему числу клеток окрашенных бис-бензимидом в процентном соотношении.

Регистрация и анализ спонтанной биоэлектрической активности нейронных сетей первичных культур гиппокампа

Регистрация спонтанной биоэлектрической активности проводилась с использованием мультиэлектродных систем MED64 и МЕА60 при стандартных условиях окружающей среды: температура, содержание углекислого газа и кислорода, влажность. Для получения данных использовался набор программного обеспечения Conductor™ (Alpha Med Science, Япония) и MC Rack™ (Multichannel Systems, Германия).

Регистрировались следующие основные показатели: количество сетевых пачек, количество спайков в пачке, длительность сетевой пачки. Сетевой пачкой (Burst) внеклеточно регистрируемых спайков считается моментальная пространственно-временная последовательность спайков, регистрирующаяся не менее чем на 4 электродах; с межспайковым интервалом не более 100 мс (частота более 10 Гц).

Анализ полученных данных производился с использованием разработанного в программной среде MATLAB оригинального пакета алгоритмов МЕАМАН (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2012611190).

Метод кросс-корреляций и графов

Для анализа внутренней структуры сети использовался метод построения графа сети. Для оценки степени синхронизации всевозможных пар электродов с учётом синаптических задержек был применен метод расчета доли переданных импульсов по аналогии с коэффициентом кросс-корреляции для непрерывных сигналов. В соответствии с ним рассчитывалось число «синхронных» импульсов, попавших на обоих каналах в интервалы допуска, равные δ , центры которых удалены на время задержки τ , пропорциональное расстоянию между электродами. Использовалась нормировка на число принятых импульсов постсинаптическим нейроном – n_j . Таким образом, формула для вычисления матрицы кросс-корреляции выглядит так:

$$C_{ij} = \frac{n_{synchr}}{n_j} \quad (1)$$

C_{ij} – коэффициент синхронизации сети, n_{synchr} – число синхронных импульсов, попавших на каналы, n_j – число всех принятых импульсов (1).

Далее выбирались 1-5% наибольших коэффициентов C_{ij} и определялся набор индексов – клеток-хабов с максимальным числом функционально активных связей. Также для каждого хаба « i » рассчитывалось число связей как частота повторения индекса i среди множества C_{ij} . На следующем этапе происходило построение графа связности. При этом размер вершины пропорционален числу значимых связей. Ребро графа соответствует функциональной связи, по которой сигнал одного электрода передаётся на другой за индивидуальное для каждой пары время синаптической задержки $t \pm \delta/2$.

Методика прижизненной детекции РНК-зондов

Для детекции мРНК применяются РНК-детекторные зонды SmartFlare™, которые позволяют проводить прижизненные исследования без повреждения клеток. Зонд SmartFlare представляет собой золотую наночастицу диаметром 14 нм, конъюгированную с многочисленными копиями двунитевого олигонуклеотида (олиго-дуплексы). Олиго-дуплексы состоят из «РНК-захватывающей» нити, и комплементарной ей «репортерной» последовательности, которая включает флуорофор, блокированный золотой наночастицей. Зонды поглощаются живыми клетками путем эндоцитоза, проникнув в клетку зонд вступает в контакт со своей РНК-мишенью, последняя связывается с комплементарной ей «захватывающей» нитью и заменяет репортерную нить. Репортерная нить, флуорофор в которой теперь разблокирован, флуоресцирует (возбуждение 550 нм, эмиссия 570 нм) и может быть идентифицирован (рис.1).

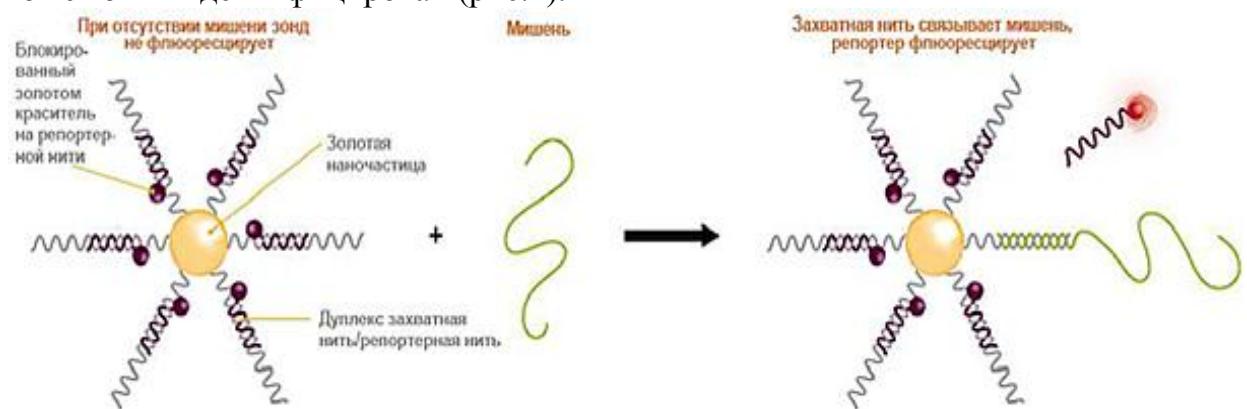


Рисунок 1. Строение и принцип работы мРНК-зондов

Клетки культуры в течение 72 часов инкубировались с мРНК-детекторными зондами, затем проводилась визуализация. Для этого использовался конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM Duo Scan 510 (Zeiss, Германия).

Для индентификации тел функционально активных клеток применялся специфический кальциевый краситель Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB1) (возбуждение 488 нм, эмиссия 525 нм).

Моделирование острой гипобарической гипоксии *in vivo*

Для моделирования острой гипобарической гипоксии использовалась вакуумная проточная барокамера. За 40 мин до подъема на высоту

экспериментальной группе животных проводилось интраназальное введение GDNF в дозах 40 мкг/кг и 4 мкг/кг. Контрольной группе интраназально вводили физиологический раствор, группе сравнения – внутрибрюшинно реамберин (150 мг/кг) как общепринятый антигипоксант. Затем мыши помещались в барокамеру, в которой создавались условия, соответствующие подъему на высоту 10000–10500 м (170-185 мм рт. ст.) со скоростью 183 м/с (методические рекомендации, под ред. Лукьяновой Л.Д., 1990). Особи находились на «смертельной площадке» в течение 10 минут либо до появления второго агонального вдоха. Интактная группа воздействию гипобарической гипоксии не подвергалась.

Таблица 2
Распределение экспериментальных групп в исследованиях *in vivo*

Серия	Название группы	ОГБГ	Тест «Водный лабиринт Морриса»	Тест «Открытое поле»	Количество животных
Влияние GDNF на выживаемость животных в условиях действия острой гипобарической гипоксии	Интактные	-	+	+	20
	Контроль (NaCl 0,9% раствор)	+	+	+	24
	Группа сравнения (Реамберин, 150 мг/кг)	+	+	+	19
	GDNF, 4 мкг/кг	+	+	+	21
	GDNF, 40 мкг/кг	+	+	+	20

Метод исследования навигационного научения и долговременной памяти - водный лабиринт Морриса

Протокол теста состоял из пяти сеансов обучения, по пять попыток в каждом. После окончания обучения животные были подвержены острой гипобарической гипоксии, через 24 часа после которой проводили тестирование на сохранение долговременной памяти. Тест состоял из одной пробы длительностью 60 с. При этом платформа в лабиринте отсутствовала. Определяли отсроченный коэффициент сохранения долговременной памяти (OKс) – доля времени пребывания мыши в квадранте, где находилась платформа, по отношению в общему времени пребывания мыши в водном лабиринте Морриса. Кроме отсроченного коэффициента долговременной памяти, была оценена стратегия поиска платформы во время контрольного заплыва.

Тест «Открытое поле». Определение ориентировочно-исследовательской активности животных проводилось с использованием установки «открытое поле» (Open Field LE800S, Panlab/Harvard Apparatus, Испания), до начала обучения животных в teste «Водный лабиринт Морриса» и моделирования острой гипоксии и на 1 сутки после гипоксического воздействия. Регистрация и анализ данных осуществлялись с помощью программы Smart v.3.0.03 (Panlab/Harvard Apparatus, Испания; Stoelting, США). Оценивались следующие основные показатели поведенческой активности мышей: горизонтальная двигательная активность (ГДА)

– время пребывания в центральной и периферийной зоне «открытого поля»; вертикальная двигательная активность (ВДА) – число стоек – подъемов на задние лапы. Также отмечались реакции принюхивания, замирания и груминга (Буреш с соавт., 1991).

Статистическая обработка результатов

Все полученные данные *in vitro* и *in vivo* исследований представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($m \pm SEM$) и проанализированы использованием пакета программ Microsoft Office, SigmaPlot 12.5 и однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние GDNF на спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей первичных культур клеток гиппокампа *in vitro*. Ранее уже было показано, что некоторые нейротрофические факторы способны оказывать влияние, угнетая или, напротив, стимулируя функциональную активность нейронных сетей. (Мищенко с соавт., 2015). В связи с этим, на первом этапе исследований было изучено влияние GDNF (1 нг/мл) на спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей первичной культуры гиппокампа. Установлено, что добавление GDNF в культуральную среду на 14 день развития культуры не приводит к достоверному изменению значений основных параметров спонтанной биоэлектрической активности нейронных сетей ни в течение первых 1,5 часов после аппликации, ни в течение последующих 7 дней наблюдения.

Однако, при анализе изменений внутренней структуры сети методом корреляционного анализа было показано, что, несмотря на сохранение параметров биоэлектрической активности через 20 минут после добавления GDNF наблюдается реструктуризация функциональной активности нейронной сети. Выявлена тенденция к увеличению времени передачи возбуждения от электрода к электроду (до аппликации $-12,45 \pm 1,36$ мс; через 20 минут - $14,63 \pm 1,58$ мс, через 1,5 часа $13,67 \pm 1,21$ мс). Уже через сутки после воздействия функциональная структура нейронной сети возвращается к исходному состоянию.

Таким образом, показано, что глиальный нейротрофический фактор не обладает выраженной нейротропной активностью, однако способен влиять на функциональную структуру нейронной сети.

Нейропротекторное и антигипоксическое действие GDNF при моделировании факторов ишемии. Головной мозг постоянно испытывает воздействие различных стрессорных условий, оказывающих влияние на его структурно-функциональное состояние. Одним из наиболее часто встречающихся факторов, приводящих к необратимым изменениям в функциональной активности нейронных сетей, является ишемия. Поскольку молекулярные механизмы отдельных компонентов ишемии являются разнонаправленными, для выявления нейропротекторных эффектов принципиальным является изучение действия GDNF в условиях воздействия каждого из факторов в отдельности.

Первоначально нами была проведена оценка влияния факторов ишемии на жизнеспособность клеток первичных культур гиппокампа. Было показано, что моделирование, как гипоксии, так и глюкозной депривации приводит к снижению процента живых клеток в культуре. Превентивное применение GDNF в концентрации 1 нг/мл снижает негативные эффекты, количество мертвых клеток в

данной группе достоверно ниже, чем в контрольной группе и не отличимо от показателей интактной группы (рис. 2).

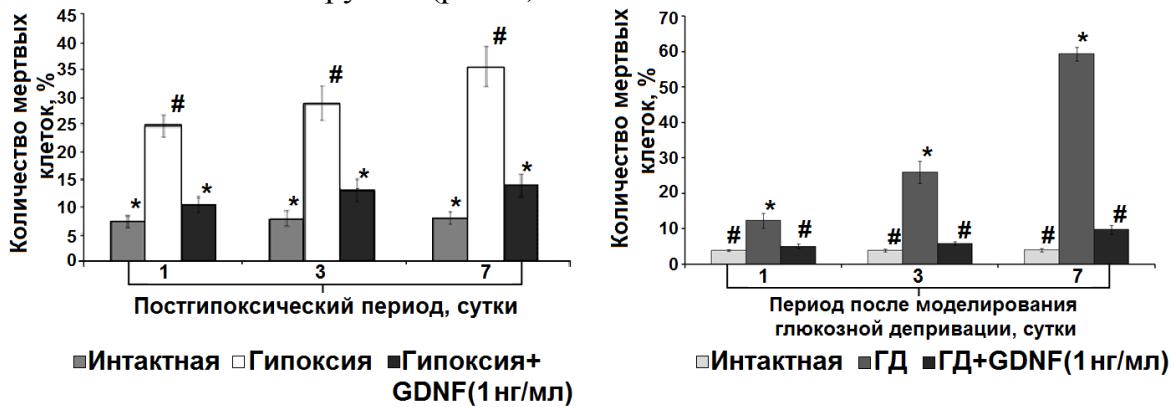


Рисунок 2. Изменение количества мертвых клеток в постгипоксический период. * - достоверность различия с интактной группой, # - достоверность различий с группой «Гипоксия», $p < 0,05$ (ANOVA)

Исследование спонтанной биоэлектрической активности нейронных сетей первичных культур клеток гиппокампа выявило достоверные изменения при моделировании факторов ишемии. Была зафиксирована полная элиминация сетевой пачечной активности непосредственно в момент воздействия лимитирующих факторов.

В течение последующего 7 дневного периода наблюдения, было показано угнетение биоэлектрической активности нейронных сетей. Так на 1 сутки после моделирования глюкозной депривации наблюдалось снижение числа сетевых пачек на 20% относительно исходной активности. Подобный эффект наблюдается и по числу спайков, составляющих пачку. Также уже с первого дня наблюдения достоверно снижается (в 1,6 раза) длительность сетевой пачки. Аналогичное снижение (на 30%) было зарегистрировано и в экспериментальной группе с применением GDNF (1 нг/мл), однако в отличие от контрольной группы к 7 дню данный показатель восстанавливается до значений исходного уровня активности (рис. 3).

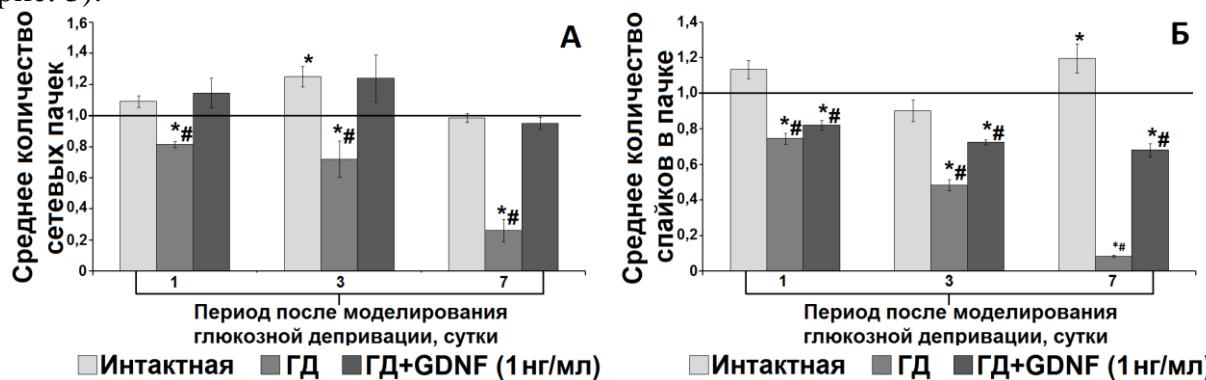


Рисунок 3. Изменение показателей спонтанной биоэлектрической активности первичной культуры клеток гиппокампа после моделирования ГД *in vitro*. Данные нормированы относительно исходного уровня. А – среднее количество сетевых пачек, Б – среднее количество спайков в пачке. * - статистически значимое отличие с исходным уровнем, # - статистически значимое отличие с интактной группой $p < 0,05$ (ANOVA)

На 3 день после моделирования ГД значения параметров спонтанной биоэлектрической активности контрольной группы оставались достоверно ниже исходного уровня активности. К 7 суткам количество сетевых пачек в контрольной группе снижалась в 3,82 раза, а количество внеклеточных потенциалов действия в сетевой пачке в 12,5 раза.

В тоже время, в экспериментальной группе с применением GDNF происходило сохранение числа сетевых пачек, значение этого параметра в течение всего периода исследования достоверно не различалось ни по сравнению с уровнем до моделирования ГД, ни по сравнению с интактной группой. Однако, происходило достоверное снижение числа спайков в пачке (в 1,4 раза), следует отметить, что данный показатель, несмотря на снижение, оставался выше (в 8 раз) показателя контрольной группы.

Воздействие глюкозной депривацией на культуру гиппокампа приводило к изменению и в паттерне активации сетевой активности. Данный показатель отражает функциональную структуру сети и является важным при оценке изменений, связанных с воздействиями на нее стрессогенных факторов. Было показано увеличение среднего времени возникновения и распространения сигнала по нейронной сети уже через 24 часа после моделирования глюкозной депривации. В отличие от контрольной группы, в группе с применением GDNF происходило незначительное изменение данного показателя (рис. 4).

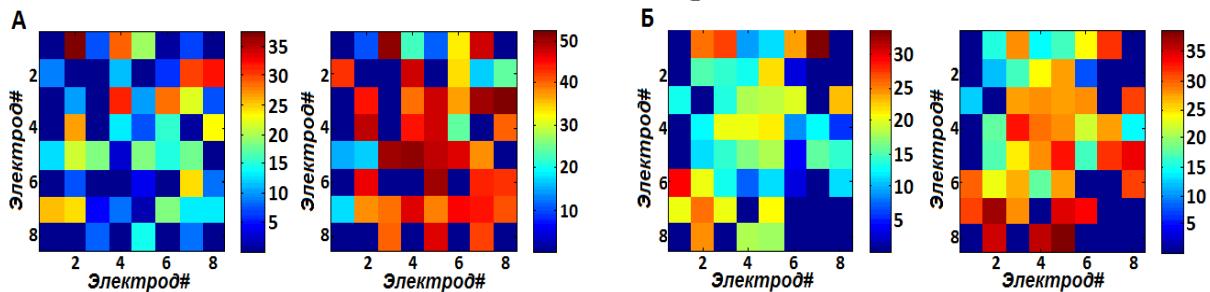
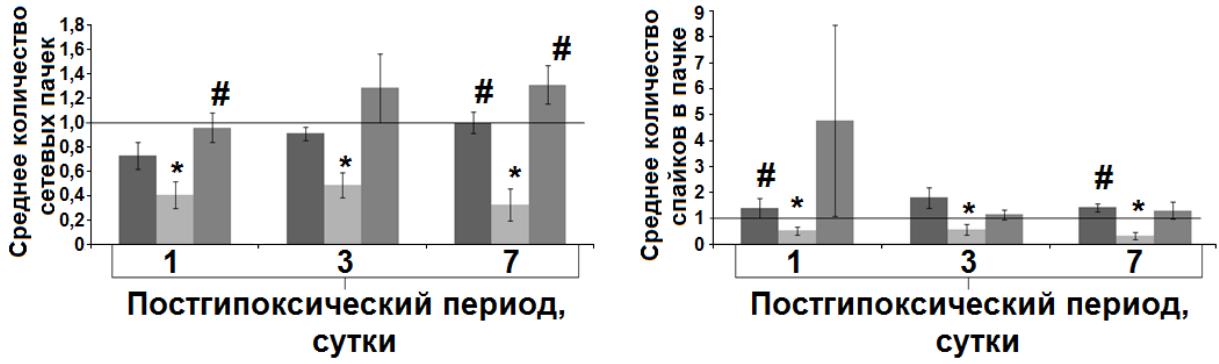


Рисунок 4. Паттерн активации спонтанной биоэлектрической активности. А – контрольная группа до моделирования ГД (слева) и через 24 часа после ГД (справа), Б – экспериментальная группа до добавления GDNF и моделирования ГД (слева) и через 24 часа после (справа).

При рассмотрении изменения биоэлектрической активности в течение 7 дней постгипоксического периода показано, что кратковременная нормобарическая гипоксия вызывает необратимые изменения сетевой активности нейронов. Так, на первые сутки постгипоксического периода количество сетевых пачек в контрольных культурах достоверно снизилось относительно исходной активности на 59%. Количество спайков в пачке уменьшилось вдвое (рис. 5). Исследование такого показателя, как длительность сетевой пачки, также показало снижение (в 1,3 раза) уже на первые сутки.



■Интактная ■Гипоксия ■Гипоксия + GDNF (1 нг/мл)

Рисунок 5. Изменение показателей спонтанной биоэлектрической активности первичной культуры клеток гиппокампа в постгипоксический период *in vitro*. Данные нормированы относительно исходного уровня. А – среднее количество сетевых пачек, Б – среднее количество спайков в пачке. * - статистически значимое отличие с исходным уровнем, # - статистически значимое отличие с интактной группой $p < 0,05$ (ANOVA)

На трети сутки после моделирования гипоксии значения показателей контрольной группы остаются достоверно ниже по сравнению с исходным уровнем активности. К 7 дню после моделирования гипоксии спонтанная биоэлектрическая активность в контрольной группе снижалась в 3,5 раза, в то время, как значения показателей в группе с применением GDNF статистически не отличались от исходной активности.

Кроме того, показано, что гипоксия вызывает не только угнетение спонтанной биоэлектрической активности, что проявляется в снижении значений ее основных показателей, но и изменяет функциональные характеристики нейросетевой пачки, что проявляется в изменении паттерна активации нейросетевой активности. Происходит достоверное увеличение (более чем в 2 раза) времени генерации и распространения сигнала по сети. Подобных изменений не было зарегистрировано в группе с применением глиального нейротрофического фактора (рис.6).

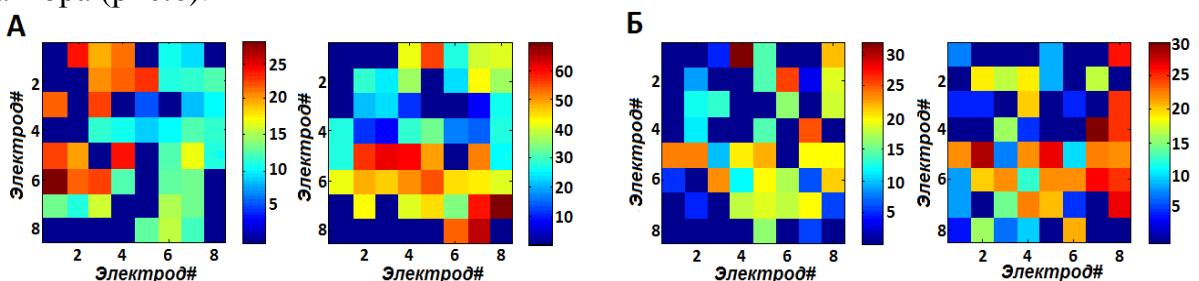


Рисунок 6. Паттерн активации спонтанной биоэлектрической активности. А – контрольная группа до моделирования гипоксии (слева) и через 24 часа после гипоксии (справа), Б – экспериментальная группа до добавления GDNF и моделирования гипоксии (слева) и через 24 часа после (справа).

С помощью метода кросс-корреляционных графов, при исследовании сетевых пачек импульсов в интактных записях показано, что в одной записи, а также в различные дни одного периода развития (14 – 21 день развития) функциональная структура нейронной сети стабильна, имеет стабильные хабы и

количество элементов имеющих связи с другими при одинаковом пороге исследования. Факторы ишемии, в частности гипоксия, вызывают упрощение внутренней структуры нейронной сети первичной культуры клеток гиппокампа (рис. 7). GDNF в свою очередь способствует сохранению сложной архитектуры сети, ее основных хабов.

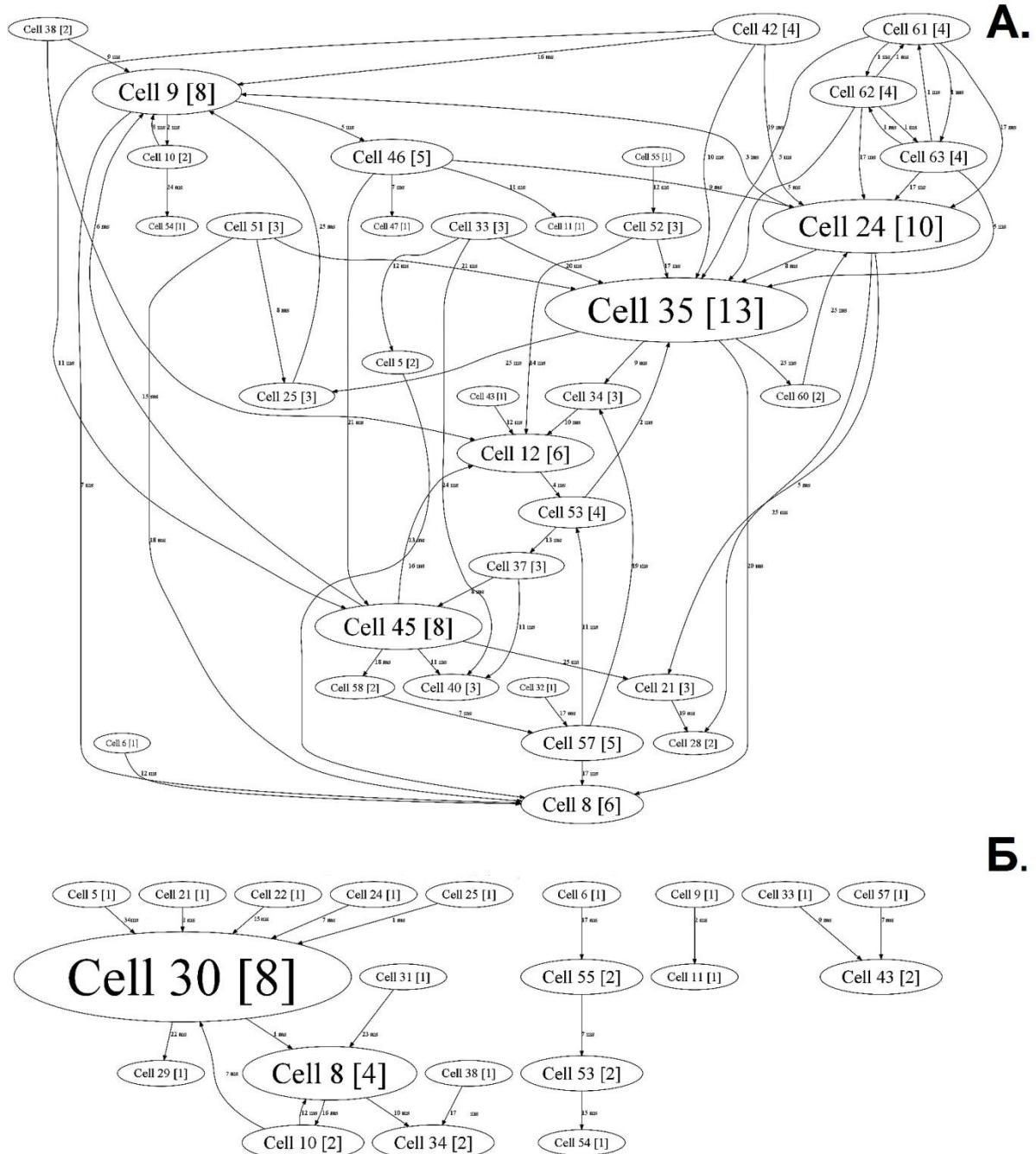


Рисунок 7. Кросс-корелляционный граф. А – до моделирования гипоксии. Б – 3 день постгипоксического периода.

Однако, если анализ паттерна активации не показал серьезных изменений и значительного увеличения времени возникновения первых спайков пачки импульсов, то анализ времени задержки сигнала методом кросс-корреляционных графов выявил достоверное ($p<0,05$) возрастание данного показателя и в контрольных группах и в группе с применением GDNF (рис.8).

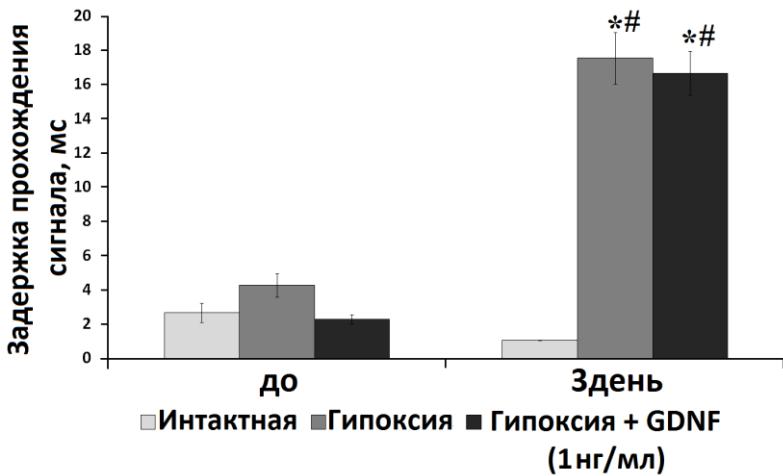


Рисунок 8. Изменение времени прохождения сигнала между электродами после моделирования гипоксии *in vitro*. * - достоверное различие с уровнем до гипоксии, # - достоверное различие с интактной группой, $p<0,05$, ANOVA.

Более детальное исследование структуры корреляционных графов выявило следующие закономерности. На 14 день развития нейрон-глиальная сеть представляет собой сложную, устойчивую систему, не имеющую одной явной доминанты (присутствует несколько крупных хабов). Моделирование острой гипоксии приводит к реструктуризации сети, происходит уменьшение количества связей на активных электродах (до моделирования гипоксии - $6,97\pm0,41$, на третий день постгипоксического периода – $3,34\pm0,23$), изменяется значимость отдельных электродов (рис. 9), процент перекрывания в контрольной группе составляет $57,68\pm4,93\%$. Уменьшается количество хабов (до гипоксии $7,83\pm0,74$, на третий день постгипоксического периода $3,34\pm0,77$), появляются некоторые новые хабы, а часть старых в свою очередь исчезает. Однако, не наблюдается достоверного изменения числа связей составляющих хаб (до гипоксии $11,54\pm0,82$, на третий день постгипоксического периода $11,4\pm1,19$).

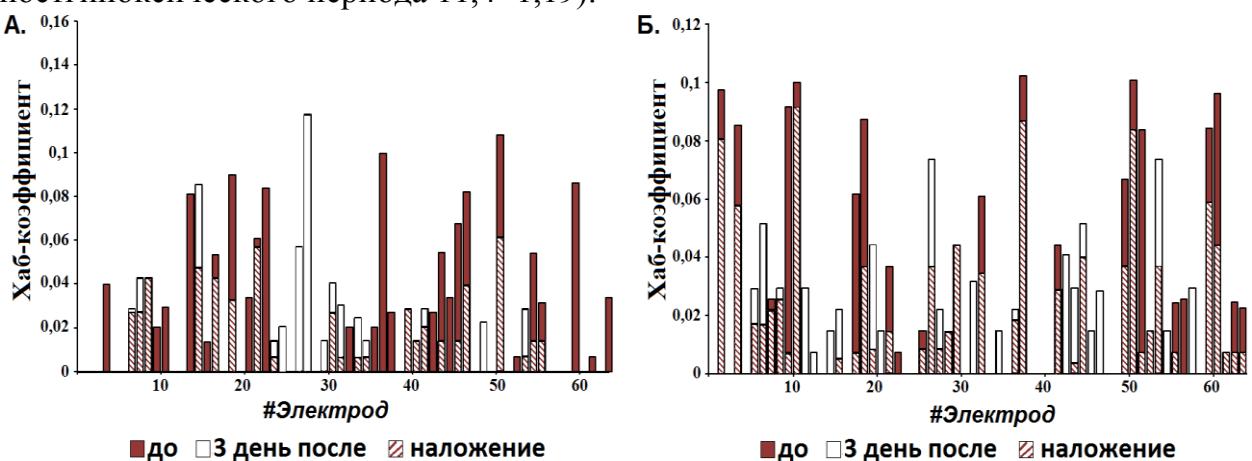


Рисунок 9. Хаб-коэффициент. Изменение значимости отдельных электродов в контрольной группе после моделирования гипоксии *in vitro*. А – контрольная группа, Б – группа с применением GDNF (1 нг/мл).

Применение GDNF частично нивелирует последствия гипоксии, сохраняются основные хабы сети, их количество (до гипоксии $9,84\pm1,31$, на третий день постгипоксического периода $8,39\pm1,62$), и число связей составляющих хаб (до

гипоксии $11,92 \pm 1,81$, на третий день постгипоксического периода $11,71 \pm 1,11$), однако также происходит некоторое смещение значимости отдельных электродов (процент перекрывания $63,76 \pm 5,58\%$, рис.9) и уменьшение среднего числа связей на электродах (до гипоксии $7,33 \pm 0,45$, на третий день постгипоксического периода $5,64 \pm 0,27$).

В интактной культуре в течение трехдневного развития наблюдаются изменения, связанные только со смещением значимости отдельных электродов (рис. 10), процент перекрывания – $80,56 \pm 3,6\%$. Остальные параметры, такие как количества связей на активных электродах ($7,46 \pm 0,32$ и $8,09 \pm 0,24$ до и через 3 дня соответственно), количество хаббов (до $10,5 \pm 0,61$ и $10,25 \pm 0,91$ через 3 дня) и среднее число связей в хабе ($13 \pm 3,66$ до и $12,61 \pm 2,17$ через 3 дня) значимо не изменяются.

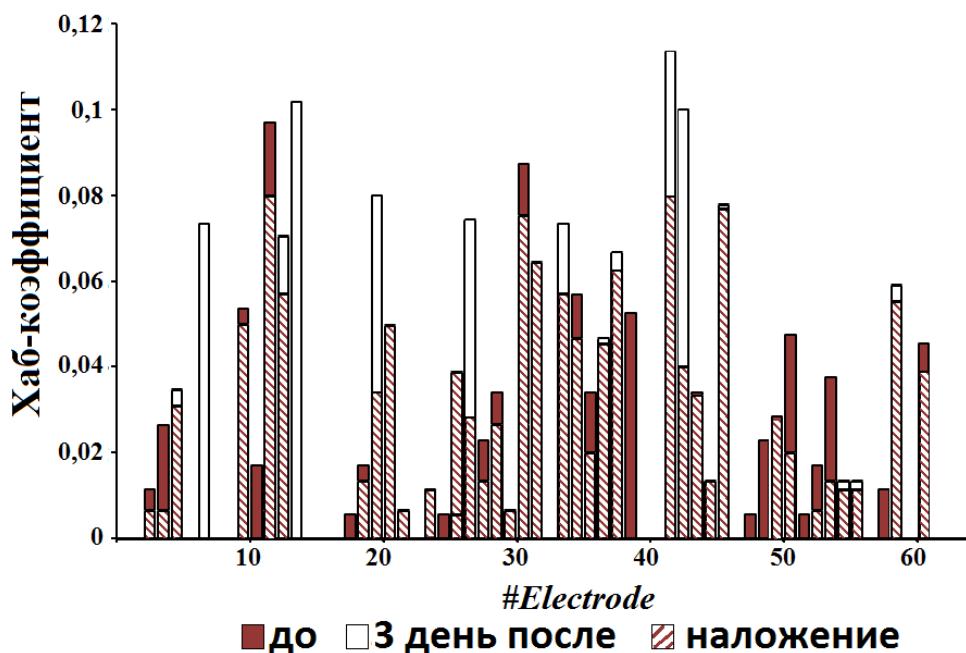


Рисунок 10. Хаб-коэффициент. Изменение значимости отдельных электродов интактной группы в течение 3 дневного развития (14 – 17 DIV).

Таким образом, кратковременная нормобарическая гипоксия и глюкозная депривация приводит к угнетению спонтанной биоэлектрической активности, нарушению и упрощению внутренней структуры сети. Применение GDNF стабилизирует данные показатели, способствуя поддержанию биоэлектрической активности нейронной сети на определенном функциональном уровне.

Влияние GDNF на возможность восстановления спонтанной биоэлектрической активности первичных культур гиппокампа. Особый интерес представляет исследование влияния GDNF на возможность восстановления спонтанной биоэлектрической активности нейронных сетей гиппокампа в отдаленном постгипоксическом периоде, когда уже погибла значительная часть клеток культуры и внутреннего потенциала сети не достаточно, чтобы запустить спонтанную репарацию активность.

Для изучения влияния GDNF на возможность частичного восстановления функциональной активности нейронных сетей на 14 день развития *in vitro* проводилось моделирование нормобарической гипоксии, на 3 день постгипоксического периода исследовались основные показатели спонтанной биоэлектрической активности – данный уровень был принят за исходный. В

экспериментальную группу с 3 дня после моделирования гипоксии ежедневно (в течение 12 дней), в одно и тоже время, добавлялся глиальный нейротрофический фактор (1 нг/мл) (рис. 11).

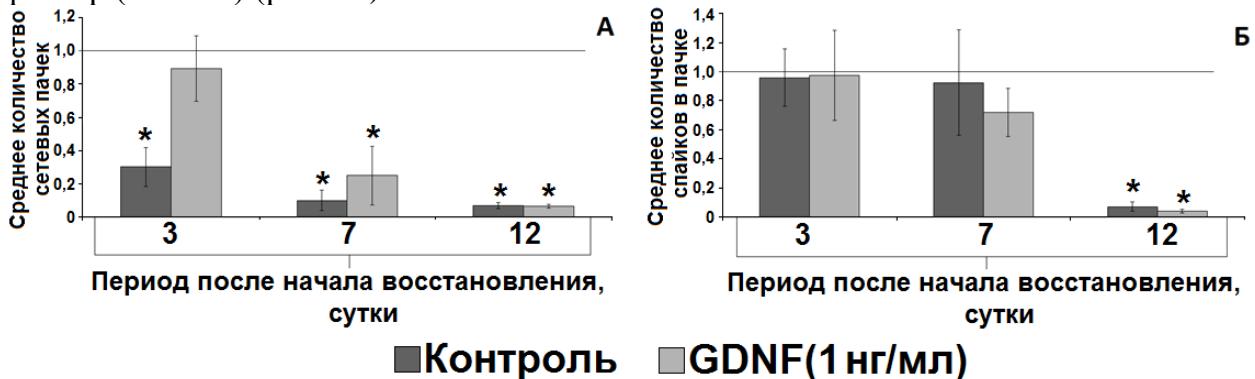


Рисунок 11. Изменение спонтанной биоэлектрической активности первичных культур клеток гиппокампа в течение 12 суток после начала введения GDNF (1 нг/мл). А - количество малых сетевых пачек, Б - среднее количество спайков в пачке. * - статистически значимое отличие с исходным уровнем (3 сутки после гипоксии), $p < 0,05$ (ANOVA)

Выявлено, что GDNF не оказывает влияния на способность восстановления спонтанной биоэлектрической активности первичных культур гиппокампа в отдаленном постгипоксическом периоде (рис. 11). Не было выявлено статистически значимых различий при применении GDNF в концентрации 1 нг/мл по сравнению с контрольной группой к 12 дню после начала восстановления.

Влияние GDNF на экспрессию мРНК GluR2 при моделировании гипоксии. Для выявления возможных молекулярных механизмов реализации антигипоксического действия GDNF проводилась оценка уровня экспрессии мРНК GluR2-субъединицы AMPA с помощью метода приживенной детекции РНК-зондов (рис. 12).

Как известно, одним из основных повреждающих факторов при гипоксии/ишемии является глутаматная эксайтотоксичность. Гиперстимуляция глутаматных рецепторов во время реперфузии ведет к неконтролируемому поступлению ионов кальция в цитоплазму клеток. Кальций является важнейшим вторичным мессенджером, регулирующим многие клеточные процессы, однако его избыток приводит к развитию патологических реакций, за счет активации кальций зависимых белков, а также запуску работы каспаз (Туровская с соавт., 2012).

Ранее считалось, что вклад в развитие эксайтотоксичности вносят лишь NMDA рецепторы, но позднее выяснилось, что и AMPA-рецепторы способны регулировать кальциевую проницаемость и запускать нейротоксические эффекты в условиях стресса. Об этом стало известно с появлением так называемой «GluR2 гипотезы» селективной гибели нейронов после ишемии. Известно, что AMPA-рецепторы тетромерны, при этом GluR2-субъединица определяет непроницаемость канала для ионов кальция. При этом существуют сведения о том, что церебральная ишемия снижает уровень мРНК GluR2, что соответственно ведет к сборке новых проницаемых для кальция AMPA-рецепторов, массовому входу кальция в клетку и проявлению токсических эффектов (Щербак с соавт., 2015; Peng et al., 2006).

В связи с этим, нами было проведено исследование влияния GDNF на экспрессию мРНК GluR2-субъединицы AMPA при моделировании гипоксии.

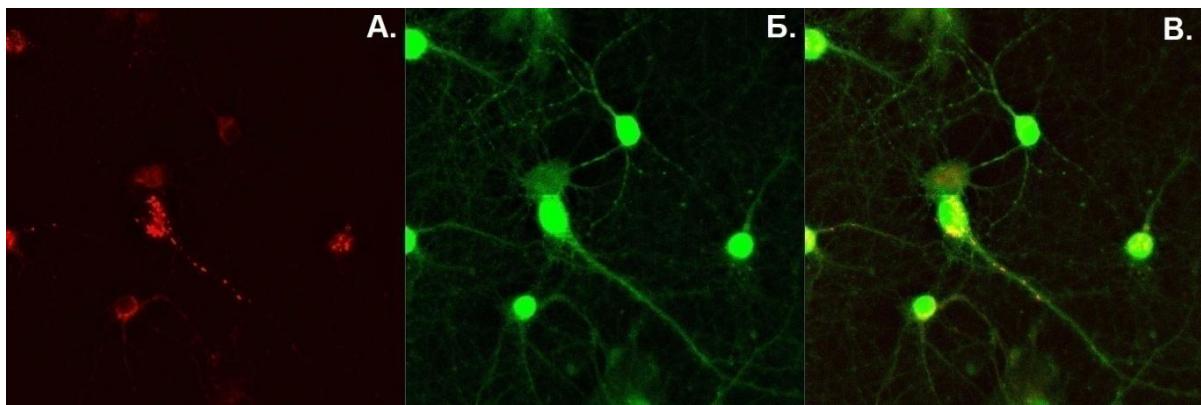


Рисунок 12. Пример первичной культуры клеток гиппокампа с экспрессией мРНК GluR2. А-клетки окрашенные Oregon Green, Б- мРНК GluR2-позитивные клетки, В-наложение двух каналов.

Показано, что в нормальных условиях GDNF (1 нг/мл) вызывает увеличение количества мРНК GluR2-положительных клеток в диссоциированной культуре гиппокампа (в 1,3 раза). Гипоксия достоверно снижает количество экспрессирующих мРНК GluR2 клеток более чем в 1,8 раза. Превентивное введение GDNF (1 нг/мл) способствует сохранению в культуре количества клеток, экспрессирующих мРНК GluR2 (рис. 13).

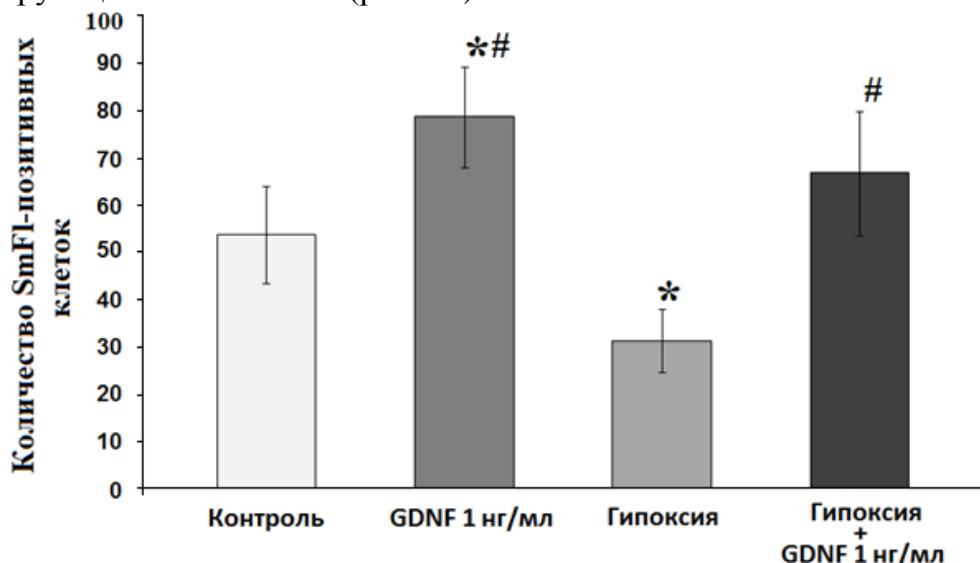


Рисунок 13. Количество мРНК GluR2-позитивных клеток. * - достоверность различий с контрольной группой, $p < 0,05$ (ANOVA), # - достоверность различия с гипоксией, $p < 0,05$ (ANOVA)

Таким образом, полученные результаты, вероятно, можно рассматривать как один из возможных, ранее не описанных, механизмов реализации защитного действия GDNF в условиях гипоксического воздействия.

Для подтверждения данных, полученных *in vitro*, в дальнейшем были проведены исследования *in vivo*.

Влияние GDNF на выживаемость животных в условиях действия острой гипобарической гипоксии *in vivo*. Проведенные исследования *in vivo* выявили, что превентивное интраназальное применение GDNF повышало резистентность животных к действию острой гипобарической гипоксии. Так в группе с применением низкой концентрации GDNF отмечена наибольшая устойчивость

животных к условиям острой нехватки кислорода. В этой группе зарегистрирован наибольший процент высокостойчивых животных и, как следствие, наибольшее время жизни на моделированной «высоте» (Тж: $8,1 \pm 0,72$ минут для контрольной группы, $8,8 \pm 0,55$ для группы с использованием реамберина, $9,2 \pm 0,32$ -GDNF (4 мкг/кг), $8,36 \pm 0,65$ - GDNF(40 мкг/кг).) и выживаемость животных. Оценка такого показателя устойчивости животных к гипоксии, как время потери позы, показала его достоверное увеличение в группе с превентивной аппликацией GDNF в концентрации 40 мкг/кг (рис. 14).

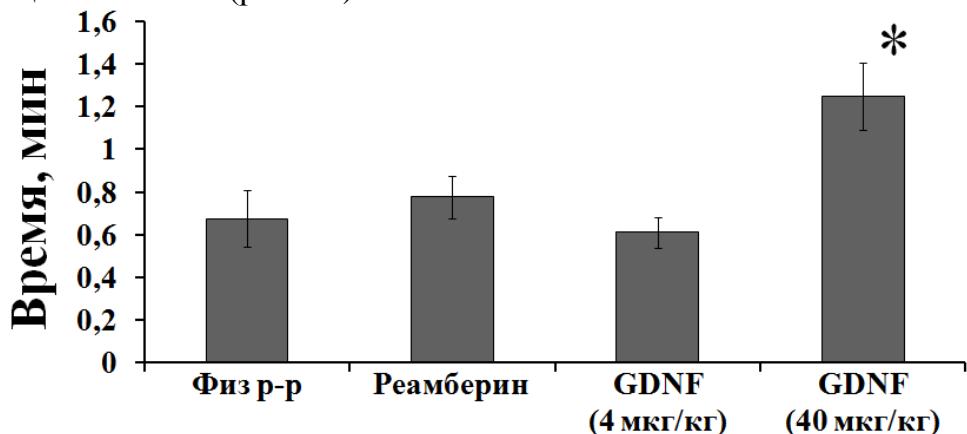


Рисунок 14. Время потери позы при моделировании острой гипобарической гипоксии. * -достоверность различий с контрольной группой, $p < 0,05$ (ANOVA).

При оценке времени восстановления позы не было выявлено достоверных различий ни по отношению к контрольной группе, ни к группе с применением антигипоксанта – Реамберина. Также не обнаружено достоверных различий между группами и при оценке отсроченного коэффициента сохранения долговременной памяти ($27,84\% \pm 3,87$ для интактной группы, $25,8\% \pm 4,09$ – контрольная группа, $29,98\% \pm 3,91$ – группа сравнения, $30,1\% \pm 2,48$ - GDNF (4 мкг/кг), $32,09\% \pm 3,23$ - GDNF(40 мкг/кг)). Отсроченный коэффициент сохранения долговременной памяти (oKc) – доля времени пребывания мыши в квадранте, где находилась платформа, по отношению в общему времени пребывания мыши в водном лабиринте Морриса. При этом считается нормой, если животное провело в квадранте, где находилась платформа, около 23-27% общего времени пребывания в лабиринте (D’Hooge, DeDeyn, 2001).

Кроме отсроченного коэффициента долговременной памяти, была оценена стратегия поиска платформы во время контрольного заплыва. Выделяют 4 основных типа стратегии поиска цели: 1) Прямое достижение цели (время трека составляло 3-10 с). 2) Активный поиск (10-20 с). 3) (более 20 с). 4) Отрицательный результат – животное не достигало цели и не выражало явных попыток поиска (Ведунова с соавт., 2014).

Согласно полученным данным, отрицательные результаты поиска цели присутствовали только в контрольной группе. Доля прямого достижения цели, активного и хаотического поиска была практически одинаковой и составляла в контрольной группе 20-30%. Основной стратегией опытной группы с превентивным введением GDNF (4 мкг/кг) был хаотический тип поиска цели, составляющий 50%. Группа GDNF (40 мкг/кг) предпочитала прямое достижение цели (41,6%). Наибольший процент стратегии прямого достижения цели

демонстрировали животные в интактной группе и группе сравнения (60-70%) (рис. 15).

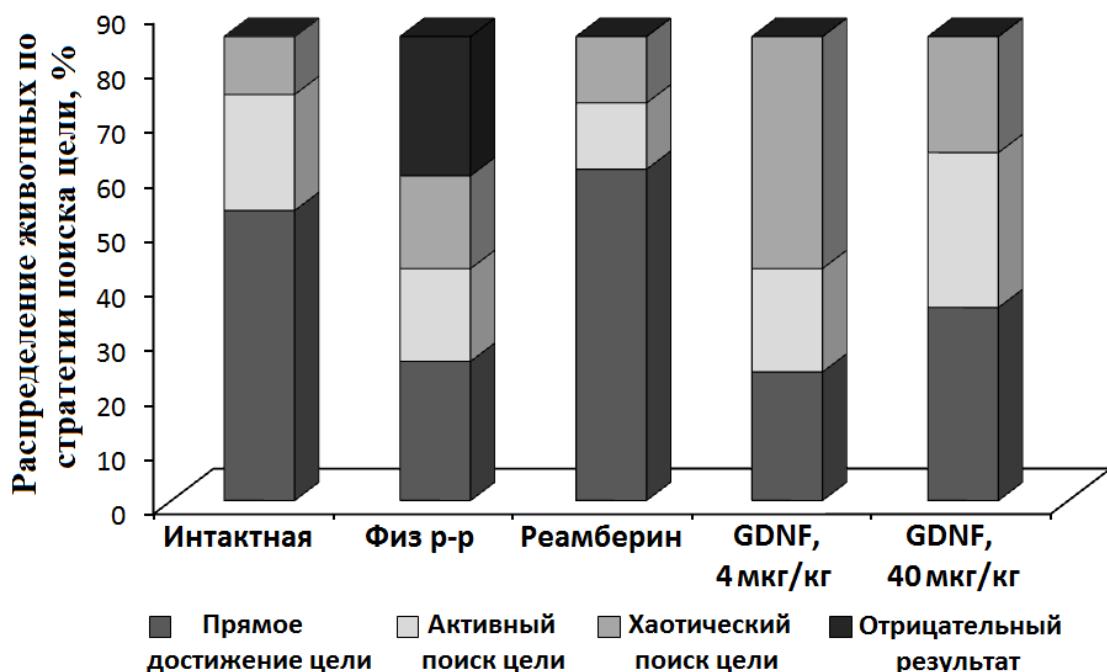


Рисунок 15. Распределение животных согласно стратегии поиска цели после моделирования острой гипобарической гипоксии

Таким образом, было показано, что интраназальное применение GDNF повышает устойчивость животных к действию острой гипобарической гипоксии и способствует частичному сохранению их мnestических функций в постгипоксическом периоде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное исследование нейропротекторного и антигипоксического действия глиального нейротрофического фактора при моделировании факторов ишемии.

Показано, что глиальный нейротрофический фактор не оказывает влияние на изменение показателей спонтанной биоэлектрической активности при его аппликации в культуральную среду в нормоксических условиях. При проведении исследования антигипоксического и нейропротекторного действия глиального нейротрофического фактора установлено, что превентивная аппликация GDNF способствовала поддержанию жизнеспособности клеток и сохранению биоэлектрической активности нейронных сетей в условиях острой кислородной и субстратной недостаточности. Однако GDNF не способен стимулировать спонтанное восстановление функциональной активности при его хронической аппликации в культуральную среду в отдаленном постгипоксическом периоде.

Впервые, с целью раскрытия возможных молекулярных механизмов, проведена оценка влияния GDNF на экспрессию одной из ключевых субъединиц AMPA-рецептора, как в условиях нормы, так и при действии острой гипоксии. Выявлена способность GDNF стимулировать экспрессию GluR2-субъединицы AMPA-рецептора в норме и поддерживать ее синтез в условиях острой кислородной недостаточности.

Антигипоксическое действие GDNF было подтверждено и в исследованиях *in vivo*. Выявлено, что интраназальное применение глиального нейротрофического фактора в концентрациях 4 и 40 мкг/кг повышает резистентность животных к действию острой гипобарической гипоксии, способствует сохранению пространственной памяти в постгипоксическом периоде.

Полученные в рамках данной работы результаты указывают на перспективу исследования данного нейротрофического фактора в качестве эффективного корректора ишемического повреждения.

ВЫВОДЫ

1. GDNF (1 нг/мл) не оказывает влияния на показатели спонтанной биоэлектрической активности нейронных сетей первичных культур гиппокампа при его аппликации в условиях нормоксии.

2. Выявлено нейропротекторное, в частности, антигипоксическое действие GDNF, проявляющееся в сохранении функциональной биоэлектрической активности нейронных сетей первичных культур клеток гиппокампа непосредственно в момент воздействия стресс-факторов.

3. Нейропротекторные эффекты превентивного введения GDNF (1 нг/мл) в отдаленном постгипоксическом периоде связаны с поддержанием жизнеспособности клеток первичной культуры гиппокампа, а также с сохранением основных показателей спонтанной биоэлектрической активности нейронных сетей при моделировании гипоксии и глюкозной депривации *in vitro*.

4. Применение GDNF в отдаленном постгипоксическом периоде не приводит к спонтанной репарации функциональной активности нейронных сетей первичных культур гиппокампа.

5. Превентивная аппликация GDNF (1 нг/мл) способствует сохранению количества клеток в культуре, экспрессирующих мРНК GluR2-субъединицы AMPA-рецепторов, при моделировании острой гипоксии.

6. Интраназальное введение GDNF (4 и 40 мкг/кг) повышает устойчивость животных к действию острой гипобарической гипоксии *in vivo*, и способствует сохранению двигательной и исследовательской активности в постгипоксический период.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в журналах рекомендованных ВАК РФ

1. Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Митрошина Е.В., **Шишкина Т.В.**, Астраханова Т.А., Мухина И.В. Антигипоксические и нейропротективные свойства нейротрофических факторов BDNF и GDNF при гипоксии *in vitro* и *in vivo* // Современные технологии в медицине. – 2014. – №4. – С. 38–47.

2. **Шишкина Т.В.**, Ведунова М.В., Мищенко Т.А., Мухина И.В. Роль глиального нейротрофического фактора в функционировании нервной системы // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7. – №4. – С. 211–220.

3. Ведунова М.В., **Шишкина Т.В.**, Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Астраханова Т.А., Пимашкин А.С., Мухина И.В. Нейропротективное и антигипоксическое действие глиального нейротрофического фактора (GDNF) при моделировании гипоксии в культурах диссоциированных клеток гиппокампа // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. – №1. – С. 33–39.

4. Митрошина Е.В., Абогессименгане Б.Ж., Уразов М.Д., Хамрауй И., Мищенко Т.А., Астраханова Т.А., Щелчкова Н.А., Лапшин Р.Д., Шишкина Т.В.,

Белоусова И.И., Мухина И.В., Ведунова М.В. Адаптационная роль глиального нейротрофического фактора при ишемии головного мозга (принята в печать в журнал Современные технологии в медицине в 1 номер 2017 года).

Патент

1. Ведунова М.В., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., **Шишкина Т.В.**, Мухина И.В. Способ частичного восстановления функциональной активности нейронных сетей *in vitro* в условиях их значительного повреждения. Патент на изобретение №2594065. Приоритет изобретения 1.07.2015.

Тезисы докладов конференций

1. **Шишкина Т.В.**, Ведунова М.В., Мухина И.В. Влияние глиального нейротрофического фактора на жизнеспособность и спонтанную биолектрическую активность нейронов гиппокампа при моделировании гипоксии *in vitro* // Сборник тезисов докладов Всероссийской молодежной конференции-школы «Нейробиология интегративных функций мозга». – 2013. – С. 71–72.

2. Сахарнова Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., **Шишкина Т.В.**, Мухина И.В. Влияние нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на восстановление функциональной нейросетевой активности первичных диссоциированных культур гиппокампа после гибели части нейронов // Материалы IV международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». – 2014. – С.128–131.

3. **Шишкина Т.В.**, Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Мухина И.В. Антигипоксическое и нейротропное действие глиального нейротрофического фактора (GDNF) при моделировании гипоксии // Материалы VI Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине». – 2014. – С. 432.

4. **Shishkina T.V.**, Vedunova M.V., Sakharnova T.A., Mukhina I.V. Antihypoxic and neuroprotective properties of Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) during acute hypoxia // International Scientific School «Frontiers in modern neuroscience». – 2014. – P. 36–37.

5. Vedunova M.V., Sakharnova T.A., Mitroshina E.V., **Shishkina T.V.**, Mukhina I.V. Neurotrophic factors (BDNF, GDNF) modify the functional neural activity and synthesis of the protein p50 during hypoxia *in vitro* // 9th FENS Forum of Neuroscience. – 2014. – Abstract number: FENS-2921.

6. Сахарнова Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., **Шишкина Т.В.**, Мухина И.В. Антигипоксические свойства нейротрофических факторов (BDNF, GDNF) при моделировании острой гипоксии *in vivo* и *in vitro* // Первый всероссийский симпозиум «Новейшие методы клеточных технологий в медицине». – 2014. – С. 79.

7. **Шишкина Т.В.**, Ведунова М.В., Сахарнова, Мухина И.В. Исследование антигипоксического и нейротропного действия глиального нейротрофического фактора (GDNF) при моделировании гипоксии // Сборник тезисов 67-й областной ежегодной студенческой научной конференция «Биосистемы: Организация, Поведение, Управление». – 2014. – С. 37-38.

8. Vedunova M., Mishchenko T., Mitroshina E., **Shishkina T.**, Astrakhanova T., Mukhina I. Antihypoxic properties of Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the acute normobaric hypoxia *in vitro* // Proceedings of 12th European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease Location. Тезисы опубликованы в журнале: Glia. – 2015. – Vol. 63. – Supplement: 1. – P: E264 Meeting Abstract: T09-08B

9. Mishchenko T., Vedunova M., Mitroshina E., **Shishkina T.**, Astrakhanova T., Babaev A., Mukhina I. The role of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in antihypoxic and reparative mechanisms in neural networks during acute hypoxia *in vitro* // Proceedings of World conference on regenerative medicine. PP-205. Тезисы опубликованы в журнале: Regenerative Medicine. – 2015. – Vol. 10 (07S). – PP-205.
10. Vedunova M.V., Sakharnova T.A., Mitroshina E.V., Babaev A.A., **Shishkina T.V.**, Shelchkova N.A., Mukhina I.V. Interactions between signaling mechanisms of neurotrophic factors BDNF and GDNF during normobaric hypoxia *in vitro* // Proceedings of 11-th Gottingen Meeting of the German Neuroscience Society. – T12-5B. – P. 594.
11. **Шишкина Т.В.**, Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Мухина И.В. Исследование нейропротекторного действия глиального нейротрофического фактора (GDNF) при моделировании гипоксии *in vitro* // Материалы 68-й областной ежегодной студенческой научной конференции «Биосистемы: Организация, Поведение, Управление». – 2015. – С. 37 – 38.
12. Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., **Шишкина Т.В.**, Мухина И.В. Изучение роли тирозинкиназного рецептора В типа (TrkB) в функционировании нейронных сетей культур клеток гиппокампа в процессе нейрогенеза и при моделировании гипоксии *in vitro* // Материалы международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». – 2015. – С.117 – 121.
13. Ведунова М.В., Митрошина Е.В., **Шишкина Т.В.**, Мищенко Т.А., Астраханова Т.А., Бабаев А.А., Мухина И.В. Исследование влияния GDNF на уровень экспрессии мРНК GluR2 при моделировании нормобарической гипоксии *in vitro* // Материалы международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». – 2015. – С.117–121.
14. Щелчкова Н.А., Ведунова М.В., Мищенко Т.А., Гладков А.А., **Шишкина Т.В.**, Мухина И.В. Изучение содержания нейротрофинов при моделировании острой гипобарической гипоксии у мышей // Материалы международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». – 2015. – С. 722–726.
15. Ведунова М.В., Мищенко Т.А., **Шишкина Т.В.**, Митрошина Е.В., Мухина И.В. Исследование молекулярных механизмов нейропротективного действия нейротрофических факторов BDNF И GDNF // Материалы V съезда биофизиков России. – 2015. – С. 348.
16. Мищенко Т.А., Ведунова М.В., **Шишкина Т.В.**, Митрошина Е.В., Мухина И.В. Изучение роли нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) в антигипоксических и репаративных механизмах нейронных сетей при остром гипоксическом воздействии // Материалы V съезда биофизиков России. – 2015. – С. 364.
17. **Шишкина Т.В.**, Ведунова М.В., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Мухина И.В. Изучение роли GDNF в формировании устойчивости нейронных сетей к острой гипоксии в модели *in vitro* // Материалы V съезда биофизиков России. – 2015. – С. 381.
18. Ведунова М.В., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., **Шишкина Т.В.**, Астраханова Т.А., Бабаев А.А., Мухина И.В. Изучение некоторых молекулярных механизмов нейропротекторного действия глиального нейротрофического фактора (GDNF) при моделировании гипоксии *in vitro* // Материалы Всероссийской конференции «Современная нейробиология: достижения, закономерности, проблемы, инновации, технологии». – 2015. – С. 134–139.

19. M. Vedunova , T. Mishchenko ,**T. Shishkina**, E. Mitroshina, A. Pimashkin, V. Kazantsev, I. Mukhina The role of GDNF in synaptic plasticity of neural network during hypoxia modeling in vitro // Proceedings of the eleventh world congress on brain injury. – 2016. – Abstract number 0295.
20. **Shishkina T.**, Vedunova M., Mishchenko T., Mitroshina E., Babaev A., Pimashkin A., Kazantsev V., Mukhina I. GDNF influence on the functional neural networks reorganization in the ischemic factors modeling in vitro // Proceedings of 9th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair. – 2016. – Abstract number P II – 2-25 G.
21. **Шишкина Т.В.**, Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Астраханова Т.А., Мухина И.В., Ведунова М.В. Изучение влияния GDNF на сохранение структурного и функционального состояния нейронных сетей в условиях острой гипоксии // Материалы 20-й международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология - Наука XXI века». – 2016. – С.297.
22. **Шишкина Т.В.**, Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Астраханова Т.А., Мухина И.В., Ведунова М.В. Изучение антигипоксических и нейропротекторных свойств GDNF, а также возможных молекулярных механизмов их реализации // Материалы 69-й областной ежегодной студенческой научной конференции «Биосистемы: Организация, Поведение, Управление». – 2016. – С.175.
23. Vedunova Maria, Mishchenko Tatiana, **Shishkina Tatiana**, Mitroshina Elena, Shirokova Olesya, Pimashkin Alexei, Kastalskiy Innokentiy, Kazantsev Victor. Glial cell line-derived neurotrophic factor as a new approach for functional neural networks reorganization in oxygen stress conditions // Proceedings of 10th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays (MEA Meeting 2016). – 2016. P. 1.
24. **T.V. Shishkina**, T.A. Mishchenko, E.V. Mitroshina, I.V. Mukhina, V.B. Kazantsev, M.V. Vedunova GDNF Influence on the Morpho-Structural Integrity of Hippocampal Neural Network in Hypoxia Modeling In Vitro // Volga Neuroscience Meeting. Тезисы опубликованы в журнале: Opera medica et physiologica – 2016. – P. 112–113.
25. **T.V. Shishkina**, T.A. Mischenko, E.V. Mitroshina, M.V. Vedunova, I.V. Mukhina Neuroprotective and antihypoxic properties of Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in hypoxia modeling in vitro // Материалы международной конференции "Frontiers in biomedicine". Тезисы опубликованы в журнале: Opera medica et physiologica. – 2015. – Suppl.issue 1. – P. 20–21.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ГД – глюкозная депривация
 мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
 ОГБГ – острая гипобарическая гипоксия
 оКс - отсроченный коэффициент сохранения долговременной памяти
 AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) – α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота
 GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) – глиальный нейротрофический фактор
 MED и MEA – мультиэлектродные системы регистрации внеклеточных потенциалов действия
 NMDA - N-метил-D-аспартат