

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
Профессор
доктор медицинских наук
Самойлов М.О.

Санкт-Петербург

2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ	4
1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Гипоксия мозга: феноменология и базисные механизмы.....	14
1.2. Гипоксическое preconditionирование – эффективный способ повышения толерантности мозга к гипоксии	18
1.2.1. Режимы preconditionирования.....	18
1.2.2. Виды preconditionирования.....	19
1.2.3. Гипоксическое preconditionирование.....	20
1.3. Молекулярно-клеточные механизмы формирования толерантности мозга, активируемые гипоксическим preconditionированием	22
1.3.1. Роль внутриклеточных сигнальных каскадов	23
1.3.2. Отсроченные геном-зависимые механизмы.....	25
1.4. Роль транскрипционных факторов – ключевых регуляторов экспрессии генома клеток – в развитии фазы экспрессии толерантности	25
1.4.1. Структура, классификация и регуляция транскрипционных факторов	25
1.4.2. Индуцибельные ТФ.....	27
1.4.3. Активационные транскрипционные факторы: pCREB и семейство NF- κ B	28
1.4.3.1. CREB.....	28
1.4.3.2. NF- κ B.....	34
1.4.4. Лиганд-зависимые транскрипционные факторы - глюко- и минералокортикоидные рецепторы.....	39
5.1. Про-адаптивные белки BDNF и Bcl-2.....	46
5.1.1 Нейротрофический фактор BDNF	46
5.1.2 Анти-апоптотический фактор Bcl-2	49
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	53
2.1. Модель гипобарической гипоксии	53
2.1.1. Режим тяжелой повреждающей гипоксии	53
2.1.2. Режим preconditionирования	54
2.2. Гистологическая обработка ткани и изготовление парафиновых срезов мозга.	55
2.3. Гистологические методы исследования.....	56
2.3.1 Окраска по методу Ниссля	56
2.3.2 Иммуноцитохимический метод	57
2.4. Количественная обработка результатов иммуноцитохимических исследований с использованием системы компьютерного анализа изображения.	58
2.5. Методы математической статистики.	59

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	61
3.1 Морфологические исследования.....	61
3.2. Иммуноцитохимические исследования.....	65
3.2.1. Влияние различных режимов гипобарической гипоксии на уровень экспрессии активационных ТФ рCREB и NF-κappaB.....	65
3.2.1.1. Влияние ТГ на уровень экспрессии рCREB в нейронах неокортекса и гиппокампа неПК-, однократно или трехкратно ПК-крыс.	65
3.2.1.2. Особенности экспрессии рCREB при действии одного или трех сеансов УГГ	69
3.2.1.3. Влияние ТГ на уровень экспрессии субъединиц ТФ NF-κappaB p65 и c-Rel в нейронах неокортекса и гиппокампа неПК-, однократно или трехкратно ПК-крыс.....	73
3.2.1.4. Особенности экспрессии субъединиц ТФ NF-κappaB p65 и c-Rel при действии одного или трех сеансов УГГ	78
3.2.2. Лиганд-зависимые ТФ ГР и МР	85
3.2.2.1. Влияние ТГ на уровень экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в нейронах неокортекса и гиппокампа неПК-, однократно или трехкратно ПК-крыс.....	85
3.2.2.2. Особенности экспрессии глюкокортикоидных рецепторов при действии одного или трех сеансов УГГ	89
3.2.2.3. Влияние ТГ на уровень экспрессии минералокортикоидных рецепторов в нейронах неокортекса и гиппокампа неПК-, однократно или трехкратно ПК-крыс.....	92
3.2.2.4. Особенности экспрессии минералокортикоидных рецепторов при действии одного или трех сеансов УГГ	97
3.2.3. Про-адаптивные белки Bcl-2 и BDNF.....	102
3.2.3.1. Влияние ТГ на уровень экспрессии BDNF в нейронах неокортекса и гиппокампа неПК-, одно- или трехкратно ПК-крыс	102
3.2.3.2. Особенности экспрессии BDNF при действии одного или трех сеансов УГГ	106
3.2.3.3. Влияние ТГ на уровень экспрессии Bcl-2 в нейронах неокортекса и гиппокампа неПК-, одно или трехкратно ПК-крыс	110
3.2.3.4. Особенности экспрессии Bcl-2 при действии одного или трех сеансов УГГ	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	119
ВЫВОДЫ.....	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124

ВВЕДЕНИЕ

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 прекодиционирования (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 вышеперечисленных

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-адренокортикальной системы (ГТАС). 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; Nakajima et al., 2002; 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 preconditionирующего 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-kappaB 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-kappaB 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 Bcl-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 Bcl-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 Bcl-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 нивелирует 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 ТГ не предотвращает подавление экспрессии МР. А трехкратное ПК ТГ нивелирует снижение уровня МР на фоне увеличения содержания ГР в зубчатой

извилине гиппокампа, 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.

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» (Терск, 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).

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 СА1 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 прекодиционирующие 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 ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВРС – внутриклеточные регуляторные системы

ГГАС – гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система

ГР - глюкокортикоидные рецепторы

ДНК - Дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСД - ДНК-связывающий домен

ЛПС - липополисахариды

МР - минералокортикоидные рецепторы

ПК – прекондиционирование

СОД – супероксиддисмутаза

ТГ – тяжелая гипоксия

ТФ – транскрипционный фактор

УГГ – умеренная гипобарическая гипоксия

цАМФ и цГМФ – циклические аденозин- и гуанозинмонофосфаты

ЦНС – центральная нервная система

Akt - протеинкиназа B

AMPA - α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота

Bcl-2 - B-cell lymphoma 2, антиапоптотический фактор

BDNF – brain-derived neurotrophic factor, нейротрофический фактор мозга

CRE – cAMP response element, участки ДНК, регулируемые цАМФ

CREB – cAMP response element binding protein, белок, присоединяющийся к цАМФ-регулируемому участку

ERK – extracellular signal-regulated kinase, протеинкиназы, регулируемые внеклеточными сигналами

HIF-1 α – hypoxia-inducible factor-1 α , гипоксия-индуцибельный фактор 1 α

IKK - I κ B kinase, киназа I κ B

JNK - NH₂-terminal Jun kinase, киназа N-концевого фрагмента Jun

MAPK - mitogen activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа

MEK - MAPK extracellular signal-regulated kinase, сигнал-регулируемая киназа MAPK

NF-каппаВ – nuclear factor kappa B, ядерный фактор B

NMDA - N-methyl-D-aspartate, N-метил-D-аспартат

PKA, PKC – protein kinases, протеинкиназы A, C

TNF α - tumor necrosis factor alpha, фактор некроза опухоли

Trx - thioredoxin, тиоредоксин.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Гипоксия мозга: феноменология и базисные механизмы

Гипоксия (др.-греч. ὑπό — под, внизу и лат. oxygenium — кислород) — состояние кислородного голодания как всего организма в целом, так и отдельных органов и тканей, обусловленное тем, что поступление кислорода к тканям или способность тканей использовать кислород оказывается ниже, чем их потребность в нём. Организм может оказаться в состоянии гипоксии в условиях высокогорья, при полетах на самолетах, при нырянии на различную глубину (временное прекращение или ослабление легочной вентиляции), при закупорке (эмболии) кровеносных сосудов, при различного рода анемиях и т.д.

По механизму возникновения выделяют следующие виды гипоксии (классификация, предложенная Siesjö в 1978 г):

1. Гипоксическая гипоксия (гипоксемия). Основной признак - низкое напряжение кислорода в артериальной крови и, как следствие, недонасыщение кислородом гемоглобина и понижение содержания кислорода в артериальной крови.

2. Анемическая гипоксия (гемическая). Напряжение кислорода в артериальной крови нормальное при уменьшении (недостатке) гемоглобина.

3. Застойная гипоксия (циркуляторная) В артериальной крови имеется достаточное количество гемоглобина и нормальное напряжение кислорода, но количество поступающей в ткани крови не обеспечивает кислородный запрос.

4. Гистотоксическая гипоксия. Нарушена функция ферментов дыхательной цепи, в связи с чем поступающий к тканям кислород не может использоваться в процессах окисления.

Гипоксия является важным компонентом патогенеза многих заболеваний. Наиболее распространенными заболеваниями, связанными с гипоксическими состояниями, являются ишемическая болезнь сердца и инсульт головного мозга, который занимает третье место среди всех заболеваний после инфаркта миокарда и онкологических заболеваний. Примерно у 85% пациентов, перенесших инсульт, развивается ишемия головного мозга. Ишемия представляет собой частный случай циркуляторной гипоксии. Принципиальное различие между гипоксией и ишемией заключается в том, что при гипоксии сохраняются или значительно возрастают кровоток, снабжение ткани субстратами окисления и гликолиза и удаление продуктов метаболизма. Таким образом, при гипоксии снижение количества макроэргических фосфатов, ацидоз и другие нарушения метаболизма нарастают менее стремительно, чем при ишемии.

При ишемии головного мозга у пациентов нарушаются двигательные, чувствительные и зрительные рефлексы, а также может наблюдаться афазия и апатия. Кроме того, после ишемии могут возникать нейрофизиологические расстройства, например, снижение интеллектуальной способности и ухудшение памяти, апраксия (расстройство произвольных движений), ухудшение

пространственной ориентации (Bokura, Robinson, 1997), которые вместе с нарушениями со стороны двигательных и чувствительных рефлексов препятствуют возвращению пациента к нормальному образу жизни и замедляют процесс реабилитации. В экспериментах на животных показано, что гипоксия вызывает нарушения обучения и памяти, поведения животных, дисрегуляцию гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГТАС), а также структурные повреждения нейронов (Rybnikova et al., 2005; Рыбникова и др., 2004, 2006).

Гипоксия/ишемия головного мозга может развиваться не только в результате инсульта, но и вследствие других повреждающих воздействий, в частности, остановки сердца, эмболии сосудов головного мозга или ярко выраженной гипотонии, особенно во время хирургических операций и т.д. Кроме того, гипоксия мозга может возникать в результате действия внешних повреждающих факторов, например гипобарической гипоксии или при дыхании гипоксическими смесями.

Тяжелая повреждающая форма гипоксий мозга запускает каскад патофизиологических процессов, которые приводят к структурным и функциональным повреждениям нейронов и их гибели (Самойлов 1985, 1999; Siesjo, Wieloch, 1985; Федин, 2004). На начальных этапах развития гипоксии (при инициации ее механизмов) в нейронах мозга происходит увеличение восстановительных эквивалентов (H^+) и уменьшение концентрации связанного кальция (Самойлов 1985, 1999), а также ремоделирование регуляторной функции дыхательной цепи митохондрий (Лукьянова, 2011). В результате этих событий модифицируются синаптическая передача, метаболизм нейронов, возбудимость и ионная проницаемость плазматической мембраны (Самойлов, 1985; Peters, 1986; Siesjo, Bengtsson, 1989). Все эти процессы происходят на ранних этапах нарушения кислородного снабжения и, считается, что они могут носить адаптивный характер (Самойлов 1985; Peters, 1986; Siesjo, Bengtsson, 1989). При нарастании тяжести гипоксического фактора катастрофически уменьшается количество АТФ (аденозинтрифосфат), и клетка переходит на анаэробный гликолиз, который в нервной ткани недостаточно выражен (Siesjo, 1978). Увеличение концентрации лактата, продуцируемого в результате гликолиза, провоцирует внутриклеточный ацидоз. Прогрессирование ацидоза вызывает денатурацию некоторых белков и формирование в цитоплазме зерен, а адаптивные механизмы не справляются, в результате чего гипоксия принимает патологический характер. На этой стадии гипоксии в клетке формируется истинный дефицит АТФ, поскольку аэробный механизм не работает из-за кислородного дефицита, а анаэробный — из-за ацидоза (Федин, 2004). Дефицит АТФ приводит к инактивации калий-натриевой АТФазы и, как следствие, утрате калий-натриевого градиента: ионы калия выходят из клетки в межклеточное пространство по градиенту концентрации. Возникает частичная деполяризация плазматической мембраны клетки. При достижении определенного значения мембранного потенциала, открываются

потенциал-чувствительные кальциевые каналы, что приводит к увеличению концентрации внутриклеточного кальция (Thayer et al., 1986). При достижении определенной концентрации кальция внутри клетки, активируются кальций-зависимые калиевые каналы (Krnjević, Leblond, 1989), что приводит к быстрому току калия из клетки. При достижении порогового значения калия во внеклеточной среде 10-15 mM, возникает деполяризация, которая распространяется по мембране и, дойдя до пресинаптической мембраны, стимулирует выброс нейромедиаторов, прежде всего, глутамата (Hansen, 1985). Глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером центральной нервной системы (ЦНС), участвует в осуществлении когнитивных функций, но в высоких концентрациях является нейротоксином (Chuang et al., 1992; Schramm et al., 1990). Глутамат реализует свои эффекты через группу ионотропных мембранных рецепторов: NMDA (N-methyl-D-aspartate), AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate), и метаботропных рецепторов (Schramm et al., 1990; Ferraguti, Shigemoto, 2006; Семенов и др., 2012). Устойчивая активация NMDA-рецепторов вызывает ток ионов кальция в клетку через каналы, сопряженные с NMDA-рецепторами (Семенов и др., 2001; Semenov et al., 2002; Самойлов и др., 2001). Также во время выброса глутамата происходит активация метаботропных рецепторов, связанных с фосфолипазой C, что приводит к образованию инозитол-трифосфата, который, действуя на рецепторы на поверхности эндоплазматического ретикула, стимулирует выход кальция из эндоплазматического ретикула в цитозоль (Berridge, Irvine, 1984; Taylor, 1987). Увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция Ca^{2+} индуцирует открытие неселективной проводимости мембраны для других ионов: выходу из клетки ионов K^+ и входу в клетку ионов Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , связанной воды; также происходит уравнивание H^+ и HCO_3^- по разным сторонам мембраны (Hofmeier, Lux, 1981; Partridge, Swandulla, 1988). Чрезмерное накопление кальция внутри клетки вносит основной вклад в повреждения нейронов при ишемии/гипоксии (Choi, 1985, 1988; Kristian, Siesjo, 1988). Известно, что Ca^{2+} является активатором ряда ферментов. Таким образом, его избыточное накопление в цитозоле приводит к мощной активации таких ферментов, как, фосфолипазы, протеазы, эндонуклеазы и NO-синтаза, которые повреждают мембрану, ядро и другие клеточные органеллы (Choi, 1988; Siesjo, 1988; Kristian, Siesjo, 1988; Hartley et al., 1993; Sakamoto et al., 1986; Siesjo, Wieloch, 1985; Orrenius et al., 1988).

При ишемии/гипоксии усиливается генерация кислородных и нитро- свободных радикалов, которые также оказывают повреждающее действие на нейроны (Carbonell et al., 2007; Siesjo, 1988). В частности, вследствие повышения активности нейрональной NO-синтазы происходит увеличение уровня NO (Dawson et al., 1991), который вместе с супероксидом, выделяющимся из митохондрий, образуют пероксинитрит. Пероксинитрит в свою очередь приводит к повреждению ДНК, активации PARP (poly ADP-ribose polymerase) и

высвобождению из митохондрии факторов, индуцирующих апоптоз (Pacher et al., 2007; Yu et al., 2002). Процесс усугубляется снижением активности антиоксидантных систем (Siesjo, 1978; Строев, Самойлов 2006). Известно, что эндогенные антиоксидантные системы, такие как семейство тиоредоксинов Trx (thioredoxin) (Andoh et al., 2002), супероксиддисмутаза (СОД) Mn-СОД (Noshita et al., 2001) и Cu,Zn-СОД (Fujimura et al., 2000; Sugawara et al., 2002), реализуют свое нейропротективное действие, препятствуя высвобождению цитохрома С из митохондрий в цитозоль. Вместе с тем, после фокальной (Liu et al., 1993) и глобальной ишемии мозга (Kato et al., 1995) происходит подавление экспрессии Cu,Zn- и Mn-СОД. В парадигме гипобарической гипоксии наблюдается небольшое повышение экспрессии антиоксидантов Trx-1, 2, Cu,Zn- и Mn-СОД в коре и гиппокампе (Stroev et al., 2004a, b; Stroev et al., 2005); при этом снижается ферментативная активность Cu,Zn-СОД (Строев, Самойлов 2006).

Таким образом, ведущую роль в деструктивных процессах играют три фактора – нарушение внутриклеточного кальциевого гомеостаза, глутаматергической сигнальной трансдукции и гиперпродукция свободных радикалов (Kaplan et al., 1987; Siesjo, Bengtsson 1989; Choi, Rothman 1990; Самойлов, 1999). В подтверждение этого может служить тот факт, что при применении антагонистов глутамата, ингибиторов кальциевых каналов и антиоксидантов повреждения нейронов после ишемии/гипоксии уменьшаются (Hara et al., 1990a,b; LePeillet et al., 1992; van Rijen et al., 1991; Swan, Meldrum, 1990; Самойлов 1999). Все вместе, действие этих трех факторов неминуемо влечет за собой развитие апоптоза (McConkey et al., 1990; Самойлов 1999), что сопровождается ингибированием экспрессии нейротрофических факторов (Altman, 1992). В частности, уровень экспрессии NGF (nerve growth factor) и BDNF (brain derived neurotrophic factor) снижен после ишемии в нейронах гиппокампа (Lindvall et al., 1992; Takeda et al., 1993). При этом в большей степени апоптозу подвержены пирамидные нейроны области CA1 гиппокампа, тогда как гранулярные клетки зубчатой извилины остаются устойчивыми к повреждению (Beilharz, et al., 1995). Апоптотические изменения можно наблюдать в поле CA1 гиппокампа через 3-4 суток после полной ишемии (Nitatori et al., 1995), в нейронах гиппокампа и неокортекса крыс - через 3 суток после гипоксии (Рыбникова и др. 2004; Rybnikova et al., 2006).

Таким образом, ишемия/гипоксия вызывает тяжелые и часто необратимые структурные и функциональные нарушения нейронов мозга, что приводит к крайне неблагоприятным последствиям для перенесшего ишемию/гипоксию организма. Введение антиоксидантов или препаратов, стимулирующих экспрессию факторов роста, которые стабилизируют ионные градиенты, способно только в некоторой степени облегчить последствия гипоксии. Этого оказывается недостаточным для того, чтобы обеспечить комплексную нейропротекцию от гипоксии и ишемии во время острого инсульта, поскольку влияет только на какой-то отдельный

этап патологического каскада (Fisher, Ratan, 2003). Новые возможности по предотвращению повреждающего действия ишемии/гипоксии появились после открытия феномена ишемического/гипоксического прекондиционирования (Kitagawa et al., 1990; Kirino et al., 1991; Fisher, Ratan, 2003; Самойлов, 1999). Оказалось, что животные, подвергнутые нелетальным дозам ишемии/гипоксии более устойчивы к следующему за ней ряду повреждающих воздействий, включая ишемию мозга. Однако механизмы, с помощью которых указанные выше воздействия делают мозг более устойчивым к повреждающим факторам, до сих пор недостаточно изучены и являются предметом дальнейших исследований.

1.2. Гипоксическое прекондиционирование – эффективный способ повышения толерантности мозга к гипоксии

1.2.1. Режимы прекондиционирования

Известно, что различные организмы, пребывающие в экстремальных ситуациях, зачастую не погибают, а приобретают ту или иную степень резистентности к этим воздействиям. Это означает, что организм должен обладать механизмами, обеспечивающими приспособление к такого рода стрессорным воздействиям, что нашло подтверждение в работах многих исследователей, в том числе Г. Селье, Ф.З. Меерсона и др, занимавшихся изучением проблем адаптации.

Отечественными учёными Л.Х.Гаркави и Е.Б.Квакиной было показано, что применение мягких физиологических воздействий способно значительно повышать адаптационные возможности организма. Применение таких мягких воздействий вызывало быстрое и существенное повышение неспецифической резистентности организма за счет повышения активности его защитных систем (Гаркави, 1990; Гаркави, Квакина, 1995). Очевидно, эта реакция организма лежит в основе феномена прекондиционирования (ПК).

ПК представляет собой процедуру, в ходе которой на ткань или орган воздействуют стимулом с интенсивностью, очень близкой к пороговым значениям повреждения ткани, но все же немного ниже их. Сразу после ПК или через определенный промежуток времени орган (или ткань) формирует устойчивость (толерантность) к аналогичному или другой природы стимулу надпороговой интенсивности. ПК, таким образом, защищает ткань от последующего повреждения.

Впервые феномен ПК в 1986 г. С.Е. Murry et al., которые в своей работе описали преимущества коротких эпизодов ишемии (продолжительностью 5 мин) на миокард, а именно уменьшение размера инфаркта на 25% при последующей окклюзии коронарной артерии сердца собаки продолжительностью 40 мин (по сравнению с отсутствием предварительного проведения 5 минутной ишемии в группе контроля) (Murry et al., 1986). Для обозначения этого

феномена авторы предложили использовать термин «ишемическое ПК». Позднее было обнаружено, что явление ПК не ограничивается только кардиомиоцитами, а распространяется на другие ткани и органы. В частности, феномен ишемического ПК был показан и для нейронов мозга. Было установлено, что 2-минутная глобальная ишемия мозга предотвращает гибель многих нейронов в области СА1 гиппокампа, вызываемую последующей 5-минутной ишемией, у монгольских песчанок (Kirino, 1991; Kitagawa et al., 1990). Впоследствии протективный эффект ишемического ПК был также выявлен на скелетных мышцах (Carroll et al., 1997), эндотелии сосудов (Martou et al., 2006) и печени (Koti et al., 2003). Механизмы ишемического ПК головного мозга также интенсивно изучаются (Dawson VL, Dawson TM 2000; Dirnagl, Meisel, 2008; Kirino, 2002; Stenzel-Poore et al., 2007).

1.2.2. Виды прекондиционирования

Помимо ишемического ПК существует ряд других моделей ПК, которые могут защищать органы или ткани от ишемии и других повреждающих воздействий. К ним относятся гипертермия (Arieli et al., 2003) и гипотермия (физическое ПК), введение липополисахаридов (Rosenzweig et al., 2007), анестетиков (Clarkson, 2007) и некоторых токсических веществ (фармакологическое ПК). Первыми эффект гипертермического ПК исследовали Chopp et al. на крысах, подвергнутых действию глобальной ишемии (Chopp et al., 1989). Гипертермия также защищает новорожденных крыс от гипоксии/ишемии (Ikeda et al., 1999). Гипотермическое ПК описано на крысах в моделях фокальной кратковременной ишемии (Nishio et al., 1999). Степень нейропротекции зависит от температуры и длительности гипотермии, но не зависит от способа применения и размера задействованной области: по эффективности фокальное охлаждение сравнимо с охлаждением всего организма (Yunoki et al., 2002). Средние и умеренные температуры (34°C - 36°C, 34°C - 28°C), относительно безопасные для человека (Schwab et al., 1998), могут быть довольно эффективными и частично предотвращают повреждения мозга, вызванные ишемией. В ряде клинических испытаний был проверен эффект гипотермии в терапии травматических повреждений мозга (Clifton, Christensen, 1992; Marion et al., 1997). Было установлено, что умеренная гипотермия имеет тенденцию уменьшать повреждения мозга и может быть эффективной в лечении пациентов с серьезными травматическими повреждениями головы или перед хирургическим вмешательством с высоким риском ишемических случаев.

Еще одним известным способом ПК является ПК с помощью введения липополисахаридов (ЛПС). Небольшие дозы ЛПС обеспечивают ишемическую толерантность мозга. Это было показано в серии экспериментов, включая кратковременную и постоянную фокальные ишемии на крысах (Tasaki et al., 1997), а также на мышцах в модели кратковременной фокальной ишемии (Rosenzweig et al., 2007).

Уже давно известен и подробно изучен потенциальный протективный эффект анестезирующих средств от ишемического инсульта (Clarkson, et al., 2007; Wang et al., 2008). Наиболее часто используемым анестетиком в экспериментах по ишемической толерантности является изофлюран. Помимо изофлюрана, ишемическую толерантность также могут индуцировать ксенон (Ma et al., 2006), галотан (Karinya et al., 2002) и севофлюран (Payne et al., 2005).

Другой моделью является парадигма гипоксического инсульта у новорожденных крыс (Gidday et al., 1994). Предъявление новорожденным крысам газовой смеси, содержащей 8% кислорода, в течение 3 ч вызывает нейропротекцию от тяжелой ишемии/гипоксии (Gidday et al., 1994), а также от кратковременной и долговременной фокальной церебральной ишемии (Bernaudin et al., 2002b; Miller et al., 2001). Гипоксическое воздействие продолжительностью 1, 3 или 6 ч имеет аналогичный эффект, но если интервал между гипоксией и последующей ишемией превышает 72 ч, ишемическая толерантность не формируется (Bernaudin et al., 2002).

Некоторые из перечисленных способов ПК (гипотермия, фармакологическое ПК) являются довольно перспективными в плане их практического применения. Однако далеко не все виды ПК могут быть использованы в клинической практике. В частности, ишемическая модель головного мозга, выполненная на животных, служит хорошим прототипом ишемического инсульта у человека, и само ишемическое ПК является достаточно эффективным методом ПК. Однако перенести использование ишемического ПК на человека затруднительно вследствие травматичности и инвазивности данного подхода. Что касается ПК с помощью химических веществ, то многие из них являются токсинами, могут вызывать воспалительные, аллергические реакции и другие нежелательные побочные эффекты. К тому же многие из химических веществ действуют на какую-то отдельную реакцию патогенного ишемического каскада, как в случае ПК 3-гиптагеновой кислотой, ингибирующей окислительное фосфорилирование, и не способны обеспечить комплексную нейропротекцию. Имеющиеся недостатки рождают необходимость поиска нового неинвазивного метода, который смог бы обеспечить комплексную защиту нервных клеток от ишемии и других повреждающих воздействий, был удобен в применении и не имел существенных ограничений в применении у человека. Одним из методов, который удовлетворяет перечисленным требованиям, является гипоксическое ПК, в частности с помощью умеренной гипобарической гипоксии.

1.2.3. Гипоксическое прекондиционирование

Различные методы гипоксической адаптации/акклиматизации широко применяются в клинической и прикладной медицине в качестве немедикаментозного средства коррекции функционального состояния, повышения физиологических резервов, реабилитации и лечения.

По продолжительности и повторяемости гипоксических экспозиций методы адаптации к

гипоксии условно можно разделить на две основные группы: стационарные (пребывание в горах, нахождение в барокамере, непрерывное дыхание гипоксическими смесями на земле) и интервальные или импульсные (кратковременные повторяющиеся гипоксические воздействия).

Методы долговременной адаптации и акклиматизации изучаются уже давно. Первые научно обоснованные предположения о возможном благоприятном действии гипоксической гипоксии на организм были сделаны еще во второй половине XIX века П. Бером. Также в работах Г.Е.Владимирова, Н.Н.Сиротинина, Е.М.Крепса было показано, что предъявление умеренного гипобарического воздействия повышает устойчивость организма, а также отдельных органов, тканей и клеток к последующим формам тяжелой гипоксии (ТГ). Н.Н.Сиротининым было установлено, что у мышей, «акклиматизированных» в барокамере к условиям пониженного атмосферного давления, повышалась устойчивость к аноксии (Сиротинин, 1964). Повышение устойчивости к ТГ после пребывания животных при пониженном парциальном давлении кислорода было обнаружено также Е.М.Крепсом с соавторами (Крепс и др., 1956). Помимо этого в ряде работ было показано, что акклиматизация к высокогорному климату повышала устойчивость к эпилептогенным агентам (Назаренко, 1962), подавляла возникновение и развитие таких заболеваний, как бронхиальная астма и шизофрения (Сиротинин, 1962). Адаптация к гипоксии также повышала резистентность к отравлению цианидами (Барбашова, Гинецинский, 1945), к повреждающему действию органических перекисей (Тиунов и др., 1962), высокой температуры (Агарков, 1960), радиации (Васильев, 1960), тяжелых ожогов и глубокого охлаждения (Гублер, Фенстер, 1960), радиального ускорения (Сиротинин, 1962, 1964). Такая долговременная адаптация к гипоксии связана с активацией акклиматизационных механизмов, приводящей прежде всего к существенному повышению эффективности кислородного снабжения клеток различных органов, в том числе мозга (Меерсон, 1993).

В отличие от этого, режим ПК представляет собой острое воздействие, сопровождающееся индукцией эндогенных эволюционно приобретенных, генетически детерминированных механизмов срочной адаптации, повышающих толерантность клеток к повреждающим воздействиям и затрагивающих высшие центры регуляции висцеральных функций и поведения – неокортекс, гиппокамп, гипоталамус (Самойлов, 1999; Самойлов, Рыбникова, 2012). ПК умеренной гипобарической гипоксией является перспективным методом ПК, поскольку является неинвазивным, легко дозируемым и не вызывает аллергических реакций.

Для создания ПК в нашей лаборатории применяют сеансы умеренной гипобарической гипоксии при атмосферном давлении 360 мм рт.ст. (соответствует подъему на высоту 5000 м) и продолжительностью 2 ч. Количество сеансов можно варьировать с целью определения

наиболее оптимального и эффективного режима (Чурилова и др., 2011). В частности, ранее в лаборатории проводились исследования с применением трех сеансов умеренной гипобарической гипоксии. Было установлено, что ПК тремя сеансами умеренной гипобарической гипоксии (ЗПК) существенно снижает смертность животных во время тяжелого гипоксического воздействия. В то время как выживаемость неПК-животных составляет в среднем 50%, у ЗПК-животных она повышается до 85% (Рыбникова и др., 2004, Rybnikova et al., 2005). Кроме того, ЗПК практически полностью предотвращает индуцированные ТГ структурные повреждения нейронов мозга (Рыбникова и др., 2004; Rybnikova et al., 2005, 2006). У ЗПК-животных существенно снижается доля погибших и апоптотических клеток в чувствительных областях мозга (неокортексе, гиппокампе). Наряду с этим ПК в значительной мере нивелирует функциональные нарушения мозга. В частности, ПК предотвращает вызываемую ТГ ретроградную амнезию и способствует сохранению способности к обучению после ТГ (Ватаева и др., 2004а, Rybnikova et al., 2005). Уровень тревожности, определяемый в экспериментальных моделях открытого поля и приподнятого крестообразного лабиринта, у неПК-животных значительно повышается относительно контроля, а ЗПК, напротив, оказывает выраженный анксиолитический эффект (Ватаева и др., 2004б). Установлено также, что животные, подвергнутые ЗПК в данной модели, приобретают устойчивость не только к ТГ, но и к тяжелым формам психоэмоционального и травматического стресса (Рыбникова и др., 2006; Rybnikova et al., 2007 a,b). Интерес представляют также исследования, выполненные при другом количестве сеансов УГГ, что позволит провести сравнительный анализ с ЗПК и будет способствовать раскрытию механизмов, лежащих в основе гипоксического ПК.

Таким образом, гипоксическое ПК можно рассматривать как универсальный способ повышения устойчивости к повреждающим воздействиям и, в частности, к ишемии/гипоксии, поэтому исследование механизмов, лежащих в основе нейропротективных эффектов гипоксического ПК, имеет важное теоретическое и практическое значение.

1.3. Молекулярно-клеточные механизмы формирования толерантности мозга, активируемые гипоксическим прекондиционированием

Различные непродолжительные и умеренные экстремальные воздействия, так же как небольшие дозы токсических веществ, стимулируют защитные механизмы организма на всех уровнях организации, включая молекулярный. При этом в клетках включаются механизмы, направленные на формирование долговременных приспособительных реакций, обеспечивающих повышение их устойчивости к последующим патогенным воздействиям. Согласно современным представлениям, в механизмы формирования толерантности мозга к различным неблагоприятным факторам (тяжелым формам гипоксии/ишемии,

психоэмоционального и травматического стресса) вовлекаются компоненты внутриклеточной сигнальной трансдукции, транскрипционные факторы (ТФ), гены раннего и позднего действия, их продукты – белки, ответственные за гибель и выживание нервных клеток - формирующие фазы индукции и экспрессии толерантности (Самойлов, Рыбникова, 2012).

1.3.1. Роль внутриклеточных сигнальных каскадов

Центральная роль в инициации формирования гипоксическим ПК адаптивных реакций принадлежит механизмам внутриклеточной сигнальной трансдукции, связанным с молекулярными событиями на уровне мембранных рецепторов, ионных каналов, регуляторных систем, генома. На раннем этапе (фаза индукции толерантности) включается каскад реакций с вовлечением компонентов внутриклеточных регуляторных систем (ВРС), трансдуцирующих рецептируемый клеткой сигнал в ядро, где происходит экспрессия специфических генов. ВРС – сложноорганизованные системы, состоящие из ряда компонентов, к которым относятся вторичные посредники и их субстраты-источники, субстраты-эффекторы и «вспомогательный аппарат» (Самойлов, 1999). К ключевым ВРС относят: кальциевую (основные компоненты – ионы кальция, Ca^{2+} -связывающие белки, Ca^{2+} -кальмодулин-зависимые протеинкиназы, Ca^{2+} -зависимые протеазы, эндонуклеазы, фосфолипазы); фосфоинозитидную (монофосфоинозитид, полифосфоинозитиды, инозитол-трифосфаты, диацилглицерол, Ca^{2+} -фосфолипид-зависимые протеинкиназы С, фосфолипаза С и др. ферменты); систему циклических нуклеотидов (циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), аденилатциклаза, гуанилатциклаза, фосфодиэстераза, цАМФ- и цГМФ-зависимые протеинкиназы).

Показано, что гиперактивация полифосфоинозитидной и кальциевой систем в результате действия долговременной аноксии вызывает патологические реакции мозга (Самойлов, 1999). Напротив, в ответ на кратковременную аноксию происходит умеренная активация кальциевой и фосфоинозитидной систем, характеризующая вовлечение этих регуляторных механизмов в адаптивные реакции нейронов мозга (Самойлов и др., 2001; Тюлькова и др., 1998, Semenov et al., 2002). После кратковременной аноксии также происходит умеренная стимуляция ионотропных NMDA-рецепторов, что способствует формированию адаптивных состояний нейрона и способствует развитию ранней фазы толерантности нейронов мозга при повреждающем воздействии, в частности при долговременной аноксии (Самойлов и др., 2000, 2001a). Эти данные коррелирует с результатами, полученными в модели ишемического ПК: умеренная активация NMDA-рецепторов, индуцируемая ишемическим ПК, необходима для формирования толерантности нейронов к действию тяжелой повреждающей ишемии (Kato et al., 1992; Bond et al., 1999).

Наряду с ВРС важное место среди систем внутриклеточной сигнальной трансдукции

принадлежит киназным каскадам. Киназный каскад имеет иерархическое строение, где одни киназы управляют следующими киназами путем фосфорилирования. Последняя киназа такого каскада (эффекторная) фосфорилирует белок-мишень, который может быть транскрипционным фактором, протеазой или про-адаптивным белком, и изменяет, таким образом, его функцию. Киназные каскады могут регулироваться как положительно путем фосфорилирования киназами, так и негативно путем дефосфорилирования фосфатазами.

Одним из наиболее важных киназных сигнальных путей являются MAPK (mitogen activated protein kinase) каскады, поскольку они участвуют в нейропротективных механизмах. Считают, что основные MAPK - ERK (extracellular regulated kinase) и JNK (c-jun N-terminal kinase) - выполняют противоположные функции. ERK имеет про-адаптивный эффект и способствует дифференциации нейронов, в то время как JNK связывают с дегенерацией нейронов и регуляцией апоптоза (Nozaki et al., 2001; Zhang et al., 2003). Это подтверждается тем, что уровень фосфорилирования JNK повышается в ответ на ишемию (Gu et al., 2001b), а ишемическое ПК снижает уровень фосфорилирования JNK и увеличивает экспрессию фосфорилированной формы ERK по сравнению с эффектом тяжелой непрекonditionированной ишемии (Gu et al., 2001a; Miao et al., 2005). Ишемическое ПК также повышает экспрессию MEK (mitogen/extracellular signal-regulated kinase) и ERK в гиппокампе (Shamloo et al., 1999). Аналогичные результаты получены в парадигме гипобарической гипоксии, где после действия тяжелой гипобарической гипоксии отмечается повышение активности JNK в области CA1 гиппокампа – одной из наиболее чувствительной к гипоксии (Самойлов и др., 2007); этот эффект отсутствует при предварительном применении ПК умеренной гипобарической гипоксией (Самойлов и др., 2007). Ингибирование ERK приводит к уменьшению протективного эффекта ПК (Gu et al., 2001a), что свидетельствует о вовлечении MAPK-киназных каскадов в развитии гипоксической толерантности нейронов мозга.

Важная роль в механизмах нейропротекции также отводится протеин-киназе В (Akt). Активация Akt происходит путем фосфорилирования фосфоинозитид-3-киназой или киназой кальций-кальмодулин-зависимой-киназы, которые активируются в ответ на стимуляцию ионотропных NMDA-рецепторов (Franke et al., 1995; Burgering, Coffey, 1995). Кроме того, активация Akt может происходить и при стимуляции метаболотропных mGlu-рецепторов (Scartabelli et al., 2008). Akt далее фосфорилирует про-апоптотический белок семейства Bcl-2 - Bad (Datta et al., 1997), каспазу 9 (Cardone et al., 1998), ТФ FKHRL1 (Forkhead box O3) (Brunet et al., 1999), что приводит к ингибированию их активности и предотвращает процесс инициации апоптоза. Akt также приводит к ингибированию JNK (Miao et al., 2005). Таким образом, Akt участвует в предотвращении гибели нейронов, а также в механизмах формирования толерантности к гипоксии/ишемии (Hillion et al., 2006; Zhang et al., 2007; Miao et al., 2005).

Устойчивая активация Akt, индуцируемая ишемическим ПК, способствует выживанию нейронов околоинфарктной области после действия тяжелой ишемии (Nakajima et al., 2004). Фосфорилирование Akt повышается в области CA1 гиппокампа в ответ на ишемическое ПК, и применение ингибиторов Akt снижает нейропротективный эффект ПК (Yano et al., 2001).

1.3.2. Отсроченные геном-зависимые механизмы

Одним из важнейших последствий активации, как правило, нескольких ВРС является экспрессия генома, которая включает несколько стадий: 1) активацию белков, регулирующих транскрипцию - ТФ; 2) активацию генов раннего ответа (ранние гены – immediate early genes); 3) активацию генов позднего ответа (поздние или фенотип-специфические гены – late response genes); 4) экспрессию синтеза про-адаптивных нейромодуляторных пептидов.

Только при полноценном развитии этого процесса (фаза экспрессии толерантности) формируется долговременное про-адаптивное состояние нейронов мозга. Важная роль в развитии фазы экспрессии гипоксической толерантности принадлежит семействам ТФ.

1.4. Роль транскрипционных факторов – ключевых регуляторов экспрессии генома клеток – в развитии фазы экспрессии толерантности

Транскрипционными факторами (ТФ) называют белки или белковые комплексы, непосредственно не участвующие в каталитическом акте образования РНК, но необходимые для прохождения основных этапов транскрипции и ее регуляции. После перемещения в ядро клетки транскрипционные факторы регулируют транскрипцию, специфически взаимодействуя с ДНК, либо стехиометрически взаимодействуя с другим белком, который может образовывать специфичный к последовательности ДНК комплекс "белок-ДНК".

1.4.1. Структура, классификация и регуляция транскрипционных факторов

Структура ТФ.

Большинство ТФ имеют модульное строение и могут содержать: 1) ДНК-связывающий домен, ответственный за связывание ТФ со специфическим участком ДНК; 2) Димеризационный (олигомеризационный) домен. Многие ТФ связываются с ДНК в виде димеров, а некоторые в виде комплексов более высоких порядков. В большинстве случаев отвечающий за это домен функционально объединен с ДНК-связывающим доменом; 3) Транс-активирующий (или транс-репрессирующий) домен, который часто характеризуется повышенным содержанием определенных аминокислотных остатков. Например, для активационных доменов свойственна обогащенность глутамином, пролином, серином, треонином или остатками кислых аминокислот; 4) Модулирующую область, которая часто является мишенью для модифицирующих ферментов, большей частью протеинкиназ; 5) Лиганд-связывающий домен.

Классификация ТФ. Специфичность взаимодействия транскрипционных факторов с распознаваемыми ими регуляторными последовательностями генов определяется преимущественно особенностями их ДНК-связывающих доменов. Многие факторы связываются с ДНК в виде димеров (мультимеров), и состав этих комплексов также может влиять на специфичность связывания с ДНК. Все ТФ по ключевым особенностям ДНК-связывающих доменов разделены на четыре следующих суперкласса (база данных **TRANSFAC** 7.0 Public, 2005; Wingender et al., 1996): Суперкласс 1. Факторы, ДНК-связывающий домен которых обогащен положительно заряженными аминокислотными остатками (basic domain 284 фактора). Суперкласс 2. Факторы, у которых ДНК-связывающий домен формируется с участием координированных ионов цинка (zinc-coordinated DNA-binding domain, 148 факторов). Суперкласс 3. Факторы, имеющие ДНК-связывающий мотив типа спираль-поворот-спираль (helix-turn-helix DNA binding motif, 369 факторов). Суперкласс 4. Факторы, у которых поверхность, контактирующая с ДНК, представлена в виде сложным образом организованного скэффолда из бета-нитей. Контакты с ДНК в этом случае осуществляются по малой бороздке (beta-scaffold factors with minor grooves contacts, 156 факторов). Существует также большая группа транскрипционных факторов с неизвестной в настоящее время структурной организацией ДНК-связывающих доменов, которые относятся к условному суперклассу 0.

Классификация может быть продолжена путем деления класса на семейства, а семейств – на подсемейства. Общее число регуляторных белков составляет несколько тысяч. Каждому фактору соответствует пятизначный цифровой код, первая цифра которого относится к суперклассу, вторая - к классу, третья - к семейству, четвертая - к подсемейству, пятая является видовой характеристикой фактора.

Транскрипционные факторы осуществляют избирательное включение или выключение тех или иных генов в клетке. Они могут осуществлять регуляцию несколькими способами: 1) непосредственно связываясь с регуляторными участками ДНК (промоторами, энхансерами); 2) связываясь с РНК-полимеразой и, как следствие, облегчают или ингибируют ее связывание с промоторной зоной ДНК; 3) связываясь с другими ТФ или непосредственно с транскрипционным комплексом, оказывая на них либо активирующее либо ингибирующее действие.

Существуют и другие классификации ТФ (Wingender, 1997). Все ТФ условно можно разделить на конститутивные и специфические. Конститутивные ТФ (иначе главные факторы транскрипции) присутствуют во всех клетках организма и активны постоянно. Эта группа ТФ обеспечивает базальный уровень экспрессии генов на протяжении всей жизни организма. Данные ТФ могут не связываться с ДНК самостоятельно, но входят в комплекс инициации транскрипции. Специфические ТФ не проявляют постоянной активности, но могут включаться

или выключаться в определенные периоды жизни организма и под действием специфическим экстраклеточных агентов. К таким ТФ относятся ТФ, регулирующие онтогенез - они активируются/инактивируются в определенные периоды развития организма, обеспечивая тканевую и органную специфичность. К другой группе специфических ТФ относятся индуцибельные и активационные факторы — они активируются только под действием экстраклеточного сигнала, после чего связываются со специфическим участком ДНК гена-мишени. Индуцибельные ТФ не присутствуют в клетке в условиях отсутствия внешнего воздействия. Они являются, как правило, продуктами ранних генов и синтезируются *de novo* в ответ на внешний стимул. К ним относятся ТФ c-Fos, NGFI-A, HIF-1 α и др. К активационным относятся ТФ, которые существуют в клетке в неактивной форме и активируются путем фосфорилирования или другим способом в ответ на внешнее воздействие. К таким факторам относятся, в частности, CREB, NF-kappaB, глюко- и минералокортикоидные рецепторы. Специфические ТФ обеспечивают все многообразие клеточных реакций организма в ответ на изменение окружающей среды и многочисленные внешние воздействия.

1.4.2. Индуцибельные ТФ

Семейству ранних генов отводится важная роль в реакциях нейронов мозга в ответ на различные воздействия. Семейство ранних генов обширно, оно включает гены *c-fos*, *c-jun*, *junB*, *fosB*, *hif-1 α* , *zif268*, *ras*, *c-ros*, *c-src* и др. Транскрипция ранних генов индуцируется в ответ на стимуляцию быстро и транзиторно. Продукты ранних генов - белки, являющиеся индуцибельными ТФ, которые в свою очередь активируют свои гены-мишени. Например, c-Jun относят к ТФ, являющимися ключевыми эффекторами смерти клеток. Известно, что тяжелая гипобарическая гипоксия и ишемия вызывают устойчивую экспрессию фосфорилированной формы c-Jun в поле CA1 гиппокампа (Самойлов и др., 2007; Gillardon et al., 1999). Напротив, ПК подавляет как экспрессию гена *c-jun* и белка, так и активацию (фосфорилирование) его продукта после ТГ (Самойлов и др., 2007). Аналогичные результаты получены в экспериментах с использованием ишемического ПК в гиппокампе (Gu et al., 2001b, Miao et al., 2005). Обнаружены существенные различия в экспрессии ранних генов *zif268*, *c-fos*, *hif-1 α* и их белковых продуктов NGFI-A, c-Fos и HIF-1 α у не-ПК и ПК-животных после ТГ (Рыбникова и др., 2004, Самойлов и др., 2001б; Rybnikova et al., 2002, 2005). В частности, ТГ у неПК-животных приводит к снижению экспрессии NGFI-A, а у ПК-животных - к ее усилению. Усиление экспрессии гена *ngfi-a* выявлено в ответ на ишемическое ПК в гиппокампе (Kawahara et al., 2004) в модели кортикальной распространяющейся депрессии (McKee et al., 2006). Содержание c-Fos не изменяется у неПК-крыс, но существенно увеличивается у ПК-крыс после ТГ (Рыбникова и др., 2004). При этом обнаружено усиление экспрессии гена *c-fos* в ответ на ишемическое ПК в гиппокампе и неокортексе (Kawahara et al., 2004).

HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) – продукт раннего гена *hif-1 α* , индуцибельный ТФ, один из ключевых регуляторов генов млекопитающих, ответственных за реакцию на недостаток кислорода. Он регулирует экспрессию генов, вовлеченных в процесс ангиогенеза, вазомоторный контроль, энергетический метаболизм, эритропоэз и апоптоз (Ratan et al., 2007). HIF-1 α активируется в ответ на гипоксию и играет важную роль в предотвращении повреждений нейронов при действии ишемии/гипоксии (Semenza, 2001; Chavez, LaManna, 2002). HIF-1 α активируется в парадигме гипоксического ПК у новорожденных и взрослых крыс (Bergeron et al., 2000; Bernaudin et al., 2002a,b). У нокаутных мышей с дефицитом HIF-1 α в мозге гипоксическая толерантность после ПК не формируется (Taie et al., 2009). Важная роль в HIF-1 α -опосредуемых механизмах формирования гипоксической толерантности нейронов заключается в регуляции экспрессии генов эритропоэтина и фактора роста эндотелия сосудов (Bernaudin et al., 2002a; Prass et al., 2003). Показано, что многократные воздействия умеренной гипобарической гипоксии приводят к увеличению уровня экспрессии HIF-1 α (Сидорова и др., 2013).

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют об активном участии индуцибельных ТФ в механизмах формирования гипоксической толерантности нейронов мозга.

1.4.3. Активационные транскрипционные факторы: pCREB и семейство NF-kappaB

Поскольку основным предметом наших исследований явилось изучение роли активационных и лиганд-связывающих гормон-активируемых ТФ в реакциях нейронов мозга в ответ на гипобарическую гипоксию, то более подробно осветим данные литературы, касающиеся характеристик и функционального значения этих ТФ. Активационные ТФ являются связующим звеном между сигналами, приходящими из окружающей среды, и геномом клетки, и выполняют адаптивные функции.

1.4.3.1. CREB

В 1987 г. на PC12 клетках был открыт новый белок, который связывался с cAMP response element (CRE) в гене соматостатина и получил название cAMP-responsive element binding protein (CREB) (Montminy, Bilezikjian, 1987). CREB принадлежит большому семейству ТФ, характеризующихся общим строением ДНК-связывающего домена (класс «лейциновая застежка»). Известно, по крайней мере, еще 10 других генов, белки которых входят в семейство CREB. Большинство этих генов образуют изоформы путем альтернативного сплайсинга. В частности, CREB может иметь 3 изоформы: a, b, d (Blendy et al., 1996; Gonzalez et al., 1989). Помимо транскрипционных активаторов, в семействе CREB имеются также и репрессоры: CREM (cAMP response element modulator) производит как минимум четыре разных репрессора, которые ингибируют CRE-зависимую транскрипцию (Monila et al., 1993).

Структура

На С-терминальном конце CREB содержится домен типа лейциновой застёжки, ответственный за связывание с ДНК и димеризацию. N-терминальный конец содержит киназ-индуцибельный домен и богатые глутамином трансаактивационные домены Q1 и Q2 (Lalli et al., 1993). Домены Q1 и Q2 связываются с ко-факторами, а также с основными факторами транскрипции, осуществляя регуляцию уровня транскрипции (Johannessen et al., 2004). Киназ-индуцибельный домен является регуляторным доменом, который преобразует внеклеточный сигнал в CREB-опосредованную транскрипцию. Киназ-индуцибельный домен содержит сериновые остатки, которые являются мишенью для ряда киназ, в том числе Ca/кальмодулин-зависимой киназы II и IV, протеин киназы A, протеин киназы C, митоген/стресс-активируемой киназы, Akt (протеин-киназы B) и MAPKAP (MAP kinase-activated protein) киназы 2 (Gonzalez, Montminy, 1989; Sun et al., 1994; Deak et al., 1998; Du, Montminy, 1998). Ключевым остатком является Ser133; его фосфорилирование обязательно для инициации транскрипции, и мутации в этом сайте нарушают активацию CREB (Gonzalez, Montminy, 1989).

Регуляция активности CREB

Ключевым механизмом регуляции CREB является его фосфорилирование по Ser133. Уровень фосфорилирования по Ser133 определяется соотношением активности в клетке протеинкиназ и фосфатаз, которые либо добавляют, либо удаляют фосфатную группу из молекулы CREB (Bito et al., 1996). Однако, фосфорилирование может происходить также и по другим сериновым остаткам (Sun et al., 1994; Kornhauser et al., 2002). Например, фосфорилирование Ser142 кальций-кальмодулин-зависимой киназой II ингибирует трансаактивацию CREB, запуская диссоциацию димеров CREB (Wu, McMurray 2001; Kornhauser et al. 2002). Фосфорилирование CREB по Ser121 ингибирует CREB-зависимую транскрипцию, а фосфорилирование по Ser271 – активирует ее (Dodson, Tibbetts, 2006; Sakamoto et al., 2010). Помимо фосфорилирования, активность CREB регулируется путем ацетилирования, гликозилирования, убиквитинирования, сумоилирования (Lamarre-Vincent, Hsieh-Wilson, 2003; Lu et al., 2003b; Johannessen et al., 2004). В частности, ацетилирование CREB по трем лизиновым остаткам в области Q1, приводит к усилению CRE-зависимой транскрипции (Lu et al. 2003b).

Внутриклеточные пути

CREB является ключевым ТФ, который опосредует цАМФ- и кальций-зависимую экспрессию генов (Montminy, 1997). В неактивном состоянии молекулы CREB локализуются в ядре клетки. Активация CREB может происходить в течение секунд и минут после начала действия внеклеточного стимула. Различные экстраклеточные сигналы, действуя на мембранные NMDA, AMPA, метаботропные глутаматные рецепторы, приводят к увеличению

внутриклеточного содержания Ca^{2+} и цАМФ (Choe, Wang, 2001; Mabuchi et al., 2001; Kitagawa, 2007; Roberson et al., 1999) (рис.1). В свою очередь цАМФ активирует регуляторную субъединицу протеин-киназы А, которая диссоциирует от каталитической субъединицы фермента. Освобожденная каталитическая субъединица PKA перемещается в ядро, где фосфорилирует и активирует CREB (Bacskai et al., 1993). Увеличение свободного внутриклеточного кальция, опосредованное NMDA-рецепторами, активирует Ca-кальмодулин-зависимую киназу IV, которая также может фосфорилировать и активировать CREB в нейронах (Bito et al., 1996; Deisseroth et al., 1998; Ghosh, Greenberg, 1995). Возможность фосфорилирования CREB большим набором киназ обеспечивает механизм конвергенции разных сигнальных путей (Dash et al., 1991, Sheng et al., 1991). Активированный (фосфорилированный) CREB связывается с ко-активаторными белками CBP (CREB-binding protein) и p300 (Chrivia et al., 1993) и запускает CRE-опосредованную транскрипцию генов-мишеней (рис. 1).

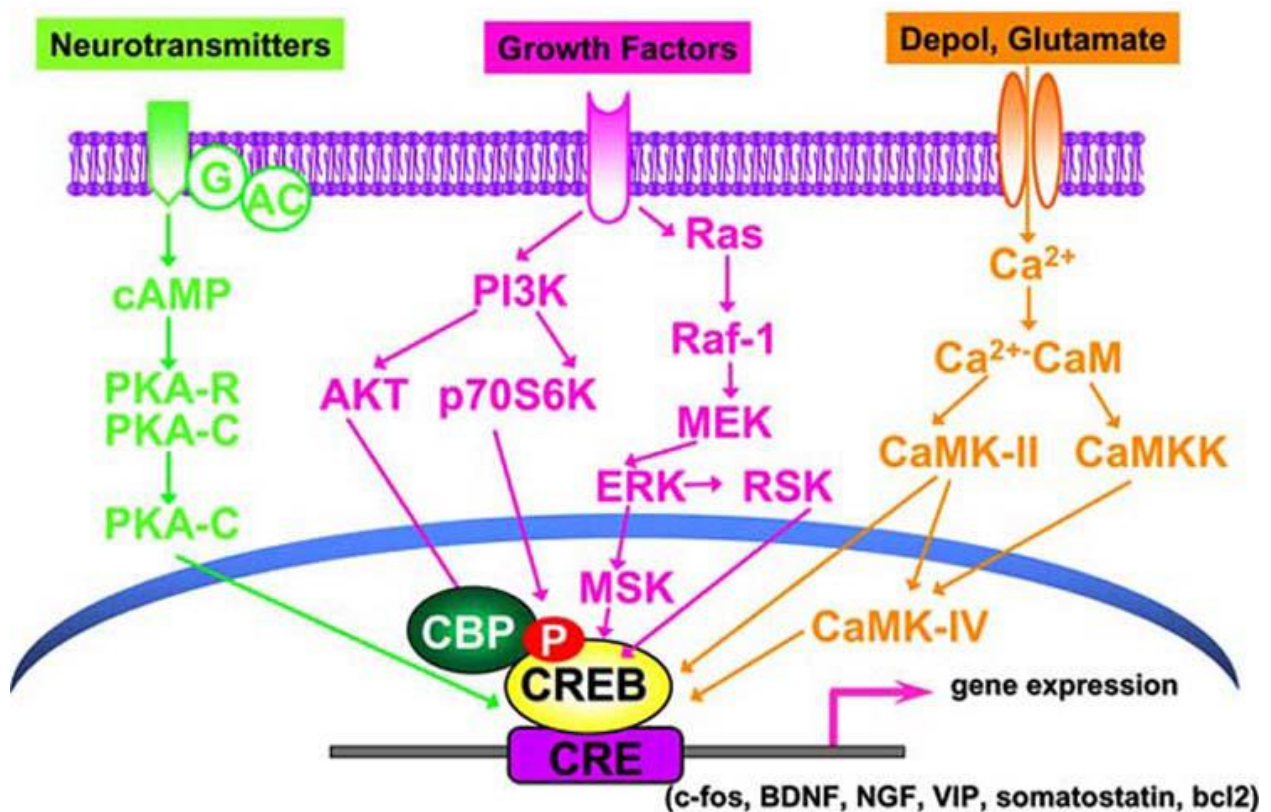


Рис. 1. Схема сигнального пути CREB (Josselyn, Nguyen, 2005). Многочисленные внутриклеточные сигнальные пути конвергируют на CREB; таким образом, CREB служит одним из основных интеграторов многочисленных внешних стимулов.

АС, аденилатциклаза; BDNF, нейротрофический фактор мозга; CaM, кальмодулин; CaMKIV, Ca-кальмодулин-зависимая киназа IV; CRE, cAMP response element; MAPK, митоген-активируемая протеин-киназа; PKA, цАМФ-зависимая протеин-киназа; RSK, рибосомальные киназы.

К генам мишеням CREB относятся ранние гены *c-fos*, *zif 268* (Hata et al., 1998; Sassone-Corsi et al., 1998; Sheng et al., 1990), гены-ингибиторы апоптоза (activity-regulated inhibitor of

death genes) (Tan et al., 2012), гены пептидных антиоксидантов (Trx1, СОД) (Chiueh et al., 2005), антиапоптотических факторов Bcl-2 (Sugiura et al., 2004; Chiueh et al., 2005; Meller et al., 2005) и нейротрофинов, в частности, BDNF (Shieh et al., 1998; Tao et al., 1998; Sugiura et al., 2004).

Активность CREB заканчивается после того, как фосфотаза PP1 забирает фосфатную группу с Ser-133 (Hagiwara et al., 1992).

Функциональная роль CREB, характер его вовлечения в механизмы адаптации мозга к неблагоприятным факторам

В нервной системе CREB играет ключевую роль в увеличении синаптической пластичности, которая лежит в основе процессов обучения и консолидации памяти (Barco et al., 2002; Silva et al., 1998; Lonze, Ginty, 2002; Kida, 2012). CREB вовлечен в формирование различных типов памяти: обстановочного рефлекса страха, пространственной и обонятельной памяти, памяти на социально-обоснованные вкусовые предпочтения, на распознавание предметов и др (Josselyn, Nguyen, 2005; Silva et al., 1998; Viosca et al., 2009; Kida et al., 2002). При этом активация CREB является обязательным событием при формировании долговременной памяти. В частности, замена Ser133 на Ala (делающая невозможным фосфорилирование CREB по этому сайту) приводит к нарушению долговременной памяти (через 11 дней после обучения) в гиппокампе крыс в тесте на социальное пищевое предпочтение. При этом кратковременная память (тестирование сразу после обучения) остается в норме (Brightwell et al., 2005). Кроме того CREB может косвенным путем контролировать кратковременную память. Улучшение кратковременной памяти зависит от активности CREB (Suzuki et al., 2011). Известно, что кратковременная память не зависит от *de-novo* синтеза белков. Поэтому усиление кратковременной памяти опосредуется не активацией синтеза CREB-зависимых белковых факторов сразу после обучения, а обусловлено их наличием в клетке к моменту начала тренировки. Таким образом, CREB также участвует в контроле кратковременной памяти, регулируя, в частности, экспрессию BDNF (Tao et al., 1998).

Экспрессия CREB необходима для пролиферации и дифференциации нейронов (Carlezon et al., 2005; Lonze et al., 2002). В развивающейся периферической нервной системе молодых мышей, не экспрессирующих CREB(0-CREB), развивается апоптоз и нарушается рост аксонов сенсорных нейронов (Lonze et al., 2002). Это объясняется тем, что факторы роста, такие как NGF, опосредуют, по крайней мере, частично свое действие через CREB-зависимую экспрессию про-адаптивных белков (Riccio et al., 1999). Фосфорилирование CREB предотвращает апоптоз нейронов у взрослых животных (Walton et al., 1999; Bonni et al. 1999). Оверэкспрессия доминантной негативной формы CREB (CREB S133A) в цингулярной коре взрослых мышей приводит к апоптозу нейронов (Ao et al., 2006). Разрушение гена *Creb1* и *Crem*

приводит к нейродегенерации пирамидных клеток области CA1 гиппокампа, а также к истончению зубчатой извилины (Mantamadiotis et al., 2002). А дефосфорилирование CREB в гиппокампе по Ser133 коррелирует с индукцией длительной депрессии (Mauna et al., 2010; Thiels et al., 1998).

CREB принимает участие в механизмах нейропротекции к ряду патофизиологических воздействий (Lee et al., 2005; Walton, Dragunow, 2000). Нарушение экспрессии CREB наблюдается как при врожденных заболеваниях, так и при приобретенных нарушениях функционирования ЦНС: болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, ишемии, алкоголизме, шизофрении, депрессии (Walton, Dragunow, 2000; Carlezon et al., 2005; Wand, 2005; Chalovich et al., 2006; Ma et al., 2007). В частности, тяжелая ишемия/гипоксия приводят к развитию апоптоза клеток и вместе с тем подавляют экспрессию фосфорилированной формы CREB (Walton et al., 1999; Рыбникова и др., 2004; Rybnikova et al., 2006, 2008). При этом в большей степени апоптозу подвержены пирамидные нейроны области CA1 гиппокампа, тогда как гранулярные клетки зубчатой извилины остаются устойчивыми к повреждению (Beilharz et al., 1995). Фосфорилирование CREB по Ser133 после действия ишемии избирательно происходит только в зубчатой извилине гиппокампа и неокортексе, в то время как в гибнущих нейронах области CA1 происходит выраженное подавление экспрессии CREB (фосфорилированного и нефосфорилированного) (Walton et al., 1996). Аналогичная картина наблюдается в модели глобальной (Hu et al., 1999) и фокальной ишемии (Tanaka et al., 1999).

Напротив, умеренные воздействия индуцируют экспрессию фосфорилированной формы CREB. Устойчивое фосфорилирование CREB наблюдается *in vitro* на культуре клеток PC12 после умеренной (5% O₂) гипоксии (Beiter-Johnson, Millhorn, 1998). PC12 клетки, овер-экспрессирующие CREB, менее подвержены апоптозу, вызванному инъекцией омега-3 кислот, и значительная часть этого эффекта обусловлена продолжительным фосфорилированием CREB по Ser133 (Walton et al., 1999). Умеренные гипоксические и ишемические воздействия также индуцируют экспрессию pCREB *in vivo* (Mabuchi et al., 2001; Nakajima et al., 2002; Lee et al., 2004; Walton et al., 1999; Rybnikova et al., 2008). Нарушение CRE-опосредованной экспрессии генов путем *in vivo* введения CRE-нокаутного олигонуклеотида значительно уменьшает эффективность ПК у взрослых и новорожденных животных в модели гипоксии/ишемии (Lee et al., 2004).

В пользу нейропротективного эффекта индукции экспрессии pCREB свидетельствуют также работы, выполненные на модели фокальной ишемии, где в пери-инфарктной области наблюдается усиление экспрессии CREB, а в инфарктном ядре – значительное уменьшение числа CREB-иммунопозитивных клеток (Tanaka et al., 1999; Irving et al., 2000a; Sugiura et al., 2004; Nakajima et al., 2002). Аналогично, в модели болезни Хантингтона, вызванной 3-

нитропропионой кислотой, показано, что подавление фосфорилирования CREB предшествует смерти клеток в пораженном ядре, в то время как в окружающей ядро области (пенумбре) наблюдается усиление фосфорилирования CREB вместе с увеличением экспрессии Bcl-2 (Choi et al., 2009).

Благодаря тому, что на CREB конвергирует широкий круг нейромодуляторов и нейротрансмиттеров, он участвует в регуляции выживания и пластичности нейронов (Gonzalez, Montminy, 1989; Finkbeiner et al., 1997; Roberson et al., 1999). Существуют два типа NMDA-рецепторов: синаптический (нейропротективный) и экстраинаптический (эксайтотоксичный), активация которых имеет противоположный эффект на уровень фосфорилирования CREB, и, как следствие, на экспрессию генов анти-апоптотических факторов и выживание клеток (Hardingham et al., 2002).

К механизмам, посредством которых CREB выполняет нейропротективную функцию, относится регуляция им уровня активных форм кислорода. CREB стимулирует экспрессию генов антиоксидантов, среди которых гем-оксигеназа 1 (Kronke et al., 2003) и Mn-COD (Kim et al., 1999), тиоредоксин (Chiueh et al., 2005). CREB также регулирует экспрессию PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α), связываясь с энхансерным регионом его гена (Herzig et al., 2001). PGC-1 α стимулирует митохондриальный биогенез и необходим для индукции некоторых антиоксидантов. Экспрессия PGC-1 α нарушается при наличии мутации в сайте связывания с CREB (St-Pierre et al., 2006). Нарушение CRE-опосредованной экспрессии генов приводит к значительному увеличению продукции активных форм кислорода после повреждающего воздействия (Lee et al., 2009). При этом происходит также снижение базального и индуцибельного уровня PGC-1 α и гем-оксигеназы 1.

Одним из важных нейропротективных механизмов CREB является активация транскрипции генов про-адаптивных белков, в частности, Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) (Pugazhenthil et al., 2000). Активация Bcl-2 зависит от CREB (Riccio et al., 1999). Обнаружена взаимосвязь между уровнем экспрессии CREB и Bcl-2 в пери-инфарктной области после фокальной ишемии (Sugiura et al. 2004) и после ишемического ПК (Meller et al., 2005). Помимо того, CREB регулирует уровень экспрессии BDNF (Tao et al., 1998). В свою очередь, BDNF, связываясь с тирозин-киназными рецепторами, активирует каскад внутриклеточных реакций и стимулирует фосфорилирование CREB (Finkbeiner et al., 1997), образуя, таким образом, положительную обратную связь. Показано, что при блокировании CREB-опосредованной транскрипции, эффективность preconditionирующих микроинъекций BDNF снижалась при действии на клетки оксидативного стресса (Lee et al., 2009).

Вместе с тем, следует отметить малочисленность исследований, касающихся вовлечения CREB в механизмы гипоксического ПК.

1.4.3.2. NF- κ B

ТФ семейства NF- κ B (nuclear factor κ B) принадлежат к суперсемейству 4 - ТФ с бета-скэффолд ДНК-связывающим доменом с контактами по малой бороздке. NF- κ B был открыт в 1987г в лаборатории Нобелевского лауреата Дэвида Балтимора на В-клетках как фактор, взаимодействующий с 11-ти нуклеотидной последовательностью энхансера гена легкой цепи иммуноглобулина.

Структура

Члены семейства NF- κ B имеют значительную структурную гомологию с онкопротеином ν -Rel, поэтому нередко их классифицируют как NF- κ B/Rel протеины. Семейство NF- κ B включает в себя ряд белков: p52, p50, RelB, c-Rel, RelA(p65). Члены семейства NF- κ B связываются между собой, образуя гомо- и гетеродимеры, которые присутствуют в большинстве клеток в неактивном виде. Rel-содержащие белки имеют на своем С-конце трансаактивирующий домен и обладают трансаактивирующим свойством. Напротив, С-терминальный конец белков-предшественников p100 и p105 содержит анкириновые повторы, которые обладают трансрессирующей активностью. Активные частицы p52 и p50 образуются из белков-предшественников p105 и p100 путем ограниченного протеолиза их С-терминального конца. В таком виде p52, p50 являются не активаторами, а репрессорами транскрипции, однако если они образуют гетеродимеры с членами Rel подсемейства, то выступают в качестве активаторов. Отличительным признаком семейства NF- κ B является Rel-гомологичный домен, состоящий приблизительно из 300 аминокислотных остатков. Rel-гомологичный домен необходим для связывания белка NF- κ B с ДНК, его димеризации и транспорта в ядро (Gilmore, 2006).

Внутриклеточные пути NF- κ B

Димерные комплексы NF- κ B связываются с кВ-сайтами ДНК, состоящими из 9-10 пар нуклеотидов и имеющими достаточно высокую вариабильность (5'-GGGRNWYYCC-3'; где R - А или G; N – любой нуклеотид; W - А или Т; Y - С или Т).

Активность NF- κ B строго регулируется взаимодействием с ингибиторными белками I κ B, которые маскируют сигнал транслокации NF- κ B в ядро и, таким образом, удерживают NF- κ B в цитоплазме в неактивной форме (рис. 2). К семейству I κ B относятся I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , Bcl-3, а также предшественники p100 и p105. Все члены семейства I κ B содержат консервативный домен с анкириновыми повторами, ответственный за взаимодействие с NF- κ B. В нейронах наиболее распространенным комплексом является комплекс, состоящий из p65, p50 и I κ B α (Kaltschmidt B., Kaltschmidt C., 1994; Mattson, Camandola, 2001). Другие комплексы также могут присутствовать в нейронах, и их состав зависит от таких факторов как уровень развития нейронов и их локализация внутри нервной системы (Levenson et al., 2004;

Mattson, Meffert, 2006).

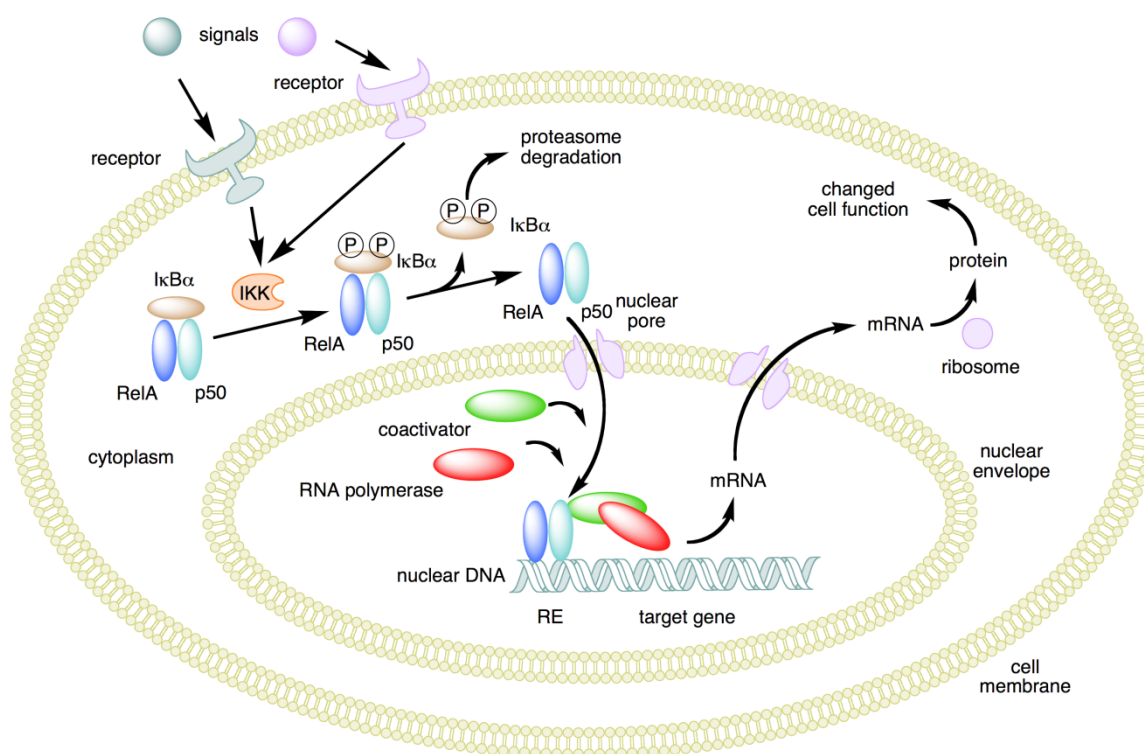


Рис. 2. Механизм действия NF-карраВ (Gilmore, 2006).

Существует по крайней мере два, основных пути, ведущих к активации NF-карраВ: канонический (классический) и неканонический (альтернативный). Классический путь активации NF-карраВ чаще встречается в нервной системе, в то время как альтернативный путь более характерен для активации комплексов p100/RelB в созревающих В- и Т-лимфоцитах (Scheidereit, 2006;). Кроме того, известны также и другие способы активации NF-карраВ (Gilmore, 2006). Общим для обоих путей активации шагом является активация IкВ киназы (IKK), которая состоит из каталитических субъединиц (IKK α и IKK β) и регуляторной субъединицы NEMO (NF-карраВ essential modulator) или IKK γ . В классическом пути активации IKK фосфорилирует IкВ по двум сериновым остаткам (Ser32 и Ser36 у IкВ α человека), после чего молекула ингибитора отсоединяется от димеров NF-карраВ, модифицируется путем убиквитинирования и подвергается деградации в протеасомах (Karin, Ben-Neriah, 2000). Активированные димеры NF-карраВ транслоцируются в ядро и в присутствии других ко-активаторов связываются со специфическими участками ДНК, индуцируя экспрессию генов-мишеней (рис. 2). Кроме того, NF-карраВ регулирует экспрессию гена собственного ингибитора IкВ, что приводит вновь к ингибированию NF-карраВ, осуществляя, таким образом, ауто-регуляцию (Nelson et al., 2004).

К активации NF-kappaB приводит стимуляция целого ряда рецепторов поверхности клетки, таких как рецепторы хемокина RANK, интерлейкиновых рецепторов IL-1R, NGFR (nerve growth factor receptor) (Carter et al., 1996; Gilmore, 2006). Среди других факторов, активирующих NF-kappaB - нейромедиаторы (в частности, глутамат), tau-протеины, β -амилоидный пептид, форболовый эфир, ультрафиолет, факторы роста, химические агенты (Grilli, Memo, 1998; Barger, Mattson, 1996; Guerrini et al., 1995; Carter et al., 1996).

NF-kappaB регулирует большое количество генов, среди которых - гены, кодирующие цитокины (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, интерферон- β), белки смерти и выживания (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-xs, Bax, XIAP, p53, Мус, Fах), адгезивные молекулы (ICAM-1, VCAM, ELAM-1, E-Selectin), циклооксигеназу 2, Mn-COD, индуцибельную NO синтазу, циклин-D1 (Grilli, Memo, 1998; Mattson, Meffert, 2006; Mattson, Camandola, 2001). Разнообразие NF-kappaB комплексов и их активаторов и большое число генов-мишеней обуславливают многочисленные молекулярные NF-kappaB-зависимые изменения.

Регуляция активности NF-kappaB

Активность NF-kappaB в основном регулируется взаимодействием с белком IкВ. Субъединицы IкВ имеют разное сродство к каждому из Rel/NF-kappaB комплексов и экспрессируются в ткане-специфической манере. Большое число работ свидетельствует, однако, о более сложных путях контролирования активности NF-kappaB, чем просто ИКК-зависимая регуляция IкВ/NF-kappaB взаимодействий. К этим дополнительным способам регуляции относятся разнообразные посттрансляционные модификации, которые влияют на активность NF-kappaB (Huang et al., 2010). Например, субъединицы NF-kappaB могут подвергаться убиквитинированию, ацетилированию, фосфорилированию, причем, одна и та же модификация может иметь разный эффект в зависимости от контекста (Perkins, 2006). Более того, ИККа также может транслоцироваться в ядро, где она связывается с промотором или энхансером кВ сайта с тем, чтобы фосфорилировать гистон H3, что приводит к увеличению транскрипции кВ-зависимых генов. Некоторые из этих модификаций могут служить способом переключения между различными сигнальными путями (Perkins, 2007).

Наиболее хорошо изучены посттрансляционные модификации р65. Первой обнаруженной модификацией р65 было его фосфорилирование протеинкиназой А. Считается, что эта модификация является обязательной для экспрессии большого числа р65-зависимых генов (Chen, Greene, 2004). Активированная протеинкиназа А фосфорилирует р65 по Ser276. р50 и с-Rel также трансформируются по аналогичным RelA сайтам (Perkins, 2006). Считается, что фосфорилирование р65 по Ser276 приводит к разрыву внутримолекулярных связей между С-терминальной частью белка и Rel-гомологичным доменом, усиливая, таким образом, ДНК-связывание и делая возможным связывание с транскрипционными коактиваторами р300 и СВР

(Zhong et al., 2002). Помимо протеинкиназы A, Ser276 также является мишенью для MSK1 и MSK2 (mitogen- and stress-activated protein kinase), которые осуществляют перекрест с ERK и p38 MAPK-каскадами (Perkins, 2006; Vermeulen et al., 2003). p65 может также подвергаться ацетилированию по разным сайтам (Lys122, 123, 218, 221, 310). При этом ацетилирование Lys218, 221 и 310 способствует трансактивации p65, а ацетилирование Lys122 и 123 приводит к ингибированию его активности. Ацетилирование по Lys310 вместе с фосфорилированием по Ser276 усиливает транскрипционную активность за счет образования сайта связывания с ко-активаторным белком. Ацетилирование по Lys221 препятствует связыванию p65 с I κ B α , усиливая, таким образом, связывание с ДНК (Chen et al., 2002; Chen, Greene, 2004).

Функциональная роль NF- κ B, характер его вовлечения в механизмы адаптации мозга к неблагоприятным факторам

Белки семейства NF- κ B найдены во многих структурах ЦНС. NF- κ B играет важную роль в онтогенезе нервной системы. Индуцибельные p50 димеры и p65/cRel димеры присутствуют в мозге молодых крыс, но отсутствуют в мозге взрослых (Bakalkin et al., 1993). Эти данные свидетельствуют о роли NF- κ B в синаптогенезе и естественной смерти клеток во время развития нервной системы. NF- κ B присутствует в синапсах и постсинаптических мембранах. Стимуляция глутаматом, каинатом, хлоридом калия приводит к перераспределению NF- κ B из аксона в ядро. Следовательно, NF- κ B участвует в передаче синаптической информации в ядро (Grilli, Memo, 1998).

Что касается участия NF- κ B в реакциях нейронов мозга на ишемические и другие патологические воздействия, то следует отметить их немногочисленность и противоречивость. Ранее было обнаружено увеличение экспрессии NF- κ B в нейронах и глиальных клетках гиппокампа вслед за ишемией (Mattson, Meffert, 2006). Авторы связывают это с гибелью клеток. Вместе с тем, тяжелая ишемия подавляет нейрональную экспрессию NF- κ B в течение длительного периода после ишемии (Kaneko T, 2005). Имеются убедительные доказательства, что увеличение экспрессии NF- κ B защищает нейроны гиппокампа от апоптоза, индуцируемого оксидативным стрессом, эксайтотоксическими повреждениями и β -амилоидным пептидом в высоких концентрациях. ПК нейронов и астроглиальных клеток гиппокампа *in vitro* с помощью умеренного оксидативного стресса приводит к экспрессии NF- κ B и предотвращает развитие апоптоза. Показано, что ишемическое ПК индуцирует экспрессию NF- κ B в нейронах мозга (Blondeau et al., 2001). В работе Ravati и соавторов показано, что активация NF- κ B *in vitro*, индуцированная ПК с помощью ксантин/ксантин-оксидазы или FeSO₄, предотвращает развитие апоптоза нейронов (Ravati et al., 2001). При этом происходит также увеличение экспрессии Mn-СОД. Применение эритропоэтина связывают с протекцией от апоптоза, вызванного NMDA или оксидом азота. При этом происходит активация Jak2 (Janus

kinase 2) и NF- κ B, что в результате влечет за собой транскрипцию NF- κ B-зависимых нейропротективных генов (Digicaylioglu, Lipton, 2001). Кроме того, в клетках гиппокампа *in vitro* усиленная экспрессия нейропротективных генов-мишеней NF- κ B - *bcl-2* и *bcl-xl*, по крайней мере, частично опосредует нейропротективное действие NGF в ответ на глутаматную токсичность (Culmsee et al., 2002). Устойчивость к действию оксидативного стресса, вызванного инсулиноподобным фактором роста-1 (IGF-1), обусловлена активацией NF- κ B в клетках гипоталамуса крыс с участием фосфоинозитол-3-киназы (Heck et al., 1999). Нейропротективный эффект отсутствовал при применении ингибиторов NF- κ B и фосфоинозитол-3-киназы, что свидетельствует об активном участии вышеупомянутых факторов в нейропротекции.

NF- κ B участвует в антиоксидантной защите некоторых структур мозга, в частности гиппокампа и коры, регулируя уровень Mn-СОД (Mattson, Meffert, 2006; Mattson, Camandola, 2001). Нейроны трансгенных мышей, гиперэкспрессирующих Mn-СОД, более устойчивы к ишемическому повреждению, вызванному окклюзией сонной артерии (Keller et al., 1998).

NF- κ B может защищать нейроны, индуцируя экспрессию нейротрофических факторов и цитокинов. В частности, TNF α (tumor necrosis factor α) защищает нейроны гиппокампа крыс *in vitro* при глутаматной эксайтотоксичности, глюкозной депривации и предъявлении β -амилоида (Barger et al., 1995; Cheng et al., 1994), и применение kV нокаутной ДНК аннулирует цитопротективный эффект TNF α . NF- κ B содержит сайт связывания в гене нейротрофического фактора BDNF (Lipsky et al., 2001).

Нейропротективное действие NF- κ B связывают также с регуляцией экспрессии белков, участвующих в поддержании гомеостаза внутриклеточного кальция. В электрофизиологических исследованиях, выполненных на нейронах гиппокампа *in vitro*, показано, что NF- κ B может регулировать возбудимость нейронов, изменяя ионные потоки клетки через кальциевые потенциал-зависимые каналы и каналы, связанные с ионотропными глутаматными рецепторами (Furukawa, Mattson, 1998). Предъявление нейронам *in vitro* TNF α в течение 24-48 ч приводит к увеличению плотности потока через потенциал-зависимые кальциевые каналы и к уменьшению глутамат-зависимых потоков. Регулирование экспрессии белков, вовлеченных в регуляцию уровня внутриклеточного кальция, может, таким образом, быть одним из важных механизмов, посредством которого NF- κ B защищает клетки от эксайтотоксичности и апоптоза.

В ряде исследований показано, что отсутствие субъединицы p50 коррелирует с подавлением экспрессии антиапоптотических факторов Bcl-x, Bcl-2, и других белков-ингибиторов апоптоза. Это предположение подтверждается тем фактом, что после фокальной ишемии у крыс, ДНК-связывающая активность NF- κ B сильно уменьшается в дегенерирующих нейронах (Irving et al., 2000b). Нарушение экспрессии генов-мишеней NF-

карраВ в переднем мозге мышей увеличивает нейродегенерацию после нейротоксичных инсультов (Fridmacher et al., 2003). У нокаутных мышей по p50 наблюдаются сильные повреждения пирамидных нейронов гиппокампа и снижена экспрессия TNF- α и Mn-SOD после предъявления им каината.

Таким образом, транскрипционный фактор NF-карраВ активно вовлекается в механизмы толерантности мозга к неблагоприятным факторам. Однако до сих пор слабо изучено его участие в механизмах нейропротективного действия ишемического/гипоксического ПК, являющегося эффективным способом повышения резистентности мозга.

1.4.4. Лиганд-зависимые транскрипционные факторы - глюко- и минералокортикоидные рецепторы

Глюкокортикоидные (ГР) и минералокортикоидные (МР) рецепторы являются лиганд-зависимыми ТФ, которые относятся к семейству рецепторов к стероидным гормонам. Оба типа рецепторов имеют общий эндогенный лиганд – стероидный гормон кортикостерон у грызунов или кортизол – у человека (de Kloet et al., 1998; Reul, de Kloet, 1985).

МР и ГР распространены в мозге неравномерно. Экспрессия МР ограничена, в основном, нейронами лимбической системы. Умеренная экспрессия МР отмечается в нейронах префронтальной области неокортекса и амигдалы, некоторых структурах гипоталамуса. Наиболее высока концентрация МР в гиппокампе (Reul, de Kloet, 1985, Han et al., 2005; Herman et al., 1989; Van Eekelen et al., 1988). Напротив, ГР распространены во всех областях мозга, как в нейронах, так и в глиальных клетках. Наиболее высокая концентрация ГР наблюдается в паравентрикулярном ядре гипоталамуса и гиппокампе (Reul, de Kloet, 1985; de Kloet et al., 1998; Han et al., 2005, Herman et al., 1989; Van Eekelen et al., 1988). Кроме того, МР и ГР ко-локализуются в нейронах гиппокампа (Van Eekelen et al., 1988; Han et al., 2005).

Сродство МР к кортикостероидам в 10 раз выше, чем у ГР (Reul, de Kloet, 1985). Поэтому при низком уровне кортикостероидов в крови (в состоянии покоя) занятыми оказываются в основном МР (70-90 %) (McEwen et al., 1986; Reul, de Kloet, 1985). ГР могут быть активированы только, когда уровень кортикостерона достаточно высок, например, во время суточного пика или во время стрессового воздействия (de Kloet et al., 1998; Lightman, Conway-Campbell, 2010). В нормальных условиях практически все МР насыщены, и МР-опосредованный сигналинг максимален. Увеличение уровня кортизола или кортикостерона не приводит к усилению МР-сигналинга, который ограничен доступностью свободных МР, а не концентрацией лиганда. В то же время, связывающая способность ГР в состоянии покоя мала, и поэтому увеличение уровня гормона приводит к усилению ГР-опосредованного сигналинга.

Таким образом, МР-сигналинг регулируется преимущественно наличием свободных рецепторов, тогда как ГР-сигналинг зависит, в основном, от концентрации гормона.

Структура ГР и МР

В структуре белков ГР и МР можно выделить три функциональные части: высоко-вариабельный трансактивирующий домен (N-терминальный домен) (приблизительно экзон 2), ДНК-связывающий домен (экзоны 3-4) и лиганд-связывающий домен (примерно 5-9 экзоны), которые также содержат транс-активирующий домен. Дополнительно выделяют область «петли».

Трансактивационная область AF-1 (activation function 1) ГР является лиганд-зависимой и играет важную роль во взаимодействии рецептора с факторами, необходимыми для инициации транскрипции: ко-активаторами, модуляторами хроматина и основными факторами транскрипции, включая РНК-полимеразу 2, ТАТА-связывающий белок (ТАТА-binding protein, ТВР) и целый ряд ТВР-связывающих белков (Chrousos, 2004; Zhou, Cidlowski, 2005). ДНК-связывающий домен содержит два мотива по типу «цинковых пальцев», которые служат для связывания со специфическими последовательностями ДНК - glucocorticoid-response elements (GREs), находящимися в промоторных регионах генов-мишеней (Zhou, Cidlowski, 2005; Duma et al., 2006). ДНК-связывающий домен является самым консервативным доменом во всем семействе стероидных рецепторов. ДНК-связывающий домен также содержит последовательности, важные для димеризации и транслокации в ядро (Zhou, Cidlowski, 2005; Duma et al., 2006). «Петля» представляет собой вариабельный регион между ДНК- и лиганд-связывающими доменами. Ее аминокислотный конец является неотъемлемой частью ДНК-связывающего домена и участвует в его димеризации. Лиганд-связывающий домен связывает глюкокортикоиды. Он также содержит второй трансактивационный регион, AF-2, который является лиганд-зависимым, и включает последовательности, необходимые для димеризации, ядерной транслокации, связывания с белками теплового шока и взаимодействия с ко-активаторами (Zhou, Cidlowski, 2005; Duma et al., 2006).

Строение МР аналогично ГР. ДНК-связывающий домен МР на 94% идентичен ДНК-связывающему домену ГР. Лиганд-связывающий домен МР является сложным и многофункциональным. Единственный остаток в позиции 848 в спирали Н7 отвечает за гормональную специфичность между МР и ГР (Li et al., 2005). Учитывая высокий уровень гомологичности между лиганд-связывающими доменами МР и ГР, они имеют практически одинаковый набор ко-активаторов. К ко-активаторам ГР и МР относятся, прежде всего, p300, CBP и p/CAF (p300/CBP-associated factor) (Pascual-Le Tallec et al., 2003). Эти факторы взаимодействуют друг с другом и ТФ из других сигнальных путей, включая CREB, AP-1

(activator protein-1), NF- κ B, p53, Ras-зависимых факторов роста и STATs (signal transducers and activators of transcription).

Регуляция транскрипционной активности ГР и МР

ГР- и МР-опосредуемое действие осуществляется через активацию или репрессию генов-мишеней. Многочисленные взаимодействия на уровне ДНК и взаимодействия с другими белками и ТФ обеспечивают огромное разнообразие и сложность контроля на уровне транскрипции, опосредуемое кортикостероидными рецепторами. Существует несколько способов, посредством которых ГР и МР могут регулировать экспрессию генов-мишеней (Beato, Sanchez-Pacheco, 1996).

Регуляция экспрессии генов-мишеней, прежде всего, может осуществляться за счет связывания кортикостероидных рецепторов с одним, несколькими или сложными GREs, присутствующими в промоторных регионах генов-мишеней (Zilliacus et al., 1995). При этом GREs могут быть как активирующими, так и ингибирующими (Drouin et al., 1993). ГР может модулировать экспрессию генов, не связываясь с GREs, а взаимодействуя как мономер с другими ТФ, такими как AP-1, NF- κ B, p53 и STATs, осуществляя, таким образом, перекрест с другими внутриклеточными сигнальными путями (Scheinman et al., 1995; Kino, Chrousos, 2002). Такое действие ГР не зависит от связывания с ДНК и предполагает модулирование транскрипционной активности путем прямых белок-белковых взаимодействий с индуцибельными или активационными ТФ (Gottlicher et al., 1998). При этом ГР оказывает ингибирующий эффект на транскрипционную активность, опосредуемую другими ТФ (Ray, Prefontaine, 1994; Heck et al., 1994).

Важная роль в регуляции транскрипционной активности также отводится посттрансляционным модификациям, которые могут влиять на стабильность рецептора, внутриклеточную локализацию и взаимодействие ГР и МР с другими протеинами. ГР могут подвергаться фосфорилированию, ацетилированию, убиквитинированию и сумоилированию. ГР содержит несколько сайтов фосфорилирования: Ser113, 141, 203, 211, 226 и 404, большинство которых находится в домене AF-1 (Ismaili, Garabedian, 2004). Фосфорилирование ГР обычно происходит после связывания с лигандом и может влиять на внутриклеточные перемещения ГР, его взаимодействие с ко-факторами, силу и продолжительность ГР-сигналлинга и стабильность рецептора. Уровень фосфорилирования регулирует транскрипционную активность за счет изменения силы белок-белковых взаимодействий. Например, известны белки DRIP150 и TSG101, которые связываются с N-терминальным трансактивационным доменом ГР, и функционируют, как ко-активатор и ко-репрессор ГР, соответственно (Hittelman et al., 1999; Ismaili, Garabedian, 2004). В отсутствие лиганда TSG101 преимущественно связывается с нефосфорилированной формой ГР и защищает ГР от

деградации, в то время как не связанные с TSG101 молекулы ГР подвергаются деградации. Напротив, DRIP150 в основном связывается с гиперфосфорилированной формой ГР и в присутствии лиганда усиливает транскрипционную активность ГР. Фосфорилирование ГР может также играть важную роль в геном-независимой активации цитоплазматических сигнальных путей. Таким образом, фосфорилирование ГР представляет собой универсальный механизм для модулирования и интегрирования многочисленных функций рецептора (Ismaili, Garabedian, 2004). Напротив, фосфатазы PP1, PP2a и PP5 могут снижать уровень фосфорилирования ГР (Ismaili, Garabedian, 2004).

Помимо фосфорилирования активность ГР регулируется путем убиквитинирования и протеосомальной деградации, в результате действия которых увеличивается скорость распада и синтеза ГР, происходит ингибирование и уменьшение его транскрипционной активности (Deroo et al., 2002). ГР может подвергаться ацетилированию в интервал времени после связывания с лигандом и до перемещения в ядро (Ito et al., 2006), сумоилированию (Le Drean et al., 2002).

Для МР также характерны посттрансляционные модификации. Сайты фосфорилирования МР, Tyr735 и Ser737, находятся в лиганд-связывающем домене и участвуют в конформационных изменениях этого домена (Hirschberg et al., 2004). Также для МР были обнаружены сайты сумоилирования в позициях Lys89, 399, 494 в трансактивирующем домене и в позиции Lys953 лиганд-связывающего домена (Pascual-Le Tallec et al., 2003). Сумоилирование приводит к репрессии МР-опосредуемой экспрессии генов. Ацетилирование МР может нарушать процесс перемещения молекул МР из цитоплазмы в ядро, а также влиять на белок-белковые взаимодействия и, как следствие, последующую регуляцию транскрипции. МР может подвергаться убиквитинированию с последующей деградацией в протеосомах, что представляет собой один из важных механизмов регулирования МР-зависимой транскрипции (Tirard et al., 2007).

Внутриклеточные пути ГР и МР

В отсутствие внешнего сигнала ГР и МР локализуются в цитоплазме. Кортикостероидные рецепторы являются частью мультипротеинового комплекса, состоящего из молекулы рецептора и нескольких молекул белков теплового шока HSP (2 молекулы HSP90, одна молекула HSP70, одна молекула HSP56 и иммунофилин) (Hutchison et al., 1994; Smith, Toft, 1993). Связывание комплекса с глюкокортикоидами приводит к цепи событий, состоящей из диссоциации белков теплового шока и иммунофилина, многочисленных этапов фосфорилирования, увеличения аффинности рецепторов к ядерным доменам (Munck et al., 1990) и их транслокации в ядро (Beato, Sanchez-Pacheco, 1996; Pratt, 1993). Внутри ядра рецепторы в виде гомодимера связываются с GRE в промоторных регионах генов-мишеней и регулируют их экспрессию положительно или негативно, в зависимости от последовательности

GRE и промоторного контекста (Bamberger et al., 1996; Schaaf, Cidlowski, 2002). ГР, связанный с GRE, за счет своих доменов AF-1 и AF-2, облегчает формирование главного комплекса транскрипции и, таким образом, стимулирует транскрипционную активность генов-мишеней (Beato M, 1996). К мишеням ГР и МР относятся гены про- и анти-апоптотических белков семейства Bcl-2, нейротрофических факторов BDNF и NGF, белков кальциевых каналов (Almeida et al., 2000; Hassan et al., 1996; Nair et al., 1998). Через геном-зависимый путь изменяется ток ионов кальция в нейронах гиппокампа (Karst et al., 2005). Через геном-зависимый путь функциональные характеристики нейронов гиппокампа изменяются медленно и на длительный период.

Не-геномные эффекты рецепторов ГР и МР

Геномные эффекты медленны, и первый физиологический ответ проявляется только через 15 минут, а часто через часы (Haller et al., 2008). Это находится в резком контрасте с реальными наблюдениями по действию кортикостероидов в нейронах, самые быстрые из которых наблюдаются уже через секунды и минуты (Groeneweg et al., 2011; Karst et al., 2005; Di et al., 2003). Таким образом, можно предположить, что существует альтернативный способ действия кортикостероидов, который вовлекает геном-независимые ГР и МР-опосредованные пути. В последнее время появляются данные о том, что глюкокортикоиды также могут реализовывать свое действие и не-геномным путем на клеточные процессы и оказывать более быстрые эффекты (Karst et al., 2005). На нейронах *in vitro*, подвергнутых клеточному стрессу, обнаружена корреляция между уровнем мРНК МР и MAPK (Kang et al., 2009; Macleod et al., 2003). Кроме того, кортикостерон быстро и обратимо увеличивает трансмиссию глутамата в нейронах области CA1 гиппокампа, и этот эффект отсутствует у МР-нокаутных мышей или после предъявления антагонистов МР (Karst et al., 2005). Аналогичные ГР-зависимые эффекты наблюдались в амигдале (Karst et al., 2010). Таким образом, МР и ГР имеют альтернативную функцию в качестве медиаторов не-геномного кортикостероидного сигналинга. МР, в основном, присутствуют в ядерных компартментах. Однако часть МР может перемещаться из ядра и цитоплазмы в клеточную мембрану (Karst et al., 2005). Согласно данным литературы, молекулы рецептора локализуются в пресинаптической мембране и связаны с ERK1/2 внутриклеточным путем (Olijslagers et al, 2008). Важно, что сродство мембранных МР в гиппокампе в 10 раз ниже, чем у МР, которые опосредуют геномные эффекты в тех же клетках (Karst, H. et al. 2005). За счет такого низкого сродства активация рецептора становится возможной при очень высоких концентрациях гормона – во время циркадного пика или при воздействии стресса. Эта популяция МР значительно расширяет динамический круг функционирования МР в мозге, в частности, в реакциях нейронов гиппокампа на стрессорные воздействия. Таким образом, обнаруженные новые данные приводят к представлению, что

мембранные МР в гиппокампе контролируют начальную адаптивную стресс-реакцию, в то время как ГР необходимы для развития последующей адаптивной фазы (Groeneweg et al., 2011; Joels et al., 2007; de Kloet et al., 1998).

Функциональная роль ГР и МР, характер их вовлечения в механизмы адаптации мозга к неблагоприятным факторам

Согласно данным литературы, ГР и МР гиппокампа играют важную роль в регуляции гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС) (de Kloet et al., 1998, 2005; Jankord, Herman, 2008; Pryce, 2008; Rogalska, 2010). Их согласованная активность направлена на нормальное функционирование 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., 1998, 2005; Rogalska, 2010; Rybnikova et al., 2007a). МР гиппокампа индуцируют тоническое ингибирование активности ГГАС, а ГР в зубчатой извили вовлечены в механизмы глюкокортикоидной отрицательной обратной связи (de Kloet et al., 2005; Pryce, 2008; Rogalska, 2010). Нарушение баланса между ГР и МР является причиной дисрегуляции ГГАС и приводит к проявлению стресс-обусловленных психических заболеваний (депрессия, посттравматическое стрессовое расстройство и др.) (Rogalska, 2010; De Kloet, 1991; Sapolsky, 2000).

Согласованная активация кортикостероидных рецепторов необходима для протекания процессов обучения и памяти (Lai et al., 2007; McEwen, Sapolsky, 1995; Rogalska, 2010). МР участвуют в процессе запоминания (восприятие, оценка информации и выбор ответной реакции) (Oitzl, de Kloet, 1992), а ГР вовлечены в процесс консолидации приобретенной информации (Oitzl, de Kloet, 1992). На трансгенных мышах, гиперэкспрессирующих МР во фронтальной области неокортекса, было показано, что у них пространственная память развита лучше, чем у дикого типа животных (Lai et al., 2007).

Большое значение имеет соотношение ГР и МР в механизмах гибели/выживания нейронов гиппокампа при действии экстремальных факторов (Almeida et al., 2000; Crochemore 2005; Hassan et al., 1996; Rogalska, 2010). Чрезмерная активация ГР увеличивает чувствительность нейронов гиппокампа к повреждающим воздействиям, в частности, к эксайтотоксичности и ишемии (Goodman et al., 1996; Sapolsky, 2000; Sapolsky, Pulsinelli, 1985). Активированные ГР могут усиливать повреждающее действие потенциальных нейротоксинов, таких как возбуждающие аминокислоты и активные формы кислорода (Almeida et al., 2000; Behl et al., 1997; Lu et al., 2003a). Активированные ГР стимулируют или ингибируют экспрессию генов, вовлеченных в ответные реакции на гипоксию - гены белков-транспортёров глюкозы-3 и эндотелиального фактора роста сосудов (Kodama et al., 2003; Leonard et al., 2005). Способствуя увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (Nair et al., 1998) и образованию

свободных радикалов (McIntosh, Sapolsky, 1996) активированные ГР переводят клетку в иное функциональное состояние и могут вызвать Са-зависимый протеолиз, перекисное окисление липидов, оксидативный стресс, дисфункцию митохондрий, и в крайнем случае – апоптоз (Almeida et al., 2000; Haynes et al., 2001). Это подтверждается рядом исследований. В частности, предъявление высоко-специфического агониста ГР – DEX (dexamethasone) крысам приводит к апоптозу клеток гиппокампа, при этом наблюдаются сопутствующие изменения в соотношении про- (Bax) и анти-апоптотических (Bcl-2, Bcl-xL) белков (Almeida et al., 2000). Взаимодействие ГР с белками семейства Bcl-2 может опосредоваться белком-супрессором опухоли p53 (Sloviter et al., 1989; Woolley et al., 1991) и индуктором клеточной гибели - Bax (Miyashita et al., 1994), который является также ингибитором Bcl-2 (Miyashita et al., 1994). Напротив, ингибирование ГР с помощью RU486 (Antonawich et al., 1999) или удаление эндогенных глюкокортикоидов с помощью адреналэктомии (Sapolsky, Pulsinelli, 1985) снижает гибель нейронов в области CA1 гиппокампа после ишемии.

Вместе с тем, активацию МР связывают с выживанием нейронов. Считают, что МР оказывает, в противоположность ГР, нейропротективный эффект. В частности, экспрессия МР значительно повышена через 4-7 дней после ишемии/реперфузии в астроглии и микроглии области CA1 гиппокампа (Hwang et al., 2006). После действия стауроспорина или гипотермической кратковременной глобальной ишемии в нейронах неокортекса и гиппокампа наблюдается усиление экспрессии МР (мРНК и белка). В обоих случаях увеличение уровня экспрессии МР коррелирует с выживаемостью нейронов, а применение спиронолактона (антагониста МР) отменяет протективный эффект (MacLeod et al., 2003). Аналогично, на культуре клеток PC12 показано, что оверэкспрессия МР предотвращает стауроспорин-индуцированную или опосредованную глюкозной депривацией гибель клеток, а спиронолактон аннулирует этот эффект (Lai et al., 2005). Напротив, ингибирование МР приводит к гибели нейронов гиппокампа (McCullers, Herman, 2001).

Одним из механизмов нейропротективного действия МР является его прямое влияние на транскрипционную активность генов. Активация МР приводит к снижению транскрипции субъединицы кальциевых каналов L-типа и P/Q типа, а также изменяет соотношение генов, кодирующих субъединицы NMDA-рецепторов (NR2A и NR2B), приводя к общему снижению активности NMDA-рецепторов и уменьшению тока Ca^{2+} (Nair et al., 1998). Кроме того, МР увеличивает экспрессию белков-ингибиторов апоптоза Bcl-2 и Bcl-xL (Almeida et al., 2000), нейротрофических факторов, например, фактора роста нервов и основного фактора роста фибробластов, а также изменяет экспрессию про-апоптотического белка p53 (Almeida et al., 2000; Hansson et al., 2000; McCullers, Herman, 1998). Блокирование МР с помощью спиронолактона приводит к уменьшению уровня мРНК Bcl-2 (McCullers, Herman, 1998). Таким

образом, активация МР участвует в нейропротективных механизмах и способствует выживанию нейронов после различных повреждений. Активация МР предотвращает повреждающее действие, оказываемое чрезмерной экспрессией ГР на выживаемость нейронов (Almeida et al., 2000; Hassan et al., 1996). Сдвиг соотношения ГР и МР в сторону увеличения экспрессии МР, наряду с ингибированием ГР, защищает нейроны от ишемического инсульта (Krugers et al., 2000).

В последние годы внимание исследователей все больше привлекает выяснение роли ГР и МР в механизмах гибели/выживания нейронов мозга в ответ на ишемические/гипоксические воздействия. Однако до сих пор крайне мало работ, посвященных влиянию гипоксического ПК на экспрессию этих рецепторов (Rybnikova et al., 2011).

1.5. Про-адаптивные белки BDNF и Bcl-2

Поскольку одной из основных функций ТФ является активация про-адаптивных генов и индукция экспрессии их белков, то целесообразным представляется проведение исследований паттерна экспрессии ряда таких белков при действии различных режимов гипобарической гипоксии. С этой целью были выбраны два про-адаптивных белка – нейротрофический фактор BDNF и анти-апоптотический фактор Bcl-2, гены которых являются мишенями для вышеуказанных ТФ, и роль этих белков в нейропротективных механизмах установлена (Marini et al., 1998, 2007; Mattson, 2008; Han, Holtzman, 2000; Gillies, Kuwana, 2014; Ouyang, Giffard, 2004; Gewies, 2003).

1.5.1 Нейротрофический фактор BDNF

BDNF – член семейства нейротрофических факторов, играющих важную роль в процессах дифференциации и выживания нейронов, модулирования синаптической трансмиссии и синаптической пластичности (Greenberg et al., 2009; Park, Poo, 2013). Семейство нейротрофических факторов включает также фактор роста нервов и нейротрофины 3 и 4. Биологическая роль BDNF зависит от его взаимодействий с двумя типами трансмембранных рецепторов: тирозин-киназных рецепторов B (Trk B, которые обладают высоким сродством к BDNF) и пан-нейротрофических рецепторов (p75) (обладающих низким сродством к BDNF). При этом в большей степени BDNF реализует свое действие чрез Trk B рецепторы. Активация p75-рецептора может инициировать как про-адаптивный внутриклеточный сигнальный каскад реакций, опосредуемый NF-κарраВ, так и способствовать развитию апоптоза за счет активации Jun киназы (Chao, 2003). Связывание BDNF с Trk B рецепторами инициирует их димеризацию, трансфосфорилирование тирозиновых остатков в их цитоплазматическом домене (Patapouroutian, Reichardt, 2001). Фосфорилированные тирозиновые остатки Trk B являются связывающим сайтом для специфических цитоплазматических сигнальных молекул. Возможность большого

числа эффекторов взаимодействовать с тирозиновыми остатками представляет собой один из ключевых механизмов плейотропного эффекта BDNF. В результате связывание BDNF с TrkB рецепторами происходит активация трех основных внутриклеточных сигнальных каскадов - опосредуемого фосфолипазой C (PLC γ), MAPK/ERK (mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) и фосфоинозитид-3-киназой/протеин киназой B (Akt) (Kaplan, Miller, 2000; Chao, 2003; Reichardt, 2006) (рис. 3).

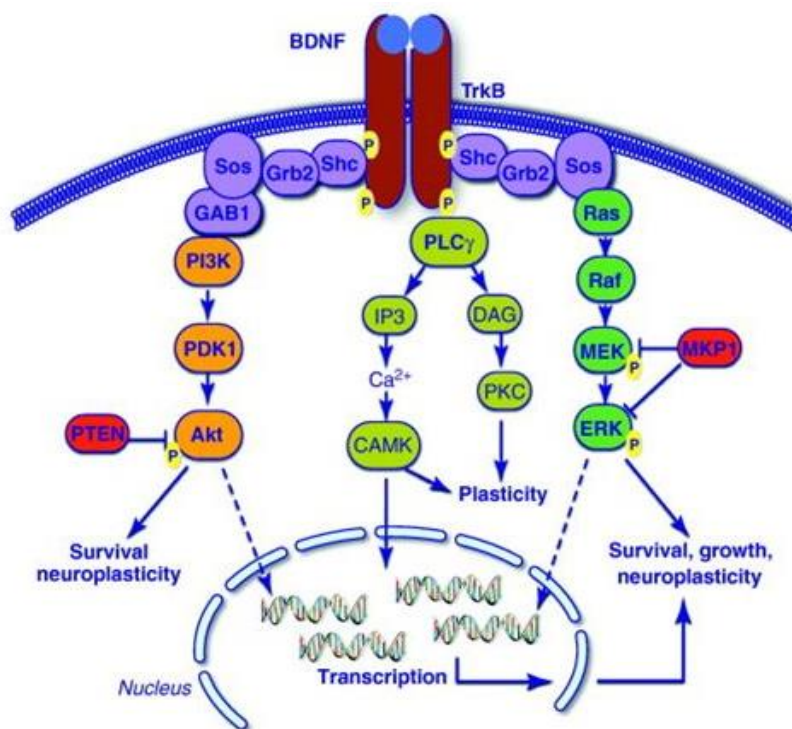


Рис 3. BDNF-опосредуемые сигнальные пути (Duman, Voleti, 2012).

Внутриклеточный путь, опосредуемый фосфолипазой C, стимулирует высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо и активацию Са-кальмодулин-зависимой киназы II (CaMKII). Повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} является одним из важнейших эффектов, оказываемых BDNF на клетку. Индукция MAPK-каскада реакций приводит к фосфорилированию ERK, которая перемещается в ядро и активирует ряд ТФ, осуществляя регуляцию экспрессии генов в клетке. Известно, что таким образом ERK может активировать ТФ CREB (Finkbeiner et al, 1997; Ying et al, 2002). Кроме того, BDNF модулирует возбудимость плазматической мембраны, изменяя кинетику глутаматэргических NMDA-рецепторов и GABA (γ -aminobutyric acid)-рецепторов (Rose et al., 2004) и увеличивая количество AMPA-рецепторов на поверхности плазматической мембраны (Narisawa-Saito et al., 2002). Модулирование возбудимости плазматической мембраны происходит также за счет TrkB-зависимой активации фосфолипазы C и последующего изменения активности неселективных каналов для катионов (Li et al., 1999), регулирования пропускной способности натриевого канала Na^+ (Blum et al., 2002), увеличения пропускной способности потенциал-зависимых и G-белок-управляемых

калиевых каналов (Tucker, Fadool, 2002).

Действие BDNF регулируется наличием обратных связей. В частности, BDNF может усиливать транскрипцию собственного гена через активацию CREB (Finkbeiner et al., 1997; West et al., 2002), увеличивать количество TrkB-рецепторов на поверхности плазматической мембраны (Naarasalo et al., 2002), а также регулировать высвобождение BDNF из клетки (Canossa et al., 1997). Продолжительное действие BDNF на TrkB-рецепторы активирует обратную отрицательную связь и приводит к снижению количества TrkB-рецепторов на поверхности плазматической мембраны (Frank et al., 1996).

Таким образом, BDNF активирует ключевые внутриклеточные сигнальные пути, которые могут согласованно регулировать внутриклеточные процессы и изменять проводниковые свойства плазматической мембраны, что необходимо для регулирования синаптической пластичности, формирования памяти (Segal, Greenberg, 1996; Huang, Reichardt, 2001; Gómez-Palacio-Schjetnan, Escobar., 2013; Gray et al., 2013). Известно, что индукция каскада реакций, опосредуемых фосфолипазой C (Minichiello et al., 2002; Gartner et al., 2006), MAPK/ERK (Sweatt, 2001), протеин киназой B (Lin et al., 2001), а также активация ряда ТФ, CREB (Barco et al., 2002) и NF-kappaB (Merlo et al., 2005), играют важную роль в регуляции синаптической пластичности, процессах обучения и формирования памяти. Важная роль действия BDNF принадлежит поддержанию жизнеспособности популяций нейронов и сохранению структуры их дендритов (Ghosh et al., 1994; Mamounas et al., 1995). BDNF играет важную роль в предотвращении апоптоза нейронов гиппокампа и гранулярных клеток мозжечка (Minichiello, Klein, 1996), стимулирует нейрогенез в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа (Scharfman et al., 2005). BDNF-опосредуемая активация Ras (small GTPase), также играет важную роль в выживании нейронов (Kaplan, Miller, 2000). Rsk (ribosomal s6 kinase) – одна из киназ MAPK/ERK пути, может фосфорилировать и ингибировать, таким образом, про-апоптотический белок Bad, препятствуя индукции программы апоптоза и вместе с тем фосфорилировать и активировать CREB, что приводит также к индукции экспрессии антиапоптотического фактора Bcl-2 (Bonni et al., 1999). Путь, опосредуемый фосфоинозитид-3-киназой, также опосредует нейропротективный эффект BDNF в нейронах гиппокампа (Zheng, Quirion, 2004). В частности, Akt фосфорилирует и ингибируют про-апоптотический белок Bad (Datta et al., 1997). В результате активации данных внутриклеточных каскадов происходит активация экспрессии ряда генов, в том числе, генов про-адаптивных белков (Bcl-2), антиоксидантов (Mattson et al., 1995; Koponen et al., 2004).

Поскольку нейротрофический фактор BDNF играет важную роль в нейропластичности и нейропротективных механизмах, то, очевидно, он играет важную роль и в предотвращении гибели нейронов при повреждающих воздействиях. В частности было показано, что уровень

экспрессии BDNF снижен после ишемии в нейронах гиппокампа (Takeda et al, 1993). BDNF может протектировать нейроны CA1 гиппокампа от действия повреждающей ишемии (Beck et al., 1994). BDNF опосредует нейропротективное действие ишемического ПК (Marini et al., 2007). В перинфарктной области наблюдалось усиление экспрессии BDNF после ишемии (Kokaia et al., 1995).

Однако, данные литературы, касающиеся вовлечения BDNF в нейропротективные механизмы гипоксического и ишемического ПК, малочисленны.

1.5.2 Анти-апоптотический фактор Bcl-2

Белки семейства Bcl-2 играют ключевую роль в регуляции апоптоза путем сложных взаимодействий, которые определяют проницаемость и целостность наружной митохондриальной мембраны (Chipuk et al., 2010; Green et al., 2002; Gillies, Kuwana, 2014). В семействе Bcl-2 выделяют три основные группы белков (Chipuk et al., 2010). Первую группу составляют анти-апоптотические факторы Bcl-xL, Bcl-2, Bcl-w и Mcl-1. Они содержат четыре Bcl-2-гомологичных (BH1-BH4) домена и трансмембранный домен. За счет С-терминального гидрофобного конца трансмембранного домена молекулы белков антиапоптотической группы удерживаются на поверхности мембраны (Wattenberg, Lithgow, 2001). Антиапоптотические факторы этой группы семейства Bcl-2 регулируют проницаемость митохондриальной мембраны для цитохрома С и других апоптотических факторов и сохраняют ее целостность. Вторая группа белков включает Вах и Вак, которые содержат три домена (BH1-BH3), но не имеют BH4. За счет этого они могут взаимодействовать с белками первой анти-апоптотической группы. Вах и Вак опосредуют про-апоптотическое действие за счет того, что встраиваются в митохондриальную мембрану и образуют в ней поры, через которые выходит цитохром С и другие про-апоптотические факторы, а также за счет их взаимодействия с про-апоптотическими белками третьей группы семейства. К третьей группе белков относятся белки, имеющие только BH3 домен (BH3-only-белки). Ее составляют Bad, Bid, Bim, Bik, Hrk, Noxa, Bmf, Puma (Cory, Adams, 2002). Данные факторы могут взаимодействовать как с про-, так и с анти-апоптотическими факторами, усиливая действие первых и ингибируя функцию вторых (Chipuk et al., 2010).

Митохондриальный апоптоз индуцируется в ответ на действие клеточного стресса (повреждение ДНК, повреждение митохондриальной мембраны, отсутствие факторов роста). Известно, что ключевую роль в индукции этого процесса отводится Вах-подобным белкам, которые непосредственно встраиваются в митохондриальную мембрану и образуют поры, через которые в цитоплазматическое пространство выходит цитохром С (Cory, Adams, 2002) (рис. 4). BH3-only-белки стимулируют олигомеризацию и встраивание в митохондриальную мембрану про-апоптотических белков Вах и Вак.

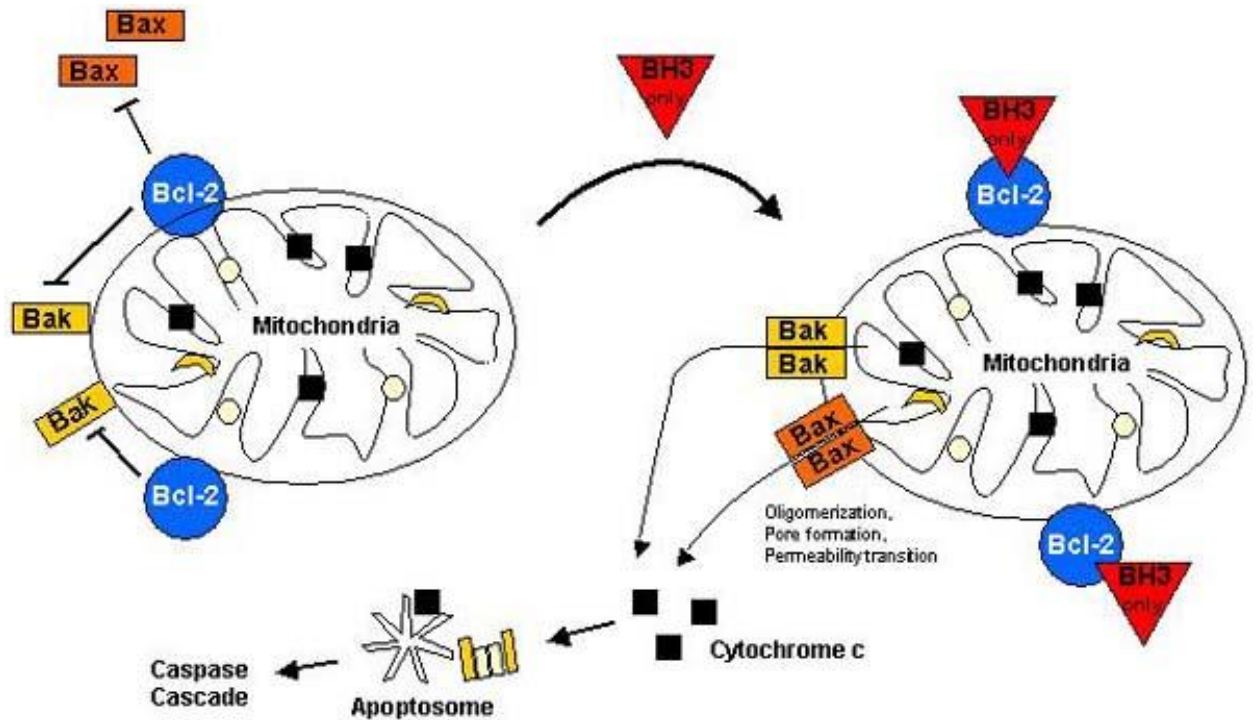


Рис 4. Схема действия белков семейства Bcl-2 на поверхности внешней митохондриальной мембраны (Gewies, 2003).

Высвободившийся из митохондрии цитохром С взаимодействует с APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) и индуцирует его олигомеризацию, вследствие чего он оказывается способным связываться с про-каспазой 9. В результате, формируется олигомерный комплекс - апоптосома, состоящий из нескольких молекул белка APAF1, цитохрома С и про-каспазы 9. Внутри данного комплекса молекулы про-каспазы 9 сближаются, и происходит их аутокатализ путем ограниченного протеолиза до активной формы фермента – каспазы 9. В свою очередь, каспаза 9 активирует аналогичным образом следующие каспазы 3, 6, 7 (Riedl et al., 2007). Эти каспазы далее расщепляют ряд структурных элементов клетки (ядерную мембрану, цитоплазматические белки) и активируют эндонуклеазу, которая осуществляет фрагментацию ДНК. Помимо цитохрома С из митохондрий высвобождается целый ряд других про-апоптотических молекул: апоптоз-индуцируемый фактор (AIF), участвующий в конденсации хроматина и активирующий ДНК-азу (Susin et al., 1997); эндонуклеаза G, осуществляющая фрагментацию ДНК.

Вместе с тем, белки анти-апоптотической группы Bcl-2 взаимодействуют с про-апоптотическими белками группы Bax и ингибируют их действие, не позволяя им встраиваться в митохондриальную мембрану и образовывать поры. Таким образом, антиапоптотические белки группы Bcl-2 выступают в качестве антагонистов про-апоптотической группы Bax-белков и являются основными участниками в предотвращении индуцированного апоптоза при действии повреждающих воздействий. В частности, ишемическое ПК индуцирует увеличение

экспрессии Bcl-2, и этот эффект во многом обусловлен активацией CREB (Meller et al., 2005). Наряду с этим, ишемическое ПК также снижает выход цитохрома C из митохондрий в цитоплазму после летальной ишемии (Nakatsuka et al., 2000; Tanaka et al., 2004). Блокирование гена *bcl-2* при помощи анти-смысловых олигонуклеотидов снижает нейропротективный эффект ишемического ПК (Shimizu et al., 2001). Таким образом, анти-апоптотический фактор Bcl-2 выполняет нейропротективную роль при ряде повреждающих воздействий, в том числе гипоксии/ишемии. Однако его вовлечение в механизмы ПК, создаваемого умеренной гипобарической гипоксией, недостаточно изучено.

Таким образом, анализ данных литературы свидетельствует о том, что активационные (pCREB, NF- κ B) и лиганд-зависимые (MP, GR) ТФ, наряду с индуцибельными ТФ, участвуют в процессах выживании нейронов чувствительных образований мозга в ответ на различные повреждающие воздействия, в том числе гипоксию. Нервная клетка представляет собой сложно организованную систему, все звенья метаболизма которой синхронизированы. Действие любого адаптогенного стимула приводит к активации внутриклеточных механизмов, направленных на стабилизацию гомеостаза, устранение причины возникновения его дисбаланса, а также подготовку к возможному последующему действию повреждающих стимулов. ТФ – одно из важнейших звеньев этого механизма. Они осуществляют свое нейропротективное действие через индукцию экспрессии генов про-адаптивных белков, к которым относятся антиапоптотические факторы семейства Bcl-2, нейротрофины, антиоксиданты, белки теплового шока и др. ТФ могут взаимодействовать друг с другом, усиливая транскрипционную активность друг друга и, следовательно, кооперативно изменяя транскрипцию генов мишеней. В частности, исследуемые ТФ (pCREB, NF- κ B, MP) имеют общие гены-мишени - *bdnf*, *bcl-2* (Pugazhenthil et al., 2000; Culmsee et al., 2002; Almeida et al., 2000; Tao et al., 1998), продукты которых являются про-адаптивными белками. Поэтому для достижения максимального нейропротективного эффекта, индуцируемого ПК, важное значение имеет совместное действие этих ТФ (Самойлов, Рыбникова, 2012). Показано, что в ответ на различные виды ПК происходит активация экспрессии исследуемых ТФ (Самойлов, Рыбникова, 2012; Самойлов и др, 2012; Mabuchi et al. 2001; Nakajima et al., 2002; Blondeau et al., 2001; Ravati et al., 2001; Macleod et al., 2003). Вместе с тем, мало известно о паттерне экспрессии данных ТФ в ответ на повреждающее действие гипобарической гипоксии и об их вовлечении в механизмы гипоксического ПК. Эффективность самого гипоксического ПК (по предотвращению последствий тяжелого повреждающего воздействия) зависит от ряда параметров, в частности, количества сеансов умеренной гипобарической гипоксии. При разработке способов применения гипоксического ПК в качестве немедикаментозного средства профилактики и лечения ряда неврологических заболеваний необходим подбор оптимального режима, эффективно влияющего на паттерн экспрессии ТФ и про-адаптивных белков, участвующих в формировании механизмов гипоксической толерантности нейронов мозга. Учитывая вышеизложенное, задачей настоящей работы явилось исследование влияния гипобарической гипоксии, предъявляемой животным в различных режимах, на характер экспрессии ряда активационных и лиганд-зависимых ТФ, а также продуктов некоторых их генов-мишеней - про-адаптивных белков, в наиболее чувствительных к гипоксии образованиях мозга (неокортексе и гиппокампе).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на взрослых самцах крыс *Rattus norvegicus* линии Вистар весом 200-250 г., содержащихся в стандартных условиях (температура окружающей среды 18-25 °С, 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.

2.1. Модель гипобарической гипоксии

Гипобарическая гипоксия – гипоксическое воздействие, вызываемое общим падением давления в окружающей атмосфере. Встречается в естественных условиях при подъеме в горы. Создаваемая в барокамере гипобарическая гипоксия может рассматриваться как имитация подъема на соответствующую высоту. В работе мы использовали гипобарическую гипоксию в двух режимах – тяжелой повреждающей и умеренной прекондиционирующей. Варьируя количество предъявляемых сеансов умеренной гипобарической гипоксии можно создать несколько режимов прекондиционирования (ПК).

2.1.1. Режим тяжелой повреждающей гипоксии

Для создания условий тяжелой повреждающей гипоксии (ТГ) животных помещали в барокамеру проточного типа (рис. 5) при давлении 180 мм.рт.ст, что соответствует подъему на высоту 11.000 м, на 3 часа. Подъем на соответствующую высоту производили, начиная с 760 мм.рт.ст и далее ступенчато понижая давление на 100 мм.рт.ст. каждую минуту до достижения отметки в 180 мм.рт.ст. Данный способ подъема помогал избежать резкого перепада давления и давал возможность крысам адаптироваться. Каждые 20 мин осуществляли продув камеры воздухом (в течение 2-3 мин) для предотвращения развития гиперкапнии. В условиях ТГ погибало в среднем около 50% животных.

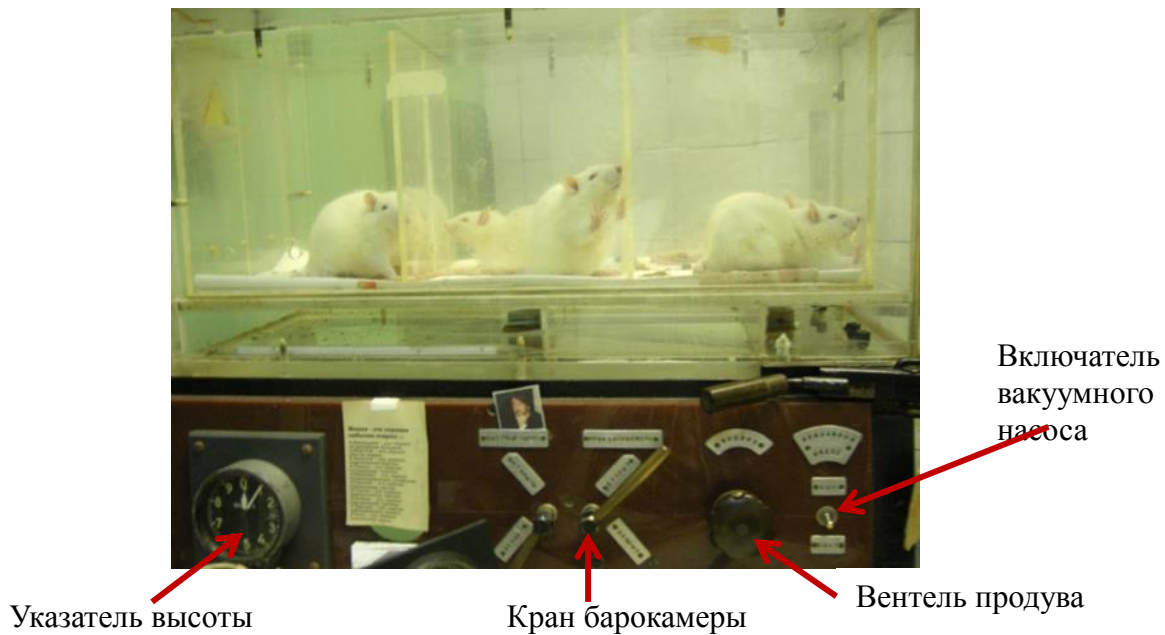


Рис.5. Барокамера проточного типа для создания гипобарической гипоксии в различных режимах.

2.1.2. Режим прекондиционирования

С целью создания прекондиционирующего воздействия применяли умеренную гипобарическую гипоксию (УГГ). При этом давление в барокамере составляло 360 мм рт.ст., что соответствует подъему на высоту 5.000 м, продолжительность воздействия составляла 2 ч (рис. 6). Разным группам предъявляли различное количество сеансов УГГ. В частности, в работе было использовано однократное или трехкратное воздействие УГГ. В последнем случае крыс в течение трех дней помещали в барокамеру на 2 ч каждый день в одно и то же время, так что интервал между сеансами УГГ составлял 24 ч. УГГ, однократная и трехкратная, не приводили к гибели животных во время эксперимента. Если УГГ использовали в качестве ПК-воздействия, то крыс подвергали воздействию ТГ через 24 ч после последнего предъявления УГГ. В эксперименте, когда животные подвергались действию однократного ПК и последующей ТГ, погибало примерно 50% животных. В случае трехкратного ПК смертность животных после ТГ сокращалась до 15%.

Все животные были разделены на 6 экспериментальных групп:

- 1 - крысы, подвергнутые действию ТГ;
- 2, 3 - крысы, подвергнутые действию умеренной гипоксии однократно или трехкратно;
- 4, 5 - крысы подвергнутые действию ТГ через сутки после последнего сеанса однократного или трехкратного ПК;
- 6 - контрольная группа животных.

Контрольная группа животных – животные, помещенные в барокамеру на 2 ч без изменения атмосферного давления.

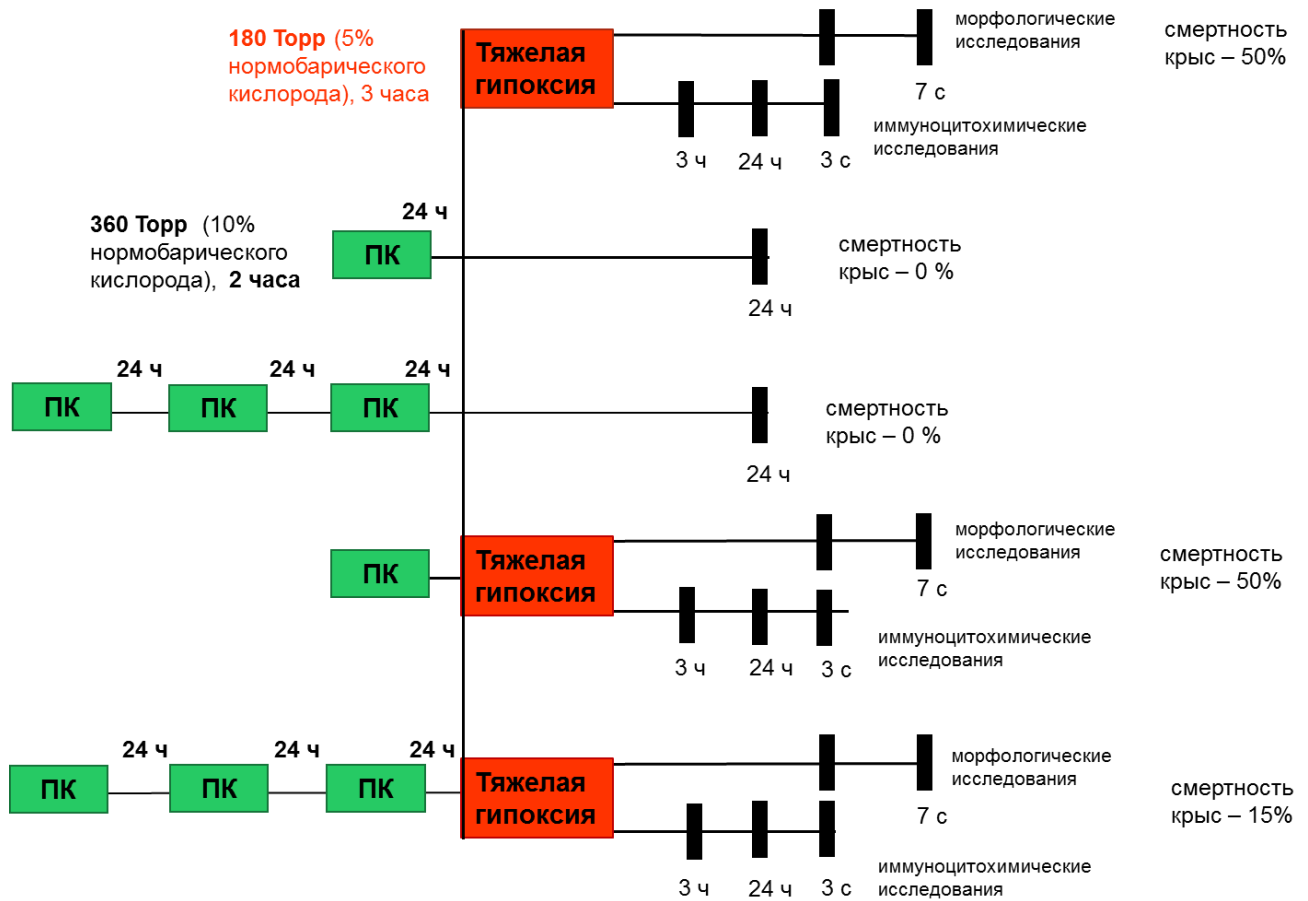


Рис.6. Схемы предъявления гипобарической гипоксии в различных режимах.

Для проведения эксперимента было взято 120 крыс: по 6 животных в каждой экспериментальной группе на каждом временном сроке; в контрольной группе животных было 8-12 крыс. Животных декапитировали через 3, 24 ч и 3, 7 суток после ТГ, через 24 ч после последнего сеанса УГГ. Далее при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ быстро извлекали мозг, выделяли области гиппокампа с прилежащим фронтопариетальным неокортексом и помещали их в фиксирующий раствор. Образцы ткани мозга далее обрабатывали согласно стандартному гистологическому протоколу.

2.2. Гистологическая обработка ткани и изготовление парафиновых срезов мозга.

Образцы ткани мозга фиксировали в молекулярном фиксаторе FineFIX (28 частей концентрата безформалинового молекулярного фиксатора FineFIX (Milestone, Italy) и 72 частей этилового спирта) в течение 1 ч при комнатной температуре и затем в течение 24-48 ч при $+4^{\circ}\text{C}$. Затем образцы промывали в проточной воде в течение 1-2 ч и обезвоживали, проводя через этиловые спирты возрастающей концентрации ($50^{\circ} \rightarrow 70^{\circ} \rightarrow 80^{\circ} \rightarrow 96^{\circ} \rightarrow 96^{\circ}$ по 1 ч в каждом) и бутанол (1ч \rightarrow 12 ч). Затем материал проводили через 4 порции ксилола (по 15 мин в каждой) и заливали в парафиновые блоки (3 порции парафина, по 45 мин. в каждой). Пропитку и заливку препаратов в парафиновые блоки проводили в термостате при $+56^{\circ}\text{C}$. Далее 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, покрытым слоем клеящей белковой смеси (2 части куриного белка и 1 часть глицерина) и высушивали в термостате при температуре 37°C в течение ночи.

Для проведения иммуноцитохимической реакции или окрашивания препаратов по методу Ниссля, препараты депарафинизировали по следующему протоколу: ксилол (2 смены по 5 мин. каждая), далее регидратация в спиртах нисходящей концентрации (98°→98°→95°→50°→50° по 5 мин. в каждом). Затем срезы помещали в фосфатный буфер на 5 мин.

2.3. Гистологические методы исследования

2.3.1 Окрашка по методу Ниссля

Окрашка по методу Ниссля – один из основополагающих гистологических методов, применяемых для морфологических исследований нервной ткани на светооптическом уровне. Метод основан на перекрашивании фиксированных в спирте срезов основным анилиновым красителем с последующим отмыванием его избытка спиртом. При этом составные части клеток сильнее удерживают краситель, чем масса волокон, которая дифференцируется быстрее, в результате чего интенсивно окрашенный клеточный материал резко выделяется на бесцветном фоне. В окрашивании клеток участвуют как ядерные структуры, так и вещества, находящиеся в цитоплазме нервных клеток,— тигроидные глыбки, или вещество Ниссля. Данный метод позволяет выявлять структурно-функциональные изменения нейронов на светооптическом уровне. В нашей работе с использованием метода Ниссля проводилась оценка морфологических характеристик нейронов фронто-париетального неокортекса, а также дорзального (поле CA1) и вентрального (поле CA3/CA4) гиппокампа.

Для окрашивания по методу Ниссля фиксация незначительно отличалась от п.2.2. Образцы ткани мозга крыс фиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0.1М фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 1-2 дней при 4°C. Фосфатный буфер (PBS): 2.7 г Na_2HPO_3 , 0.4 г NaH_2PO_4 , 8 г NaCl на 1 л дистиллированной воды. Далее процедура соответствовала описанной выше (п.2.2.). После удаления парафина, препараты окрашивали в водном 0.1%-м растворе толуидинового синего несколько минут над пламенем спиртовки. Далее смывали краситель со срезов дистиллированной водой и дифференцировали окраску в 96° этаноле, нагретом до 50 ° C (2 раза по 5 мин). После того, как срезы заметно бледнели, их дегидрировали в стандартной серии спиртов восходящей концентрации (50°→70°→80°→96°→96°, 3-5 мин) и ксилола (2 порции по 3 мин) и заключали в безводную монтирующую среду - канадский бальзам, под покровные стекла.

2.3.2 Иммуоцитохимический метод

Иммуоцитохимический метод – метод идентификации в клетке различных внутриклеточных молекулярных компонентов: белков, гормонов, ферментов, иммуноглобулинов, рецепторов на клеточной поверхности и т. д., основанный на реакции антиген-антитело. Исследуемое вещество служит антигеном для выработанного к нему в другом животном специфического иммуноглобулина-антитела (рис. 7). Первичные антитела связываются со вторичными, при этом первичные антитела служат для вторичных антигеном. Такое повторное связывание существенно повышает чувствительность метода. Место связывания выявляют при помощи ферментной метки. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству присутствующего в клетке вещества. Мы использовали этот метод для определения содержания белков pCREB, субъединиц p65 и c-Rel NF-kappaB, глюко- и минералокортикоидных рецепторов, BDNF, Bcl-2 в неокортексе и гиппокампе крыс, подвергнутых гипоксическому воздействию в разных режимах.

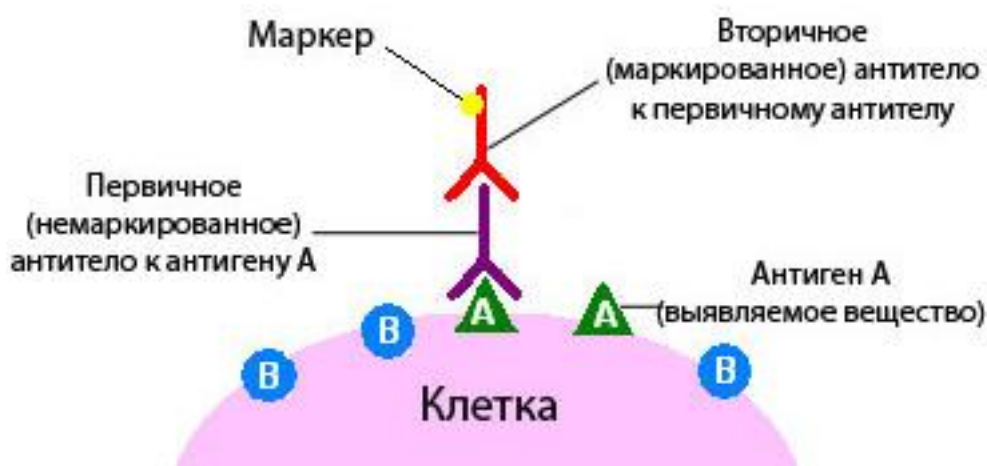


Рис. 7. Схематическое изображение иммуоцитохимического метода.

Эксперименты проводились по следующему протоколу.

После депарафинизации (см.п.2.2) с целью демаскировки антигена срезы помещали в емкость с 0.01М цитратным буфером (рН 6.0), доводили до кипения и держали под давлением в течение 1 мин. (Цитратный буфер: 8.8.г. цитрата натрия на 3 л. дистиллированной воды). Затем срезы отмывали в фосфатном буфере 2 раза по 5 мин. и обводили их контур гидрофобным маркером (Par-Pen, Sigma), предотвращающим растекание реактива. Далее блокировали неспецифическое связывание. Для этого на срез наносили нормальную сыворотку (1% BSA (bovine serum albumin), приготовленную на фосфатном буфере. В смесь добавляли также 0,3% тритон X-100, 0,2% бацитрацин, 0,1% NaN₃ и оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Жидкость откапывали из расчета 40 мкл раствора на один срез. Затем срезы в течение ночи инкубировали с первичными поликлональными антителами (в разведении 1:100) к pCREB, NF-

$\kappa B(p65)$, NF- κB (c-Rel), минералокортикоидным рецепторам, BDNF, Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, INC, USA), глюкокортикоидным рецепторам (Calbiochem, USA) при +4°C во влажной камере. После инкубации стекла стряхивали (для удаления излишков антител) и отмывали в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Затем обрабатывали срезы вторичными биотинилированными антителами (Vector Laboratories, Inc, USA; разведение 1:200) в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере. Отмывали в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Далее наносили универсальную систему авидин-биотинового комплекса (ABC, Vector Laboratories, Inc, USA) и оставляли инкубироваться 30 мин при комнатной температуре. ABC готовили за 30 мин до нанесения. Приготовление ABC: компонент А добавляли в фосфатный буфер (разведение 1:100), перемешивали; добавляли компонент В в смесь (разведение 1:100), перемешивали; полученную смесь оставляли на 30 мин. при комнатной температуре. После инкубации с ABC-комплексом стекла промывали в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Для визуализации реакции связывания антитела с антигеном использовали диаминобензидиновый кит (DAB, Vector Labs, USA): буфер(1 капля), 3,3-диаминобензидин (2 капли), H_2O_2 (1 капля) на 2.5 мл H_2O . Раствор готовили непосредственно перед раскапыванием и наносили на срезы на 5 мин., после чего стекла отмывали в дистиллированной воде (3 раза по 5 мин), высушивали и заключали под покрывное стекло в глицерин-желатиновый гель.

2.4. Количественная обработка результатов иммуноцитохимических исследований с использованием системы компьютерного анализа изображения.

Анализ препаратов проводили с помощью морфометрической установки, позволяющей количественно оценить экспрессию продуктов генов по интенсивности иммунореактивности. Морфометрическая установка состояла из светового микроскопа Olympus CX31 (Olympus, Japan), цифровой камеры Progres CT1 (Jenoptic, Germany) 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 (ИП) клеток. Для этого определяли величину оптической плотности каждой клетки (D_c), которая рассчитывалась как совокупность оптических плотностей всех ее точек (пикселей), отнесенная к количеству точек:

$$D_c = \sum D_l / N, \text{ где } D_l - \text{оптическая плотность одной точки объекта (локальная);}$$

N – число точек изображения, принадлежащих объекту.

Локальная оптическая плотность каждой точки рассчитывалась по формуле:

$Dл = \lg\left(\frac{I_{\Phi}}{I_0}\right)$, где I_0 – яркость точки изображения объекта;

I_{Φ} – яркость фона (константа, измеряется для каждого среза).

Яркость изменялась в пределах от 1 до 100, условные единицы.

Иммунопозитивными автоматически считались клетки, оптическая плотность которых превышала показатель фона на заданное число условных единиц. На основании заданных параметров Таблицы классов, исходя из показателей оптической плотности, все ИП клетки автоматически разделялись на 2 класса: интенсивно-ИП (класс 1) и слабо-ИП (класс 2) (рис. 8). Для каждого молекулярного фактора границы оптической плотности классов определялись исходя из яркости окрашивания контрольных образцов. Границы для класса 2 лежали в пределах 0.02-0.12, для класса 1 – 0.12-0.5. Анализировали общее число ИП клеток, и число ИП клеток каждого класса. Показатель числа ИП клеток каждого класса отражает увеличение/уменьшение интенсивности экспрессии исследуемого белка в отдельных клетках и является наиболее показательным в тех случаях, когда общее количество иммунореактивных клеток изменяется незначительно или не меняется вовсе. Данные подвергали статистической обработке.

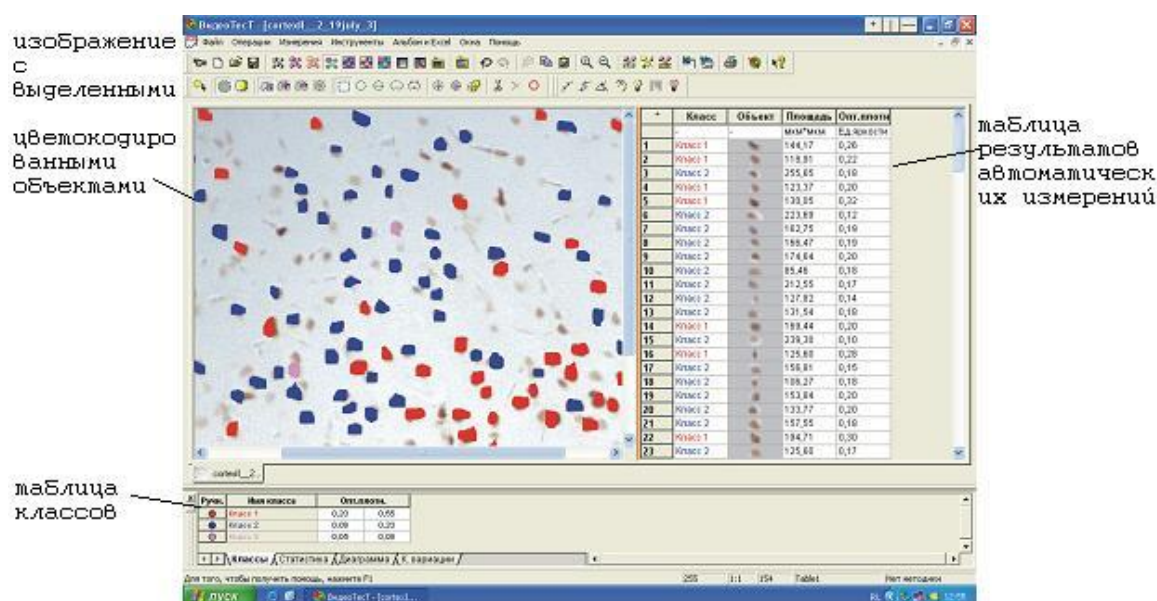


Рис. 8. Автоматический анализ изображения с использованием программы ВидеоТест Мастер Морфология 5.2.

2.5. Методы математической статистики.

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 SEM (standard error of the mean). SEM вычисляли по формуле:

$$SEM = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}}, \text{ где } \sigma \text{ — среднее квадратическое отклонение}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2}{n}}$$

n - количество срезов;

x – количество ИП клеток в каждом срезе;

\bar{x} - среднее арифметическое значение количества ИП клеток со всех срезов в опыте.

Результаты и SEM выражены в процентах от среднего значения соответствующей контрольной группы (\bar{x}_k), в каждом случае \bar{x}_k принято за 100%.

$\bar{x}\% = (\bar{x}/\bar{x}_k)100\%$, $SEM\% = (SEM/\bar{x}_k)100\%$, где \bar{x}_k – среднее арифметическое значение количества ИП клеток со всех срезов в контроле.

Для сравнения выборок (опыта и контроля) использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA (пакет программ Statistica 7.0). Различия между группами считались статистически достоверным при $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Морфологические исследования

Наряду с иммуноцитохимическими исследованиями проведено изучение влияния различных, используемых в работе, режимов гипобарической гипоксии на морфологические характеристики нейронов неокортекса и гиппокампа с целью оценки их повреждающего либо нейропротективного действия.

Результаты исследования выявили, что через 3 суток после тяжелой гипоксии (ТГ) у непрекondиционированных животных в дорзальном (области СА1/СА2) и вентральном (области СА3/СА4) гиппокампе, а также фронто-париетальном неокортексе обнаруживались выраженные структурные повреждения нейронов. В этих областях мозга выявлялось значительное число гиперхромных и пикнотических клеток (рис. 9. I-III, а,б). Нередко наблюдался перичеселлюлярный отек. В отдельных нейронах проявлялся хроматоллиз, вакуолизация цитоплазмы. К 7 суткам после ТГ у непрекondиционированных крыс снижалось количество нейронов на 40% относительно контроля в полях СА1 и СА4 гиппокампа, клетки располагались более разреженно (рис. 10 и 11 Ib, IIб). В неокортексе выявлялось большое число гиперхромных нейронов (рис. 11 IIIб).

Однократное прекондиционирование (ПК) не предотвращало структурных повреждений нейронов гиппокампа и неокортекса, вызываемых ТГ. В этой группе животных во фронто-париетальном неокортексе, полях СА1/СА2 и СА3/СА4 гиппокампа также выявлялось большое количество сморщенных пикнотических нейронов, встречались также нейроны с хроматоллизом (рис.9 и 11 I-III, б,в). Также, как и у неПК-животных, у однократно ПК-животных ТГ приводила к гибели 40% нейронов в полях СА1/СА2 и СА3/СА4 к 7 дню после ТГ (рис. 10; рис. 11 Ib, IIв). В отличие от этого, предъявляемые трехкратные ПК-воздействия в значительной мере предотвращали индуцируемые ТГ через 3-7 суток структурные повреждения нейронов гиппокампа и неокортекса (рис. 9 и 11 I-III, г).

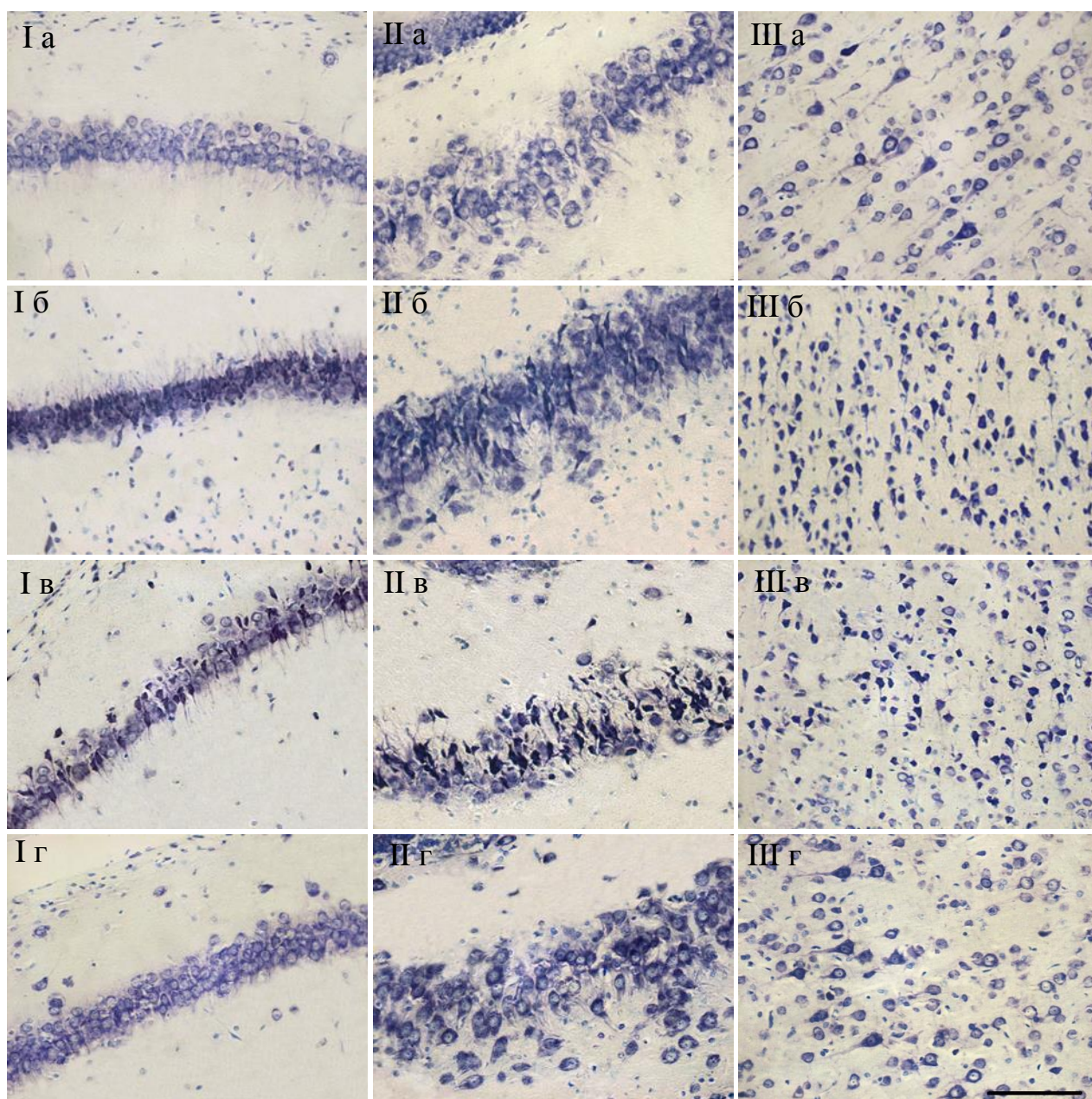


Рис. 9. Морфологические особенности нейронов полей CA1 (I), CA4 (II) и неокортекса (III) через 3 суток после ТГ у неПК (б) и однократно (в) или трехкратно (г) ПК-крыс. а – контроль. Маркер 100 мкм.

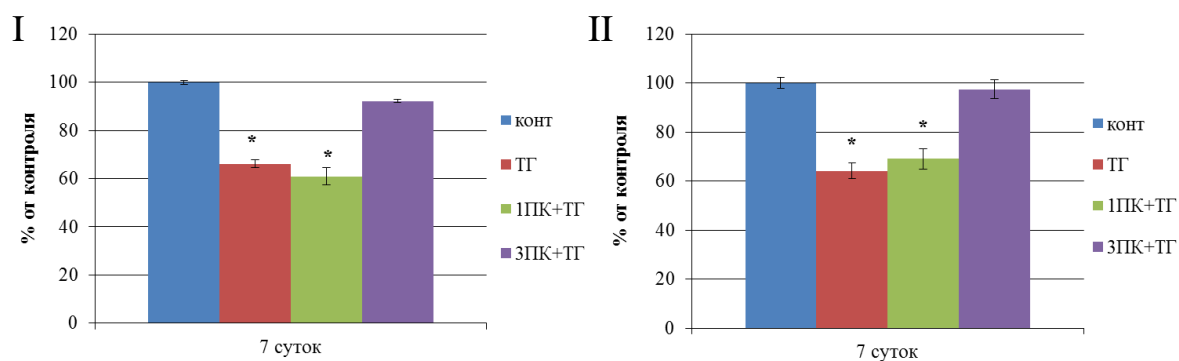


Рис. 10. Количество нейронов в поле CA1 (I) и CA4 (II) гиппокампа через 7 суток после ТГ у неПК-, однократно или трехкратно ПК-крыс. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

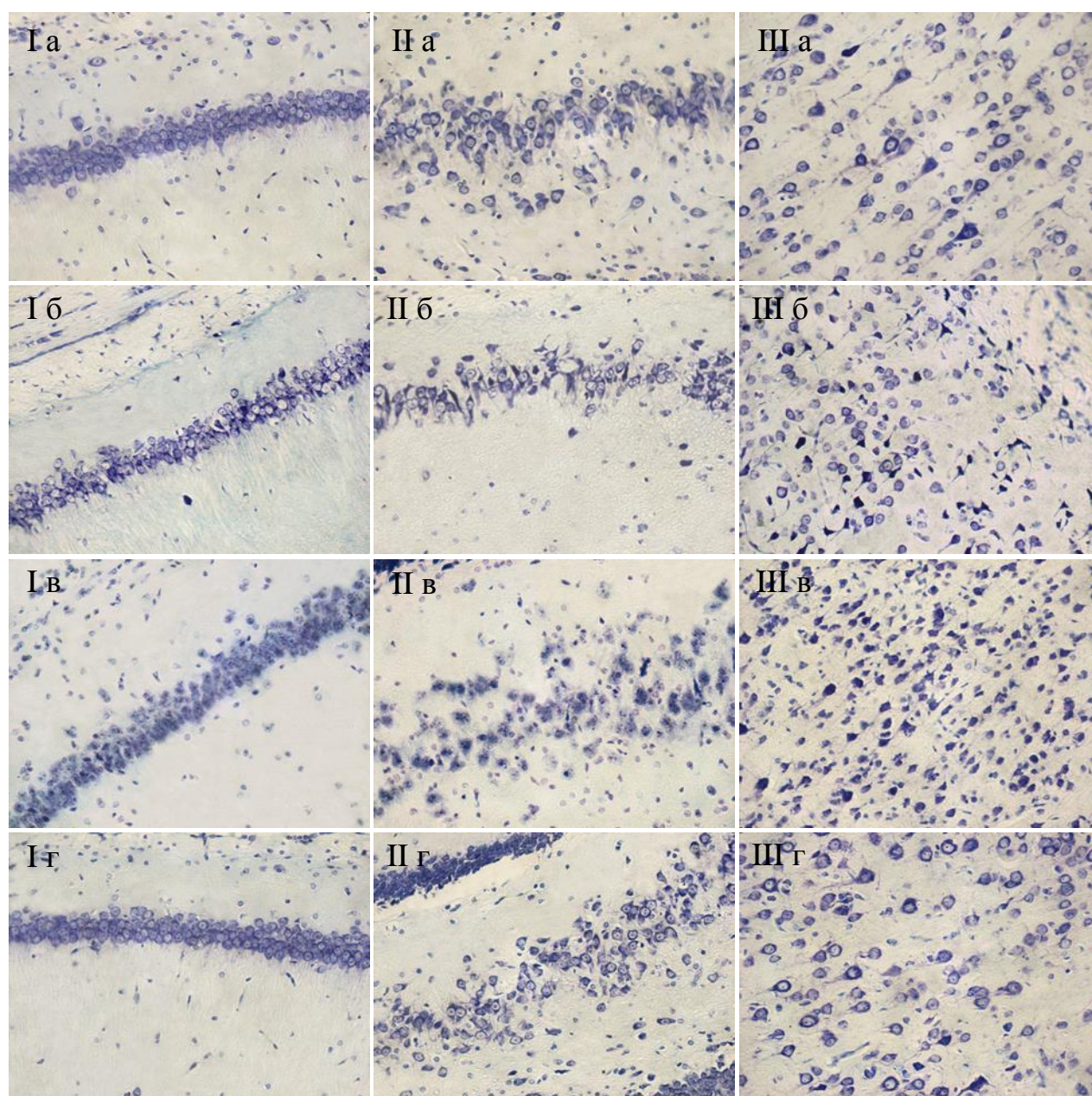


Рис. 11. Морфологические особенности нейронов полей СА1 (I), СА4 (II) и неокортекса (III) через 7 суток после ТГ у неПК (б) и однократно (в) или трехкратно (г) ПК-крыс. а – контроль. Маркер 100 мкм.

Сеансы УГГ, используемые в качестве гипоксического ПК, не изменяли на светооптическом уровне морфологию нейронов неокортекса и гиппокампа.

Таким образом, проведенное исследование выявило специфические особенности влияния различных режимов гипобарической гипоксии на морфологию нейронов гиппокампа и неокортекса крыс. У животных, перенесших тяжелую гипобарическую гипоксию (имитирующую «подъем» на высоту 11000 м, 3 часа) через 3-7 суток после этого воздействия проявляются глубокие структурные повреждения нейронов вплоть до их гибели в наиболее

уязвимых образованиях мозга (гиппокампе и неокортексе). Похожая, хотя и менее выраженная морфологическая картина повреждения нейронов выявлена у крыс при длительном (в течение 4 суток) «подъеме» на высоту 6500 м – уровень гипобарии, при котором в условиях хронической экспозиции проявляются устойчивые неврологические расстройства (Kadar et al., 1998; Shukitt-Hale et al., 1996).

У preconditionированных умеренной гипобарической гипоксией (УГГ) («подъем» на 5000 м, 2 часа) животных последующая ТГ неоднозначно влияет на морфологические характеристики нейронов гиппокампа и неокортекса в зависимости от режима ПК. Ранее было показано, что трехкратное ПК-воздействие (3 сеанса с интервалом в 24 часа) оказывает протективный эффект на структурные и функциональные повреждения мозга, вызываемые тяжелой гипобарической гипоксией (Рыбникова и др., 2004; Самойлов и др., 2001; Rybnikova et al., 2005). Подобный эффект на структурном уровне в гиппокампе обнаружен также ранее при использовании в качестве ПК сублетальных ишемических воздействий (Kirino et al., 1991; Kitagawa et al., 1990). Причем, как показано в работе Kitagawa с соавт., предъявление нескольких сеансов ишемического ПК через сутки оказывает значительно более выраженное протективное действие, чем один сеанс ПК (Kitagawa et al., 1990). В нашей работе с использованием другой экспериментальной модели получен схожий результат: однократное ПК с помощью УГГ, в отличие от трехкратного воздействия, практически не протектирует структурные повреждения нейронов гиппокампа и неокортекса, вызываемые ТГ. Через 3 суток после тяжелой гипобарической гипоксии у неПК- и однократно ПК-животных в гиппокампе и неокортексе выявляется большое количество поврежденных нейронов, морфологические характеристики которых отражают развитие апоптоза (Charciaut-Marlangue, Ben-ari, 1995; Rybnikova et al., 2006; Gewies, 2003). Очевидно, судя по морфологическим характеристикам, однократное ПК, в отличие от трехкратного, не предотвращает индуцируемый ТГ апоптоз нейронов мозга.

Таким образом, полученные результаты подтверждают представление о том, что развитие полноценного протективного эффекта гипоксического ПК связано с особенностями его предъявления, в частности, кратности сеансов, длительности и отсрочки воздействия (Самойлов, 1999; Самойлов, Рыбникова, 2012; Kitagawa et al., 1990). Очевидно, морфологические особенности нейронов при различных режимах гипобарической гипоксии могут быть обусловлены разным соотношением содержания в клетках про- и антиапоптотических факторов. В частности, показано, что тяжелая гипобарическая гипоксия у неПК-крыс индуцирует в гиппокампе и неокортексе крыс экспрессию про-апоптотических факторов Вах, c-Jun, JNK, p38-МАРкиназу, а у трехкратно ПК-животных, напротив, вызывает экспрессию анти-апоптотических факторов Bcl-2, Bcl-xL, ERK/МАРК и подавляет увеличение

содержания проапоптотических факторов (Самойлов и др., 2005, 2007; Rybnikova et al., 2006). В процессах гибели/выживания нейронов важную роль играют также транскрипционные факторы (ТФ), регулирующие транскрипцию генов-мишеней белков, ответственных за индукцию или предотвращение процессов запрограммированной гибели клетки. Вышеперечисленные белковые факторы участвуют в определении функционального состояния клетки, что, в конечном счете, и определяет ее судьбу при действии повреждающего фактора, в частности, тяжелой гипобарической гипоксии. С целью выявления особенностей участия про-адаптивных факторов в реализации эффектов различных режимов гипобарической гипоксии проведены иммуноцитохимические исследования экспрессии активационных ТФ pCREB и NF-kappaB, лиганд-зависимых ТФ глюко- и минералокортикоидных рецепторов, а также нейротрофического фактора BDNF и антиапоптотического фактора Bcl-2, гены которых являются мишенями выбранных ТФ.

3.2. Иммуноцитохимические исследования

3.2.1. Влияние различных режимов гипобарической гипоксии на уровень экспрессии активационных ТФ pCREB и NF-kappaB

3.2.1.1. Влияние ТГ на уровень экспрессии pCREB в нейронах неокортекса и гиппокампа неПК-, однократно или трехкратно ПК-крыс.

Неокортекс

Методом количественной иммуногистохимии было выявлено, что в контрольной группе животных наблюдался низкий уровень экспрессии pCREB в верхнем (II) и нижнем (V) слоях неокортекса. Через 3-24 ч после действия ТГ наблюдалось подавление экспрессии pCREB в обоих слоях неокортекса. При этом происходило уменьшение как общего числа иммунопозитивных (ИП) клеток (на 50%) ($F=83.779$, $p=0.000007$ – II слой и $F=28.734$, $p=0.00045$ – V слой, 24 ч), так и числа интенсивно ИП клеток (на 80-90 %) (рис. 12 Ааб, Баб; рис. 13 б). К 72 ч эти показатели были близки к контрольным значениям. В ответ на однократное ПК не было выявлено значимых изменений экспрессии pCREB относительно контроля в обоих слоях неокортекса через 3-72 ч после ТГ (рис. 12 Аав, Бав; рис. 13 в). В отличие от однократного ПК, трехкратное ПК-воздействие существенно повышало уровень экспрессии pCREB в верхнем и нижнем слоях неокортекса после ТГ. В частности, отмечалось выраженное увеличение общего числа ИП клеток в верхнем слое неокортекса на 180% ($F=184.028$, $p=8.38E-07$) и 70% относительно контроля через 3 и 24 ч после ТГ, соответственно (рис. 12. Аа). Вместе с тем, происходило также и усиление интенсивности экспрессии в 4 раза относительно контроля (рис.

12 Аг). В нижнем слое неокортекса интенсивность экспрессии также увеличилась в 6-9 раз относительно контроля через 3-24 ч после ТГ, соответственно, но при этом не отмечалось изменения общего числа рCREB-ИП клеток (рис. 12 Баг; рис. 13 г).

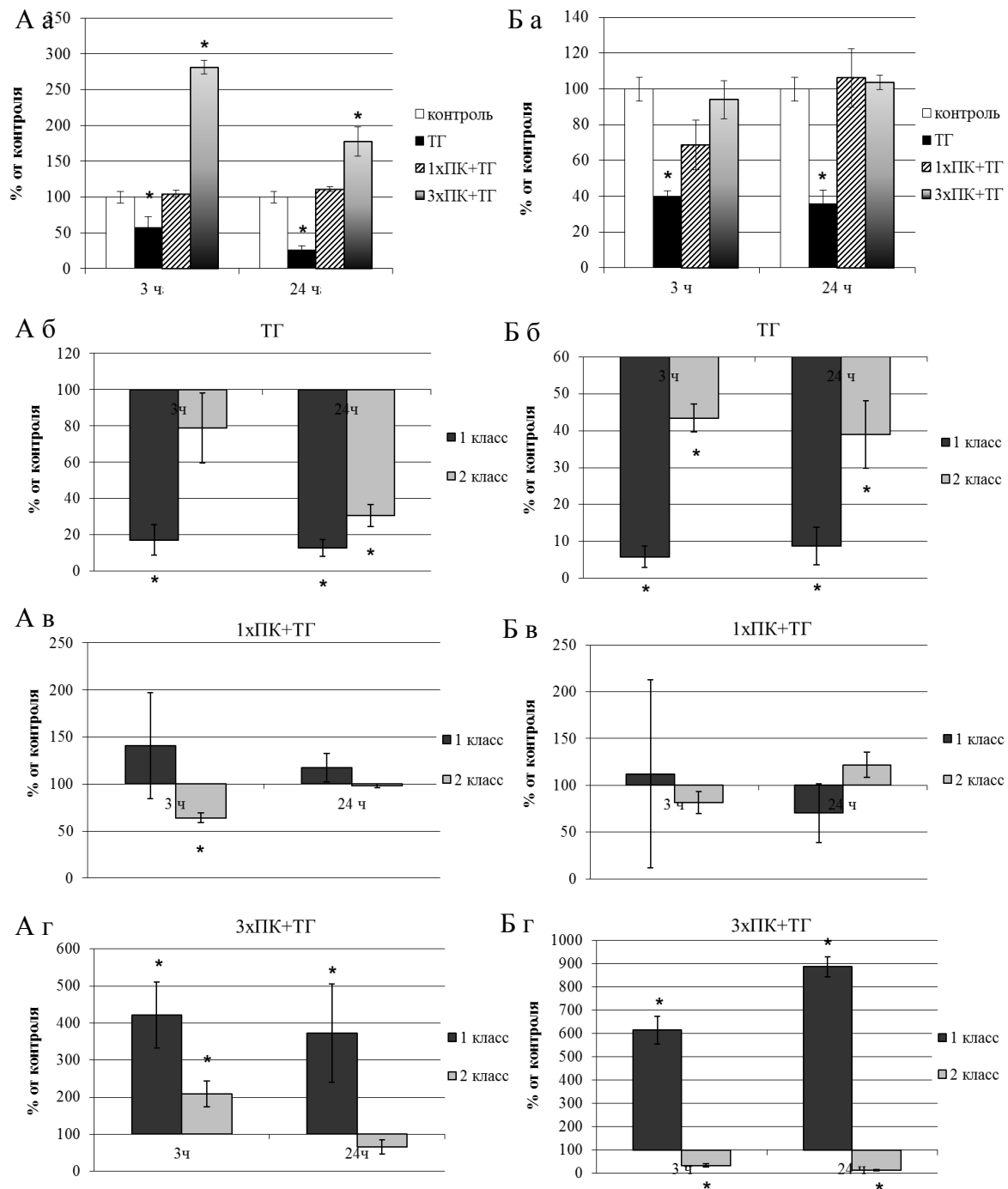


Рис.12. Паттерн экспрессии рCREB во II (А) и V (Б) слоях неокортекса крыс через 3-24 ч после ТГ у неПК- (а) и однократно(б) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – общее количество рCREB-ИП клеток; б,в,г – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

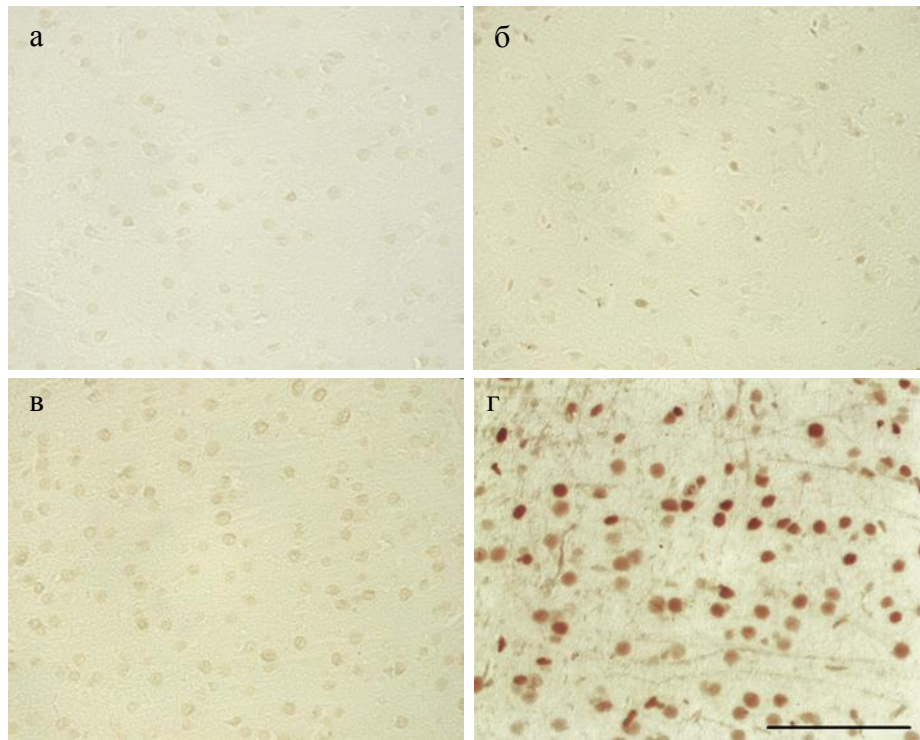


Рис.13. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии pCREB в V слое неокортекса через 24 ч после ТГ у неПК- (б), однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – контроль. Маркер 100 мкм.

Гиппокамп

В контрольной группе животных практически отсутствовали ИП к pCREB клетки в полях CA1, CA2, CA3, CA4 и встречались лишь единичные в зубчатой извилине гиппокампа (рис. 14 Аа, Ба). Воздействие ТГ у неПК и однократно ПК-крыс не изменяло экспрессии pCREB в отделах гиппокампа через 3-72 ч (рис. 14 Абв, Ббв). У трехкратно ПК-животных ТГ вызвала выраженное увеличение иммунореактивности к pCREB в полях CA2, CA3, CA4 и в зубчатой извилине гиппокампа через 3 ч после воздействия. Причем основную долю клеток составляли слабо ИП клетки. К 24 ч после воздействия иммунореактивность к pCREB усиливалась в этих полях за счет увеличения числа интенсивно ИП клеток (рис. 14 Аг, Бг). В поле CA1 гиппокампа также наблюдалось увеличение иммунореактивности к pCREB к 24 ч после воздействия, но общее число клеток, экспрессирующих pCREB, оставалось достаточно низким.

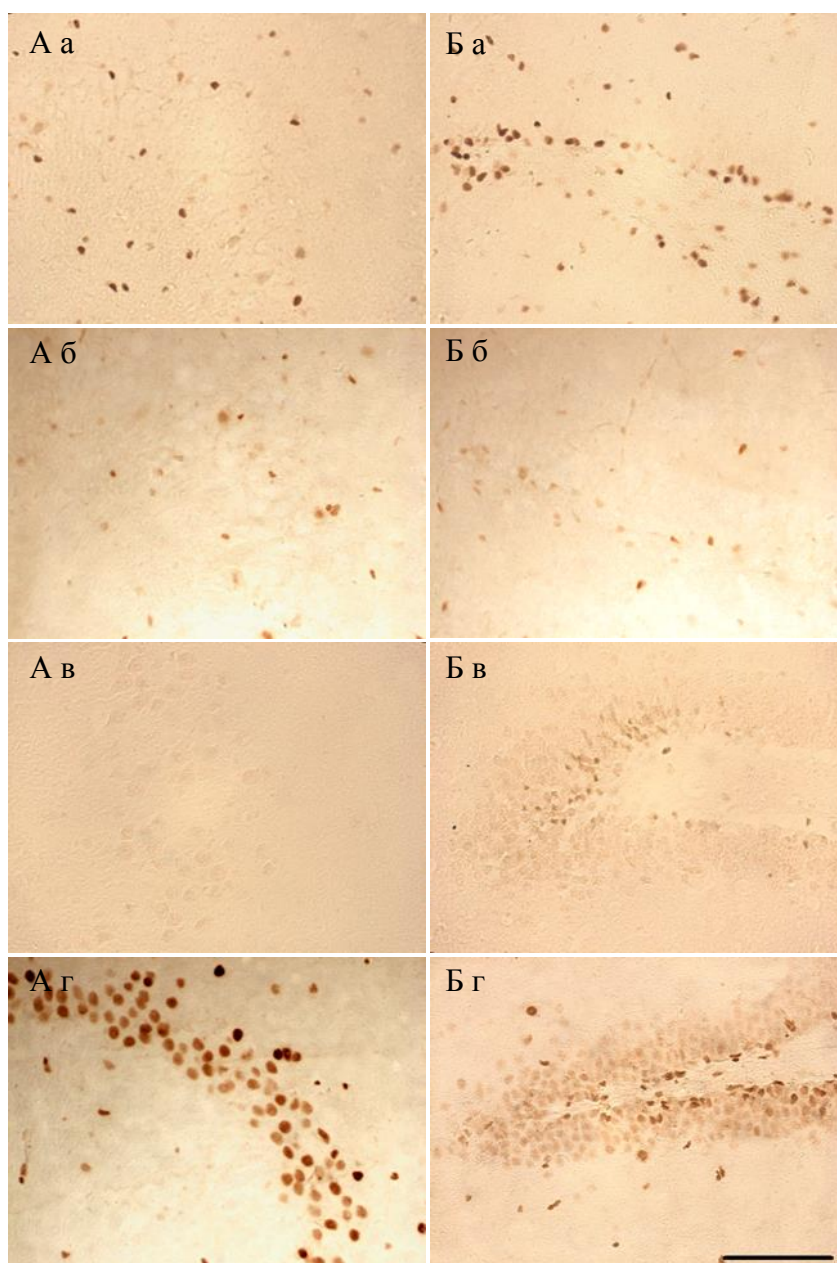


Рис.14. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии pCREB в поле CA3 (А) и зубчатой извилине (Б) гиппокампа через 24 ч после ТГ у неПК- (б), однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – контроль. Маркер 100 мкм.

Таким образом, ТГ у неПК крыс приводила к сильному подавлению экспрессии pCREB в неокортексе и не изменяла ее в гиппокампе. ТГ у однократно ПК-животных не оказывала влияния на уровень экспрессии pCREB в неокортексе и гиппокампе относительно контроля, а трехкратные ПК-воздействия существенно увеличивали уровень экспрессии исследуемого фактора после ТГ.

3.2.1.2. Особенности экспрессии *pCREB* при действии одного или трех сеансов УГГ

Неокортекс

Наряду с исследованием эффектов ТГ и прекондиционированной ТГ на экспрессию *pCREB* также была проведена серия экспериментов по изучению влияния самой УГГ, применяемой без последующего воздействия ТГ. Было выявлено, что однократное применение УГГ не влияет на уровень экспрессии *pCREB* в обоих слоях неокортекса (рис. 15; рис. 16 а,б). Напротив, трехкратная УГГ значительно усиливает иммунореактивность к *pCREB* (рис. 16 в). При этом общее количество ИП клеток увеличивается только в верхнем слое в 2 раза, а интенсивность экспрессии возрастает в 35 раз ($F=23.414$, $p=0.00188$ – II слой и $F=603.546$, $p=2.08E-06$ – V слой) в обоих слоях относительно контроля (рис. 15).

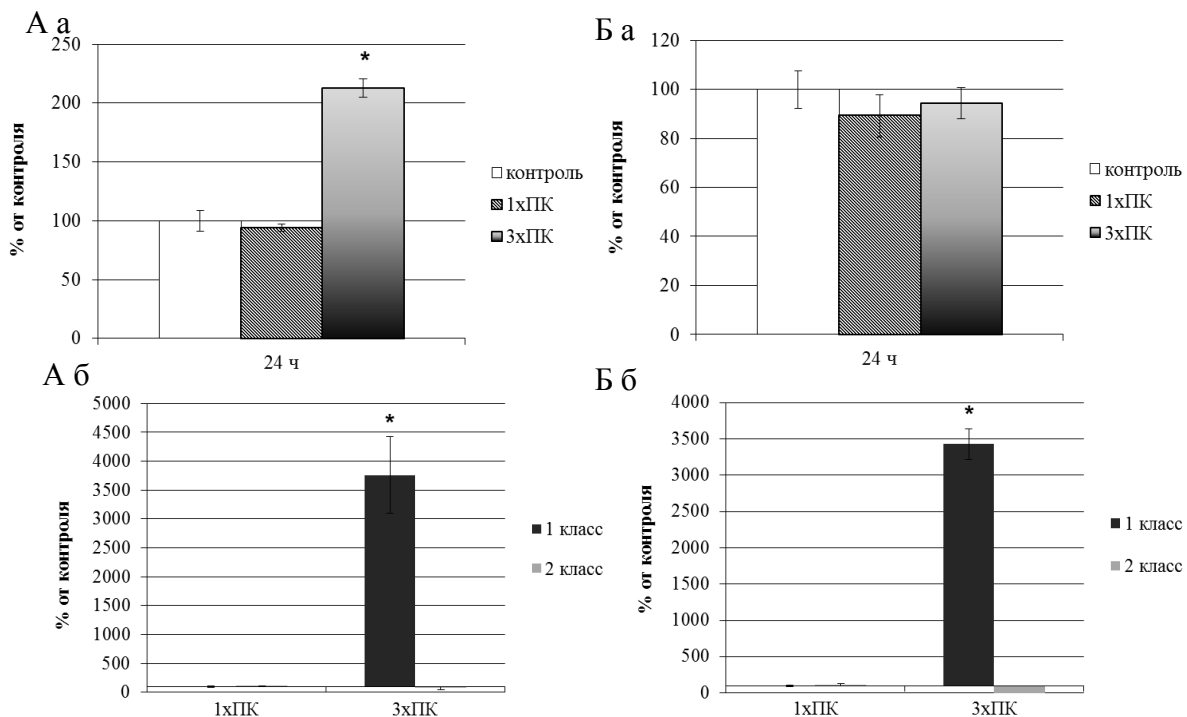


Рис.15. Паттерн экспрессии *pCREB* во II (А) и V (Б) слоях неокортекса крыс через 24 ч после предъявления одного или трех сеансов УГГ. а – общее количество *pCREB*-ИП клеток; б – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.



Рис.16. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии *pCREB* в V слое неокортекса через 24 ч после последнего сеанса УГГ. а – контроль; б – однократная УГГ; в – трехкратная УГГ. Маркер 100 мкм.

Гиппокамп

В ответ на один сеанс УГГ наблюдалось снижение иммунореактивности к pCREB в полях гиппокампа, что выражалось практически полным отсутствием pCREB-ИП клеток через 24 ч после воздействия (рис. 17 аб). В отличие от этого, трехкратные сеансы УГГ ап-регулировали уровень экспрессии pCREB в гиппокампе. Наиболее сильно это проявлялось в СА3 и зубчатой извилине, где количество pCREB-ИП клеток существенно возрастало по сравнению с контролем, тогда как в полях СА1, СА4 наблюдалось незначительное увеличение экспрессии pCREB (рис. 17 в).

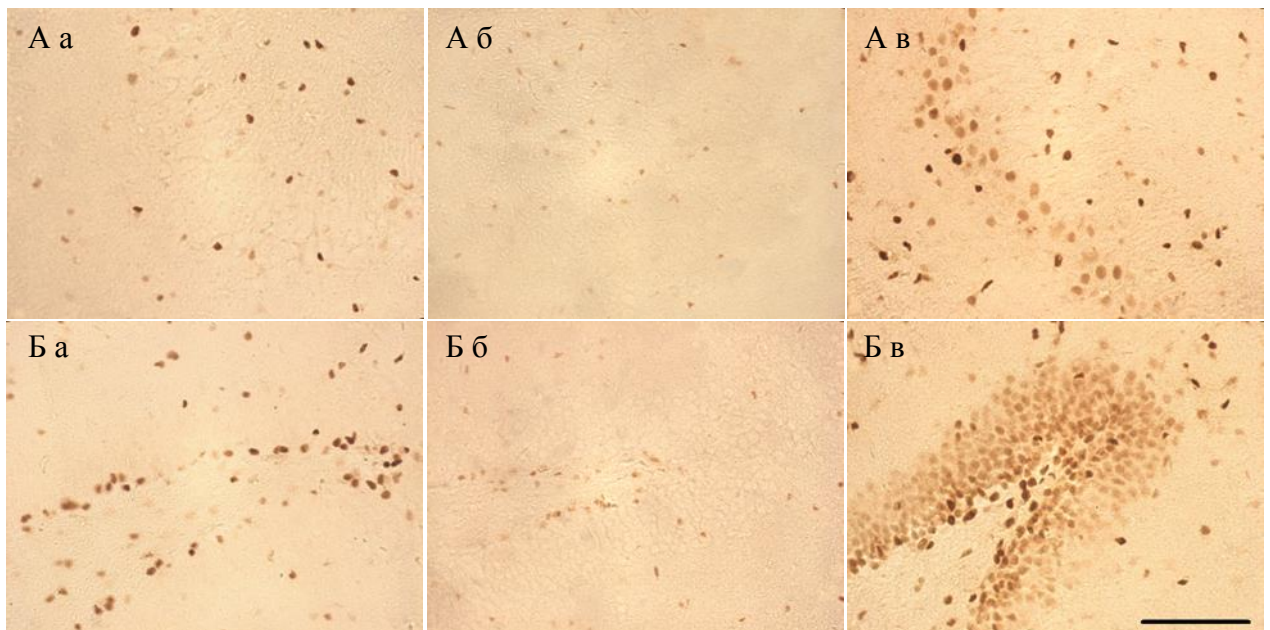


Рис.17. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии pCREB в поле СА3 (А) и зубчатой извилине (Б) гиппокампа через 24 ч после последнего сеанса УГГ. а – контроль; б – однократная УГГ; в – трехкратная УГГ. Маркер 100 мкм.

Таким образом, один сеанс УГГ либо не влиял на уровень экспрессии pCREB либо снижал его в неокортексе и гиппокампе. Напротив, трехкратные сеансы УГГ ап-регулировали уровень экспрессии pCREB в исследованных областях мозга.

Как известно, исследуемые структуры мозга (неокортекс и гиппокамп) относятся к наиболее чувствительным к гипоксии/ишемии образованиям мозга. ТГ приводит к ряду нарушений на разных уровнях, в том числе, поведенческом, клеточном, молекулярном (см обзор лит, п.1.1). Ранее в нашей лаборатории было показано, что ТГ приводит к ухудшению обучения животных и вызывает нарушения памяти (Рыбникова и др., 2006; Самойлов и др., 2001б; Rybnikova et al., 2005, 2007b). Как указывалось выше (см. обзор лит. п.1.4.3.1), pCREB играет ключевую роль в процессах синаптической пластичности, формирования долговременной памяти (Impey et al., 1999; Bourtchuladze et al., 1994; Davis et al 2000). В частности, дефосфорилирование pCREB по Ser133 приводит к развитию длительной депрессии (Mauna et

al. 2010; Thiels et al. 1998). В нашей работе показано, что ТГ вызывает подавление экспрессии pCREB в неокортексе, что, очевидно, является одной из причин индуцируемыми ТГ нарушениями памяти. Это подтверждается также данными, полученными на модели ишемии: предъявление допенезила (ингибитора холинэстеразы) в качестве ПК-стимула нивелирует нарушения пространственной памяти, индуцированные глобальной ишемией на песчанках, и предотвращает подавление экспрессии pCREB в гиппокампе (Min et al., 2012). В нашей работе также выявлено, что трехкратные, но не однократные, сеансы ПК существенно увеличивают уровень экспрессии pCREB как в неокортексе, так и в гиппокампе после ТГ. Вместе с тем ранее в нашей лаборатории было показано, что именно трехкратные ПК-воздействия способны предотвращать нарушения процессов обучения и памяти крыс, подвергнутых ТГ, в отличие от неПК-крыс (Самойлов и др., 2001б; Rybnikova et al., 2005).

Как указывалось выше, одной из основных функций pCREB является его участие в процессах гибели/выживания нейронов и предотвращении развития апоптоза (см. обзор лит, п. 1.4.3.1.). Пониженный уровень фосфорилирования CREB связывают с нейродегенерацией (Ao et al. 2006; Mantamadiotis et al. 2002). Вместе с тем, в ряде работ показано, что тяжелая ишемия приводит к снижению уровня фосфорилирования CREB в чувствительных областях мозга (CA1 гиппокампа, неокортекс) и вместе с тем вызывает апоптоз нейронов (Hara et al., 2003; Tanaka et al., 1999, 2000; Nagakura et al., 2002; Walton et al., 1996). В нашей работе показано, что тяжелая гипобарическая гипоксия, которая вызывает структурные изменения нейронов (см. п.3.1.; Рыбникова и др., 2004; Rybnikova et al., 2006), также подавляет уровень экспрессии pCREB в неокортексе крыс. Очевидно, недостаточная экспрессия данного фактора в ответ на ТГ у неПК-крыс может, по крайней мере, частично обуславливать развитие апоптоза нейронов исследуемых областей мозга. Это подтверждается тем, что ингибирование активности pCREB путем введения CRE-нокаутных нуклеотидов приводит к увеличению гибели нейронов CA1 гиппокампа при действии ишемии (Hara et al., 2003). Однократное ПК, которое не предотвращает структурных повреждений нейронов, индуцируемых ТГ (см п. 3.1), не оказывает влияния на уровень pCREB ни в неокортексе ни в гиппокампе. В противоположность этому, у трехкратно ПК-крыс ТГ не вызывает структурных нарушений нейронов и повышает уровень экспрессии pCREB. Схожие результаты по увеличению экспрессии pCREB были получены в других моделях ишемического или гипоксического ПК и также связаны с нейропротекцией в неокортексе и гиппокампе крыс (Hara et al., 2003; Mabuchi et al., 2001; Nakajima et al., 2002; Meller et al., 2005; Terasaki et al., 2010). Вышеизложенное дает основания полагать, что индукция экспрессии ТФ pCREB, 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.

Известно, что механизмы формирования толерантности нейронов к гипоксии/ишемии связаны с индукцией экспрессии ряда про-адаптивных белков (Davis, Patel, 2003; Chiueh et al., 2005; Steiger, Hanggi, 2007; Kitagawa, 2007). pCREB, как ТФ, активирует семейства генов про-адаптивных белков, к которым относятся *c-fos*, *zif-268* (Hata et al., 1998; Sgambato et al., 1998; Sheng et al., 1990) гены пептидного антиоксиданта тиоредоксина 1 (Chiueh et al., 2005), антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-xL (Riccio et al., 1999; Sugiura et al., 2004; Meller et al., 2005, Chiueh et al., 2005), нейротрофического фактора BDNF (Terasaki et al., 2010). Гены белков ATF3 (activating transcription factor 3) и AID (inhibitors of cell death), которые участвуют в нейропротективных механизмах, также являются мишенями для pCREB (Zhang et al., 2011; Tan et al., 2012). 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 в неокортексе и гиппокампе крыс (Строев, Самойлов, 2006; Rybnikova et al. 2002, 2005, 2006; Stroeve et al., 2004a,b, 2005). Таким образом, оверэкспрессия продуктов про-адаптивных генов в ответ на ТГ в неокортексе и гиппокампе мозга трехкратно ПК-крыс, очевидно, в значительной мере обусловлены активацией CREB. Вместе с тем в экспериментах по изучению влияния УГГ, без последующего действия ТГ, выявлено, что именно трехкратные сеансы УГГ повышают иммунореактивность к pCREB в неокортексе и гиппокампе, причем этот эффект обнаруживается к 24 ч после последнего сеанса УГГ – то есть в тот период, когда согласно ранее принятой схеме производится предъявление животным тяжелого повреждающего воздействия. Все это дает основания полагать, что к моменту предъявления ТГ в нейронах уже присутствует достаточно много молекул pCREB для того, чтобы они оказались способными активировать соответствующие про-адаптивные гены-мишени, запуская каскад нейропротективных реакций, направленных на предотвращение развития апоптоза. Вместе с тем, один сеанс УГГ не оказывает такого эффекта на уровень экспрессии pCREB. Таким образом, pCREB является одной из ключевых сигнальных молекул, служащей связующим звеном между ПК-стимулом и нейропротективными механизмами (Lee et al., 2009; Kitagawa et al., 2012). Полученные данные свидетельствуют о важной роли pCREB в процессах формирования гипоксической толерантности нейронов мозга. Кроме того, ПК должно быть достаточно сильным (несколько сеансов УГГ, одного сеанса УГГ недостаточно) для того, чтобы индуцировать выраженное увеличение экспрессии pCREB, который вовлечен в про-адаптивные пути.

3.2.1.3. Влияние ТГ на уровень экспрессии субъединиц ТФ NF-каппаВ р65 и c-Rel в нейронах неокортекса и гиппокампа неПК-, однократно или трехкратно ПК-крыс р65

Неокортекс

В контрольной группе животных NF-каппаВ(р65)-иммунореактивных клеток в неокортексе было немного. ТГ не вызвала значимых изменений в экспрессии NF-каппаВ(р65) на ранних сроках (3-24 ч) в неокортексе, однако приводила к ее увеличению в отсроченный период. Через 3 суток после ТГ повышалась интенсивность экспрессии р65. Хотя на сроках 3 и 24 ч эти изменения недостоверны, к 3 суткам относительное содержание интенсивно ИП клеток было в 1,5 раза больше, чем в контроле (рис.18 б). Однократное ПК не вызывало изменений экспрессии р65 на ранних сроках (3-24 ч), но к 3 суткам после ТГ отмечалась тенденция к снижению интенсивности экспрессии на 30% (недостоверно) (рис. 18 а,в).

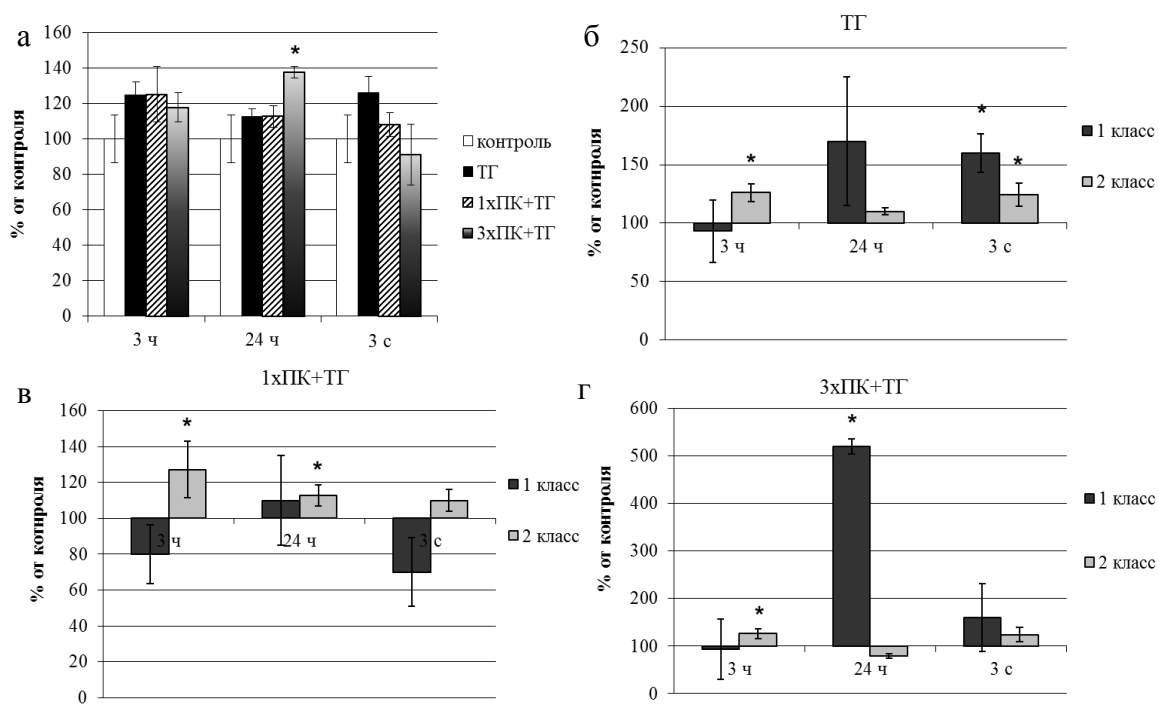


Рис.18. Паттерн экспрессии NF-каппаВ(р65) в V слое неокортекса крыс через 3 ч-3 суток после ТГ у неПК-(б) и однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – общее количество р65-ИП клеток; б,в,г – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

В ответ на трехкратное ПК уровень экспрессии р65 не отличался от контроля через 3 ч после ТГ. Но к 24 ч наблюдалось значительное увеличение как общего числа ИП клеток (на 40%), так и числа интенсивно ИП клеток (в 5 раз по сравнению с контролем; $F=189,0$, $p=9.21E-06$) (рис. 18 а,г). К 3 суткам после ТГ уровень экспрессии р65 возвращался к контрольному значению (достоверно не отличался от контроля) (рис. 18 г).

Таким образом, ТГ не изменяла уровня экспрессии р65 на раннем сроке, но приводила к увеличению экспрессии р65 в отдаленный период. Аналогичный эффект имела ТГ у однократно ПК-животных на раннем сроке после ТГ. В отличие от этого, трехкратное ПК приводило к ранней индукции интенсивности экспрессии р65 (3-24 ч) и ее снижению к 3 суткам после ТГ.

Гиппокамп

У контрольных животных в полях СА3 и СА4, зубчатой извилине гиппокампа присутствовали слабо ИП клетки в небольшом количестве (рис. 19 а). В поле СА1 экспрессия NF-карраВ(р65) не проявлялась, на микрофотографиях отсутствуют ИП клетки (рис. 20 а).

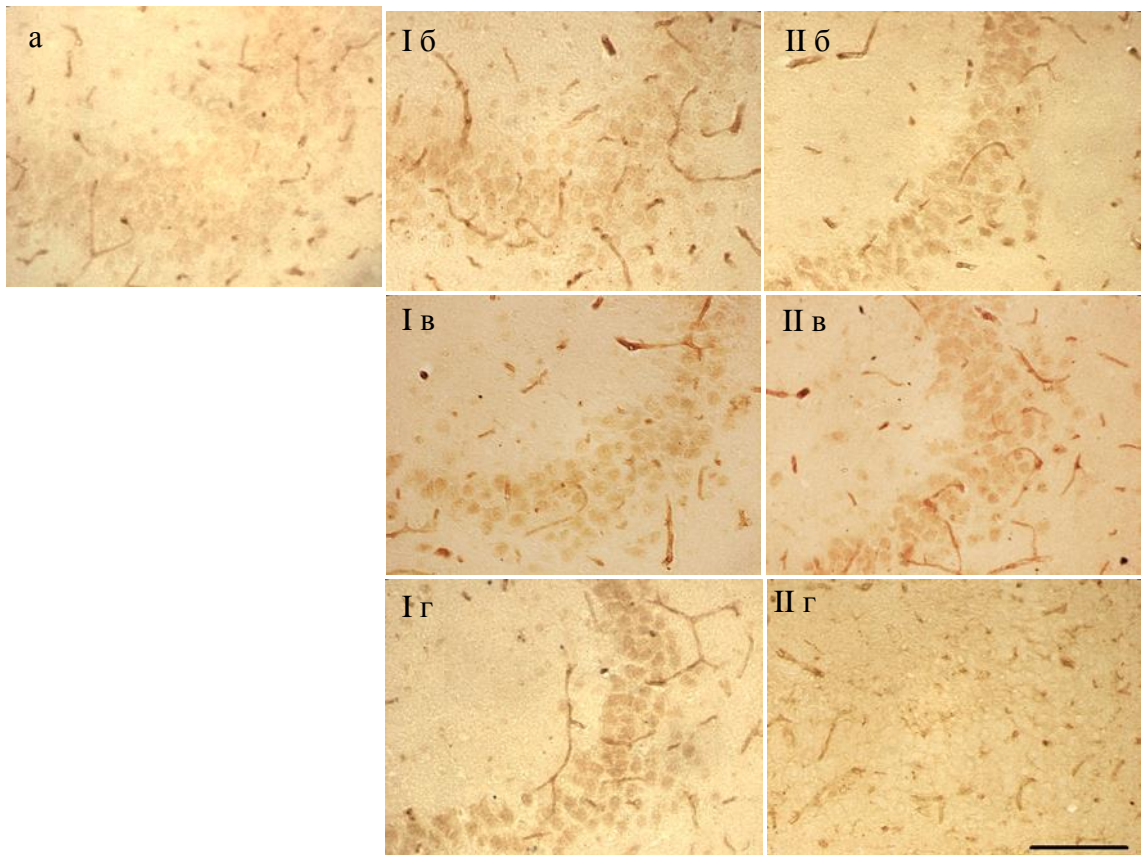


Рис. 19. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии NF-карраВ(р65) в поле СА3 гиппокампа через 24 ч (I) и 3 дня (II) после ТГ у неПК(б), однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – контроль. Маркер 100 мкм.

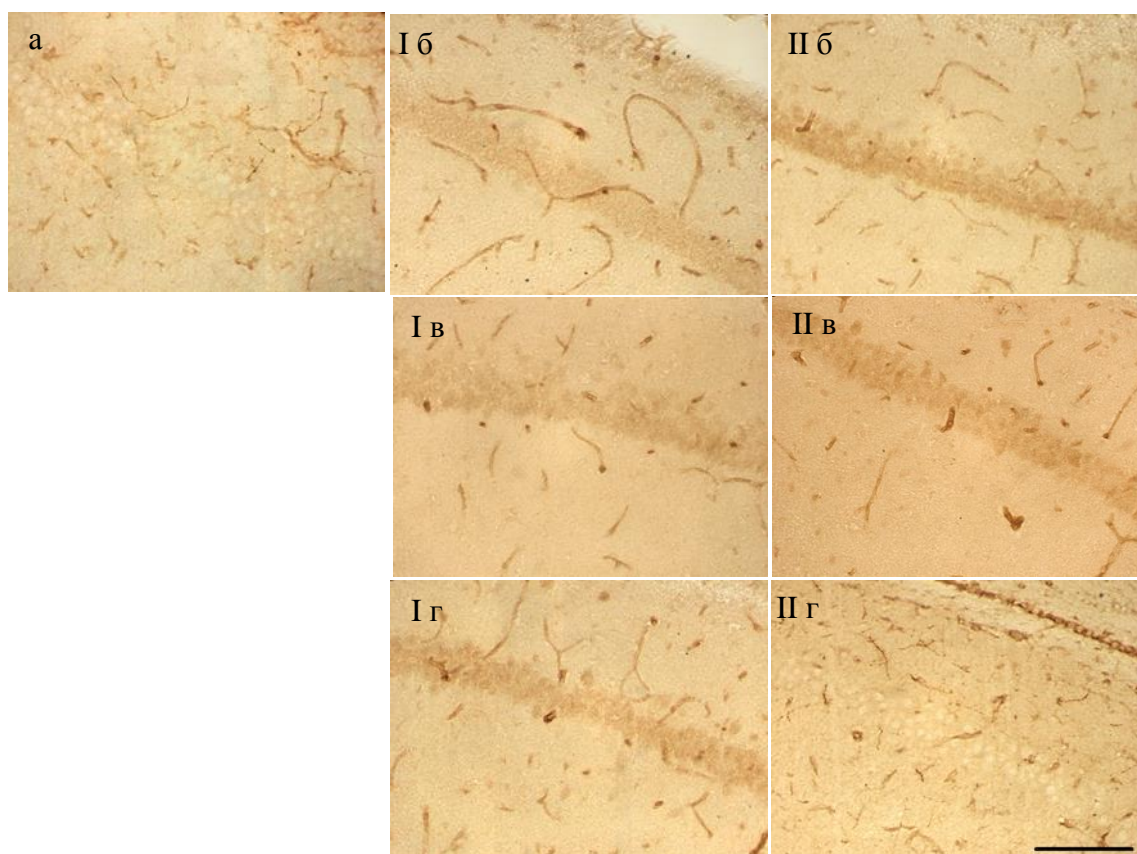


Рис. 20. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии NF-карраВ(р65) в поле СА1 гиппокампа через 24 ч (I) и 3 дня (II) после ТГ у неПК(б), однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – контроль. Маркер 100 мкм.

ТГ приводила к незначительному увеличению экспрессии в полях СА3, СА4 и зубчатой извилине гиппокампа и ее появлению в поле СА1 на сроке 3 ч. Далее уровень экспрессии в исследуемых областях гиппокампа возрастал к 24 ч и 3 суткам после ТГ. В полях СА3 и СА4 к 3 суткам после ТГ общее количество ИП клеток к р65 увеличивалось до 200% и 400% относительно контроля, соответственно (рис. 19 IIб; рис. 21 Аа,Ба). Распределение клеток по классам интенсивности тоже изменялось: если через 3 ч после ТГ интенсивность экспрессии достоверно не отличалась от контроля, то к 3 суткам количество интенсивно ИП клеток составляло 6600% ($F=54.038$, $p=0.0003$) и 2750% ($F=133.76$, $p=2.51E-05$) от контроля в полях СА3 и СА4, соответственно (рис. 21 Аб, Бб). В полях СА1 и зубчатой извилине к 3 суткам после ТГ уровень экспрессии р65 также значительно увеличивался по сравнению с контролем и 3 ч (рис. 20 IIб). При этом были различимы отдельные клетки, хотя окраска оставалась цитоплазматической, а не ядерной. Следует отметить, что экспрессия р65 в гиппокампе была более выраженной, чем в неокортексе. У однократно ПК-животных паттерн экспрессии р65 был похож на характер экспрессии р65 у неПК-животных после ТГ. На раннем сроке после ТГ (3 ч) общее количество ИП к р65 клеток не изменялось в полях СА3 и СА4. Однако к 24 ч и 3 суткам после ТГ наблюдалось 2-х и 3-х кратное увеличение общего числа ИП клеток относительно

контроля в полях СА3 и СА4, соответственно (рис. 19 Пв; рис. 21 Аа, Ба). Вместе с тем, к 3 суткам после ТГ количество интенсивно ИП клеток возрастало до 3000% и 500% относительно контроля в полях СА3 и СА4, соответственно (рис. 21 Ав, Бв). В поле СА1 и зубчатой извилине также отмечалось усиление интенсивности иммунореактивности к 3 суткам после ТГ (рис. 20 Пв).

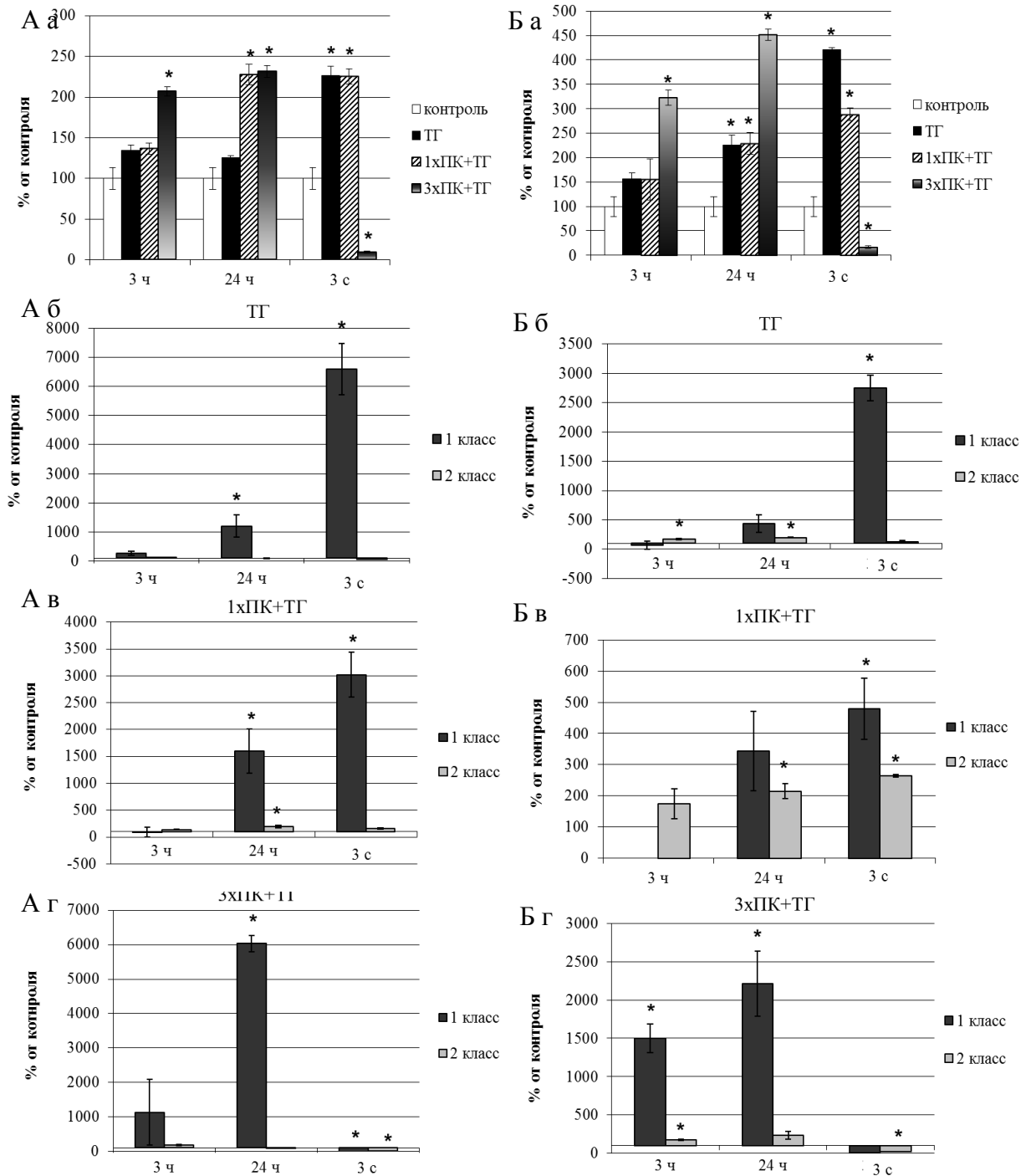


Рис.21. Паттерн экспрессии NF-карраВ(р65) в полях СА3 (А) и СА4 (Б) гиппокампа крыс через 3 ч-3 суток после ТГ у неПК-(б) и однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – общее количество р65-ИП клеток; б,в,г – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

В отличие от этого, у трехкратно ПК-животных вслед за ТГ формировался иной паттерн экспрессии по сравнению с неПК- и однократно ПК-животными. В полях СА3 и СА4 уже через 3 ч после ТГ общее количество ИП клеток составляло 210% и 320% относительно контроля вместо 130% и 150% у неПК-животных, соответственно (рис. 21 Аа, Ба). При этом в поле СА4 также увеличивалось количество интенсивно ИП клеток в 15 раз по сравнению с контролем (рис. 21 Бг). К 24 ч после ТГ уровень экспрессии был максимальным: общее количество ИП клеток составляло 230% и 450%, а количество интенсивно ИП – 6000% ($F=546.276$, $p=4.02E-07$) и 2200% ($F=24.544$, $p=0.0257$) от контроля в полях СА3 и СА4, соответственно (рис. 19 Ig; рис. 21 Ааг, Баг). В поле СА1 и зубчатой извилине уровень экспрессии возрастал по сравнению с контролем к 24 ч, но в меньшей степени, чем в СА3 и СА4 (рис. 20 Ig). К 3 суткам после ТГ, в отличие от неПК- и однократно ПК-животных, у которых на этом сроке экспрессия была максимальной, у трехкратно ПК-животных наблюдался ее спад во всех полях гиппокампа. В частности, в СА3 и СА4 общее количество клеток снизилось до 10% и 15% относительно контроля, соответственно, и все клетки относились к разряду слабо ИП (рис. 19 IIг; рис. 21 Авг, Баг). В поле СА1 и зубчатой извилине уровень иммунореактивности возвращался к контрольному значению (рис. 20 IIг).

В целом, в гиппокампе ТГ у неПК- и однократно ПК-животных приводили к отсроченному увеличению уровня экспрессии р65 в гиппокампе, тогда как трехкратное ПК-воздействие напротив, вызывало увеличение экспрессии на раннем сроке (3-24ч), которое нивелировалось к 3 дню после ТГ.

c-Rel

Неокортекс

В контрольной группе животных выявлялись единичные ИП к c-Rel нервные клетки. ТГ приводила к снижению уровня экспрессии c-Rel к 3 ч после воздействия. Это выражалось в уменьшении общего числа ИП клеток на 30% и снижении интенсивности экспрессии на 40% относительно контроля (рис. 22 а,б). К 24 ч после ТГ уровень экспрессии c-Rel достоверно не отличался от контроля. У однократно ПК-крыс после ТГ отмечалось снижение общего количества c-Rel-ИП клеток на 40 % относительно контроля к 24 ч, но интенсивность экспрессии не отличалась от контроля (рис. 22 а,в). Трехкратное ПК также не изменяло уровня экспрессии c-Rel (рис. 22 а,г).

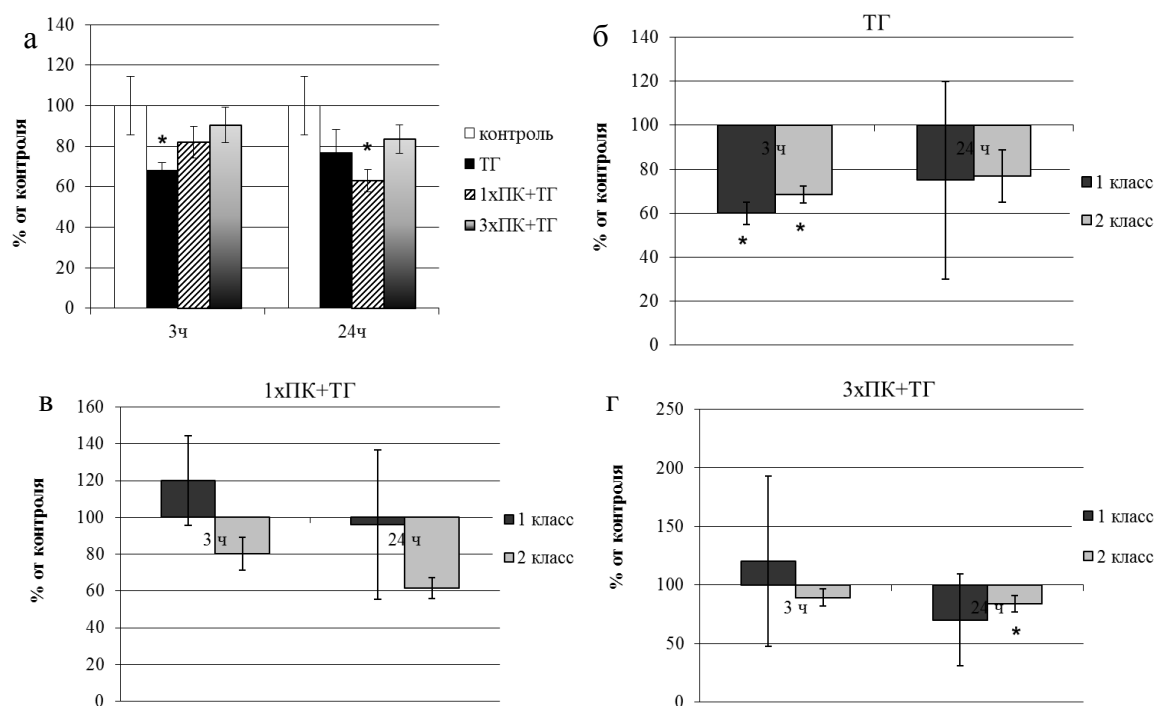


Рис.22. Паттерн экспрессии NF-карраВ(c-Rel) в V слое неокортекса крыс через 3-24 ч после ТГ у неПК-(б) и однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – общее количество c-Rel-ИП клеток; б,в,г – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

Гиппокамп

В исследуемых областях гиппокампа (CA1, CA3, CA4) отмечался слабый уровень иммунореактивности к c-Rel в срезах мозга контрольных животных. ТГ у неПК-крыс не вызывала изменений экспрессии c-Rel через 3 ч, но приводила к незначительному усилению иммунореактивности к c-Rel к 24 ч после воздействия. У однократно ПК-крыс уровень экспрессии c-Rel не изменялся после ТГ. В ответ на трехкратное ПК наблюдалось усиление иммунореактивности в CA3 к 3 ч, а в CA4 – к 24 ч после ТГ.

3.2.1.4. Особенности экспрессии субъединиц ТФ NF-карраВ p65 и c-Rel при действии одного или трех сеансов УГГ

p65

Неокортекс

В ответ на действие одного сеанса УГГ, без последующего применения ТГ, отмечалось увеличение общего числа ИП к p65 клеток в 2 раза по отношению к контролю к 24 ч после воздействия, что обусловлено увеличением числа слабо ИП клеток, поскольку количество интенсивно экспрессирующих клеток достоверно не отличалось от контроля (рис. 23 а,б; рис. 24 а,б). В отличие от этого, трехкратное применение УГГ, помимо увеличения общего количества ИП клеток, приводило также к значительному усилению интенсивности экспрессии (в 4,8 раз относительно контроля) на том же сроке (рис. 23 а,б; рис. 24 г).

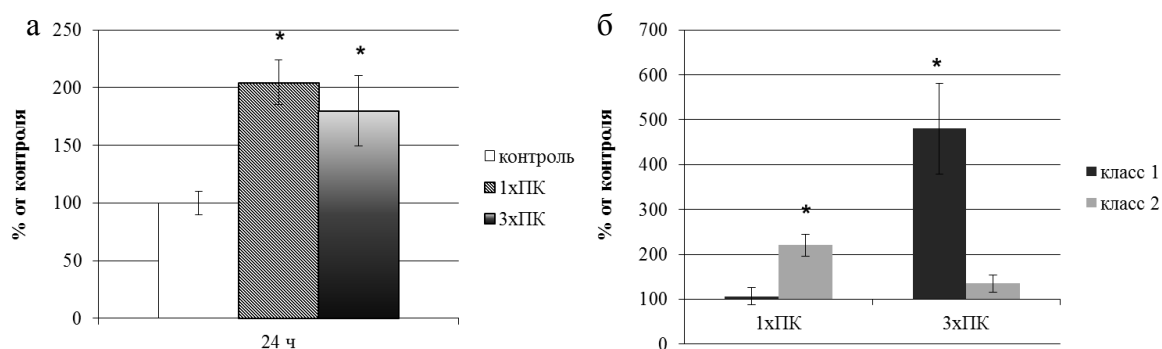


Рис. 23. Паттерн экспрессии NF-карраВ(р65) в V слое неокортекса крыс через 24 ч после предъявления одного или трех сеансов УГГ. а – общее количество р65-ИП клеток; б – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.



Рис. 24. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии NF-карраВ(р65) в V слое неокортекса через 24 ч после последнего сеанса УГГ. а – контроль; б – однократная УГГ; в – трехкратная УГГ. Маркер 100 мкм.

Гиппокамп

В ответ на действие УГГ в обоих режимах не было обнаружено существенных изменений экспрессии р65 через 24 ч после воздействия. Один сеанс УГГ не изменял уровень экспрессии р65 в полях СА3 и СА4 (рис. 25 Ааб, Баб). В поле СА1 и зубчатой извилине наблюдалось снижение интенсивности иммунореактивности. В ответ на трехкратное применение УГГ общее количество ИП клеток увеличивалось на 45% и 160% в полях СА3 и СА4, соответственно, но интенсивность экспрессии достоверно не отличалась от контроля (рис. 25 Ааб, Баб). В поле СА1 и зубчатой извилине уровень экспрессии р65 не изменялся.

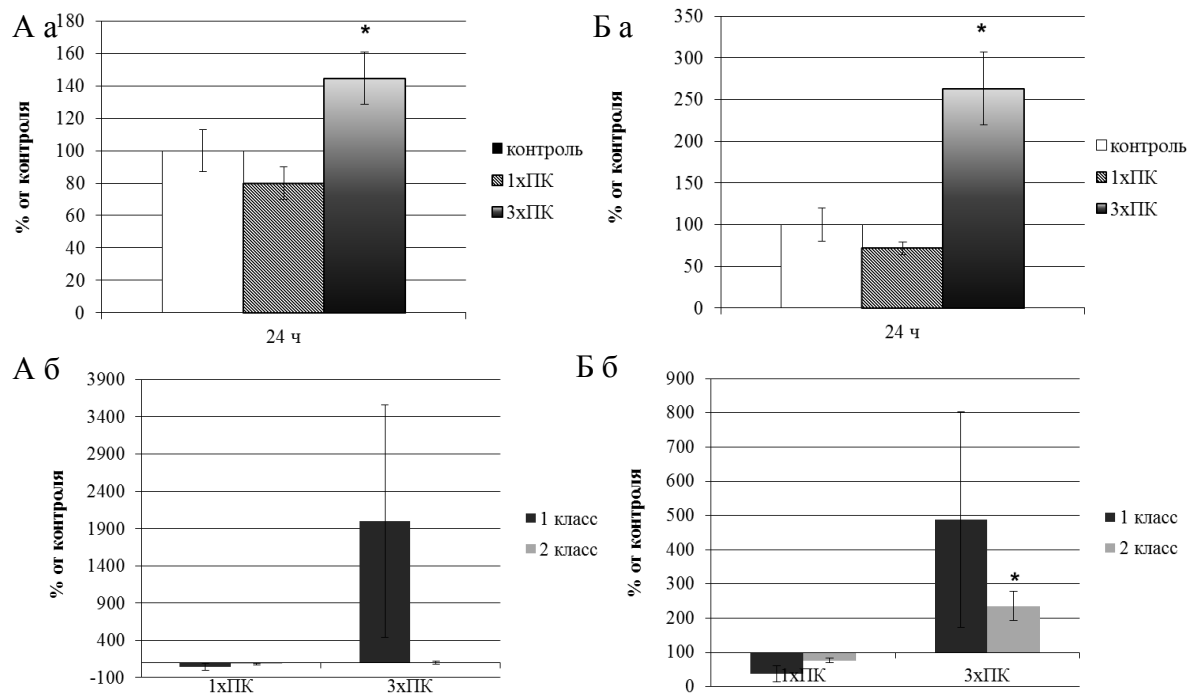


Рис. 25. Паттерн экспрессии NF-карраВ(p65) в полях СА3 (А) и СА4 (Б) гиппокампа крыс через 24 ч после предъявления одного или трех сеансов УГГ. а – общее количество p65-ИП клеток; б – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

Таким образом, в неокортексе оба режима УГГ приводили к увеличению общего числа p65-иммунопозитивных клеток, однако, усиление интенсивности экспрессии отмечалось только в ответ на трехкратное предъявление УГГ. В гиппокампе при предъявлении одного или трех сеансов УГГ не было выявлено существенных изменений экспрессии p65.

c-Rel

Неокортекс и гиппокамп

В ответ на УГГ изменения экспрессии наблюдались лишь при трехкратном ее применении, как в неокортексе, так и в гиппокампе крыс. При этом в неокортексе количество c-Rel-интенсивно ИП клеток увеличивалось на 900% относительно контроля (рис. 26 б). Однократная УГГ не оказывала эффекта на уровень экспрессии c-Rel в неокортексе и гиппокампе (рис. 26 аб).

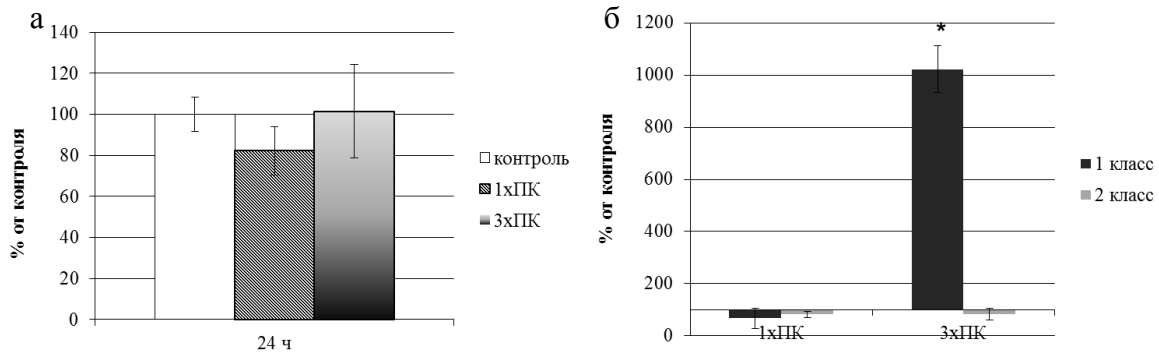


Рис. 26. Паттерн экспрессии NF-карраВ(c-Rel) в V слое неокортекса крыс через 24 ч после предъявления одного или трех сеансов УГГ. а – общее количество c-Rel-ИП клеток; б – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

Таким образом, выявлен сложный паттерн экспрессии разных субъединиц семейства ТФ NF-карраВ в неокортексе и гиппокампе крыс при предъявлении различных режимов гипобарической гипоксии. Воздействие ТГ заметно снижает уровень c-Rel и не изменяет экспрессию p65 в неокортексе и гиппокампе на ранних сроках (3-24ч). Ранее, в нашей лаборатории было показано, что ТГ подавляет экспрессию другой субъединицы NF-карраВ(p50) (Rybnikova et al., 2008). Известно, что тяжелая ишемия снижает уровень NF-карраВ (p65) в чувствительных областях мозга в этот период (Botchkina et al., 1999). Блокирование активности NF-карраВ нивелирует нейропротективный эффект TNF α и увеличивает количество гибнущих нейронов при действии оксидативного стресса (FeSO $_4$) или β -амилоидного пептида (Mattson et al., 1997). Эти факты свидетельствуют о том, что, подавление активности ТФ NF-карраВ (субъединиц c-Rel и p50) на раннем сроке способствует развитию повреждений клеток мозга при действии тяжелой гипоксии и ишемии.

Вместе с тем, в наших экспериментах было обнаружено, что экспрессия NF-карраВ(p65) увеличивается в отдаленный период (3 суток) после ТГ. Аналогичное увеличение экспрессии NF-карраВ описано в инфарктной области переднего мозга через 5 дней после фокальной ишемии (Botchkina et al., 1999). Кроме того, другими авторами выявлено увеличение ДНК-связывающей активности NF-карраВ в инфарктной области неокортекса к 5 суткам после ишемии (Salminen et al., 1995). Известно, что при гипоксии/ишемии большинство патологических процессов, приводящих к тяжелому морфо-функциональному повреждению мозга, развиваются в первые минуты и часы инсульта (Shukitt-Hale et al., 1996; Simonova et al., 2003; Fujimura et al., 2000). Было показано, что тяжелая гипобарическая гипоксия (180 мм рт ст., 3 ч) индуцирует в чувствительных к гипоксии нейронах мозга запуск отсроченного апоптоза. Методом TUNEL спустя 3 суток после ТГ в гиппокампе и неокортексе крыс выявлялось большое число апоптотических клеток с фрагментацией ДНК (Рыбникова и др., 2004; Rybnikova

et al., 2006). Согласно результатам настоящего исследования этот процесс совпадает с отсроченной оверэкспрессией субъединицы p65 в гиппокампе и неокортексе крыс, подвергнутых ТГ. Возможно, стимуляция экспрессии p65 в отдаленный период после повреждающего воздействия может быть связана не с адаптивными процессами, а с развитием патологий. Подобный феномен уже описан для ряда других ТФ, в том числе c-Fos, HIF-1, и др. (Баранова и др., 2009). Это подтверждается также и другими работами. В частности, в работе Clemens et. al. показано, что увеличенная экспрессия NF-kappaB (p50 и p65) наблюдается через 3 суток после 30 мин окклюзии сонных артерий в гибнущих нейронах поля СА1 гиппокампа (Clemens et. al., 1997). Авторы связывают повышенную экспрессию NF-kappaB в этот период с нейродегенерацией.

В ответ на однократное ПК на раннем сроке (3 ч) после ТГ уровень экспрессии субъединиц NF-kappaB не изменяется ни в неокортексе ни в гиппокампе. Однако к 3 суткам после ТГ у однократно ПК-животных, также как и у неПК-животных, в гиппокампе наблюдается усиление уровня экспрессии субъединицы p65. В отличие от этого, у трехкратно ПК-крыс отмечается усиление уровня иммунореактивности к обеим субъединицам NF-kappaB (p50 и p65) уже на раннем сроке (3-24 ч) после ТГ. Известно, что ранний период после повреждающего воздействия является критическим для клетки, поскольку в это время происходит запуск либо апоптоза, либо антиапоптотической программы. В свете современных представлений о том, что NF-kappaB играет нейропротективную роль при действии неблагоприятных факторов (Goodman, Mattson, 1996; Mattson et al., 1997; Sarnico et al., 2009; Lanzillotta et al., 2012), можно заключить, что повышенная экспрессия NF-kappaB у трехкратно ПК-животных в этот период после ТГ участвует в предотвращении индукции процесса апоптоза, способствуя выживанию нервных клеток. К тому же основную массу иммунореактивных клеток при этом составляют интенсивно ИП клетки. То есть значительная часть димеров NF-kappaB находится в данный период времени в функционально активном состоянии, регулируя активность генов-мишеней, экспрессия которых, по-всей видимости, и вносит вклад в обеспечение устойчивой толерантности нейронов к ТГ. В противоположность неПК- и однократно ПК-животным, у которых ТГ повышает отсроченную экспрессию p65 (3 суток), у трехкратно ПК-крыс наблюдается нормализация уровней этой субъединицы в отдаленный период в гиппокампе. Это важное обстоятельство, поскольку необходимым условием нормального функционирования системы, в частности клетки, является ее способность возвращаться к состоянию гомеостаза после стрессорного воздействия. Полученные результаты согласуются с данными по стимулирующим эффектам других способов ПК на экспрессию NF-kappaB в мозге (Blondeau et al., 2001; Ravati et al., 2001; Goodman, Mattson, 1996). В частности, в модели ишемического ПК обнаружено увеличение ДНК-

связывающей активности и транслокации в ядро субъединиц NF-κappaB p50 и p65 (Blondeau et al., 2001). Ингибирование активации NF-κappaB как с использованием фармакологических ингибиторов, так и олигонуклеотидных ловушек, отменяет нейропротекцию, индуцированную ПК (Blondeau et al., 2001). В другой работе показано, что для предотвращения апоптоза HL60 клеток необходима активация ТФ NF-κappaB, вызванная химическим ПК (Eliseev et al., 2004). Умеренный оксидативный стресс приводит к NF-κappaB-зависимой активации антиапоптотических факторов, и предотвращает повреждения мозга после кратковременной очаговой церебральной ишемии (Song et al., 2007).

При применении УГГ без последующей ТГ обнаружено, что УГГ увеличивает уровень иммунореактивности к обеим субъединицам NF-κappaB в неокортексе и гиппокампе только при трехкратном ее применении, тогда как однократный сеанс УГГ не оказывает влияния на уровень экспрессии NF-κappaB. В случае трехкратной УГГ большее число клеток приходится на долю интенсивно ИП, в отличие от контрольных животных. При этом NF-κappaB локализован преимущественно в цитоплазме, т.е. находится в функционально неактивном состоянии. Можно предположить, что повышенное количество неактивного ТФ NF-κappaB находится в клетке в тот период (через 24 ч после ПК), когда предъявляется повреждающий стимул (ТГ). Очевидно, за счет этого клетка оказывается лучше подготовленной к повреждающему воздействию, поскольку в ответ на его действие значительно большее число димеров NF-κappaB будет активировано, что обеспечит более массивную активацию про-адаптивных мишеней этого ТФ. Ранее нами было обнаружено, что трехкратная УГГ также вызывает в нейронах неокортекса и гиппокампа оверэкспрессию другой субъединицы семейства NF-κappaB – белка p50, что также должно способствовать формированию гипоксической толерантности (Rybnikova et al., 2008).

Как уже неоднократно отмечалось выше, долговременная толерантность мозга к повреждающим факторам, достигаемая с помощью гипоксического/ишемического ПК, связана с ТФ-зависимой активацией про-адаптивных нейропротективных генов и экспрессией их продуктов (Steiger, Hangii, 2007; Самойлов, Рыбникова, 2012). Ранее было показано, что у крыс, подвергнутых трехкратному ПК, в отличие от неПК крыс, наблюдаются модификации активности ранних генов с последующей оверэкспрессией соответствующих белков NGFI-A и c-Fos, увеличение экспрессии цитозольных и митохондриальных антиоксидантов (Trx-1, Cu, Zn-СОД, Trx-2, Mn-СОД), увеличение уровней анти-апоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL и снижение уровня про-апоптотического белка Bax в неокортексе и гиппокампе в ответ на ТГ (Самойлов и др., 2005; Строев, Самойлов, 2006; Rybnikova et al., 2005, 2006). Известно, что в протекции, создаваемом ишемическим ПК, ведущая роль принадлежит ап-регуляции Bcl-2, Bcl-xL на фоне редукции Bax (Wu et al., 2003). Активация Mn-СОД защищает клетки от окислительного стресса, вызванного фокальной ишемией головного мозга, и предотвращает

нейроны от апоптоза (Keller et al., 1998; Kim et al., 2002; Ravati et al., 2001). Известно, что гены, кодирующие большинство из этих белков, являются мишенями для ТФ NF-κappaB. В частности, NF-κappaB отвечает за индукцию генов, кодирующих пептидный антиоксидант Mn-COD (White et al., 2000; Mattson et al., 1997), белки-ингибиторы апоптоза IAPs (inhibitors of apoptosis) (Xu et al., 1997), нейротрофический фактор BDNF (Lipsky et al., 2001), анти-апоптотические гены *bcl-2*, *bcl-xL*, и репрессию активности про-апоптотического *bax* (Tamatani et al., 2000; Grilli, Memo, 1998; Bentires-Alj et al., 2002; Bui et al., 2001; Mattson, Meffert, 2006). Поэтому повышенная экспрессия указанных продуктов про-адаптивных генов в ответ на ТГ в неокортексе мозга ПК крыс в значительной мере обусловлена активацией NF-κappaB. Кроме того, ряд авторов полагает, что NF-κappaB может хотя бы частично реализовывать свои нейропротективные действия, регулируя экспрессию белков, участвующих в поддержании гомеостаза внутриклеточного кальция. В частности, показано, что NF-κappaB может регулировать возбудимость нейронов, изменяя ионные потоки всей клетки через кальциевые потенциал-зависимые каналы и каналы, связанные с ионотропными глутаматными рецепторами (Furukawa, Mattson, 1998). При этом авторы считают, что механизм действия связан с NF-κappaB-зависимой регуляцией экспрессии специфической рецепторной субъединицы. Таким образом, полученные в настоящей работе данные подтверждают и дополняют современную концепцию о том, что активация ТФ NF-κappaB является необходимым событием для индукции толерантности мозга к гипоксии/ишемии и другим повреждающим воздействиям (Blondeau et al., 2001; Mattson, Meffert, 2006; Xuan et al., 1999; Ravati et al., 2001; Sompol et al., 2006; Marini et al., 2007). Вместе с тем, только трехкратные, а не однократные, воздействия УГГ способны вызвать достаточно выраженную активацию этого ТФ, что приводит к экспрессии ряда про-адаптивных генов, обеспечивающих развитие устойчивого нейропротективного эффекта при действии последующей ТГ.

3.2.2. Лиганд-зависимые ТФ ГР и МР

3.2.2.1. Влияние ТГ на уровень экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в нейронах неокортекса и гиппокампа неПК-, однократно или трехкратно ПК-крыс

Неокортекс

В неокортексе контрольной группы животных отмечался умеренный уровень экспрессии глюкокортикоидных рецепторов (ГР), при этом преобладали в основном слабо-ИП нейроны и в меньшей степени присутствовали интенсивно ИП клетки. Воздействие ТГ не изменяло общего числа иммунопозитивных к ГР клеток в обоих исследуемых слоях неокортекса неПК-крыс (рис. 27 Аа, Ба). При этом происходило увеличение интенсивности экспрессии на 160% через 24 ч после ТГ во II слое неокортекса и на 300% через 3 ч-3 суток после ТГ в V слое неокортекса (рис. 27 Аб, Бб). У однократно ПК-животных во II слое неокортекса отмечалось увеличение общего количества ИП клеток на 20-50%, а в V слое неокортекса - на 40-80% относительно контроля на всех сроках после ТГ (рис. 27 Аа, Ба). Интенсивность экспрессии ГР после ТГ у однократно ПК-животных изменялась схожим образом в обоих слоях неокортекса. Через 3 ч после ТГ наблюдалась тенденция к снижению количества интенсивно ИП клеток на 30 и 100%, а к 24 ч и 3 суткам после ТГ - возрастание их числа до 480% ($F=376.705$, $p=5.16E-08$) и 830% ($F=49.561$, $p=0.00011$) относительно контроля во II и V слоях неокортекса, соответственно (рис. 27 Ав, Бв). В ответ на трехкратное ПК на раннем сроке (3 ч) после ТГ, в отличие от однократного ПК, не происходило снижения интенсивности экспрессии ГР – количество интенсивно ИП клеток либо не изменялось во II слое либо увеличивалось (на 260%) в V слое неокортекса (рис. 27 Аг, Бг). На сроке 24 ч после ТГ уровень экспрессии ГР был максимальным: это проявлялось в увеличении как общего количества более, чем в 2 раза, так и количества интенсивно ИП клеток на 475% и 1345% ($F=101.908$, $p=2.01E-05$) относительно контроля во II и V слоях неокортекса, соответственно (рис. 27 Ааг, Баг). К 3 суткам после ТГ уровень экспрессии ГР немного снижался, но все равно был значительно выше контрольного значения. Количество интенсивно ИП клеток превышало контроль на 250% и 450% во II и V слоях неокортекса, соответственно (рис. 27 Аг, Бг).

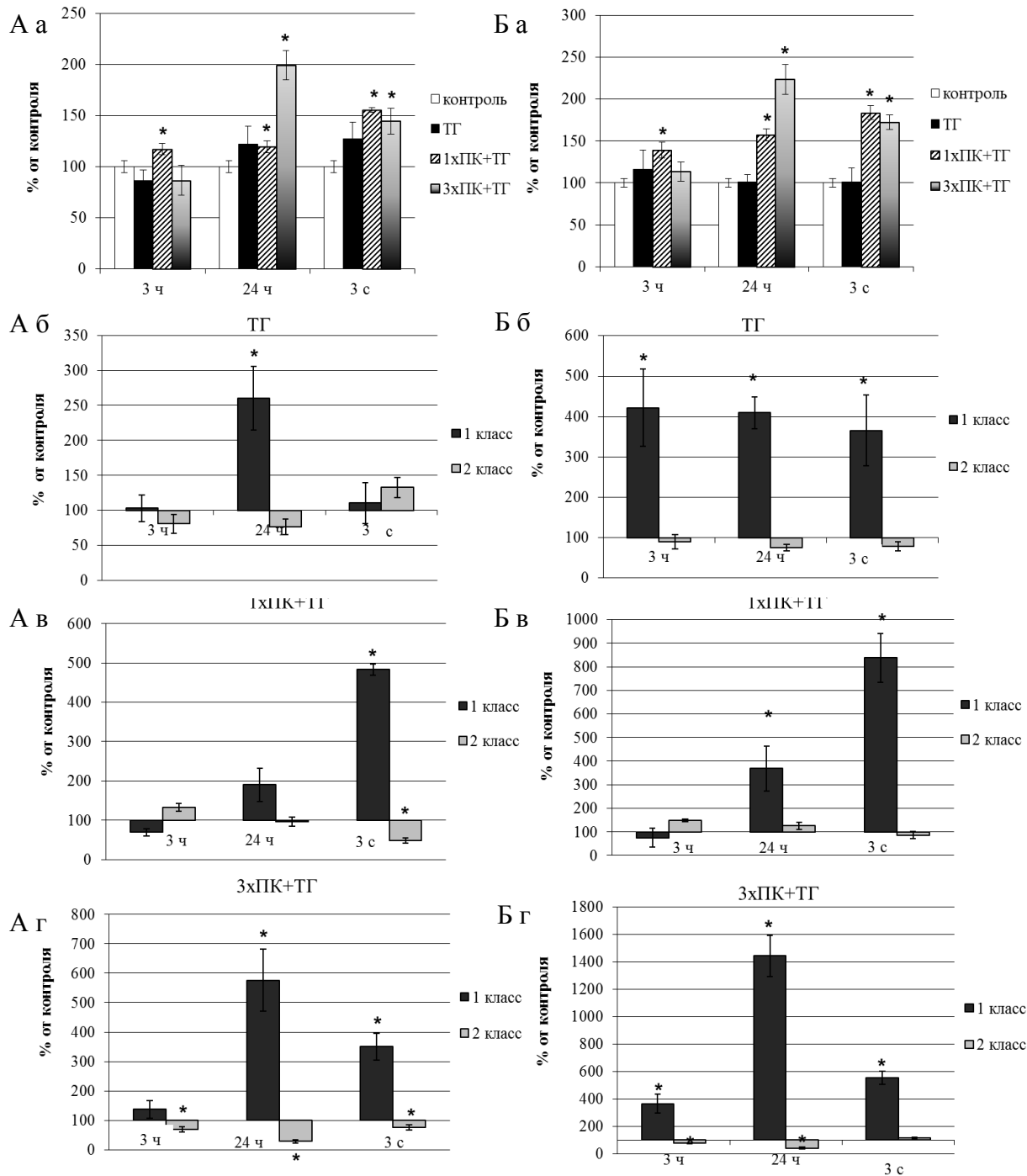


Рис. 27. Паттерн экспрессии ГР во II (А) и V (Б) слоях неокортекса крыс через 3 ч-3 суток после ТГ у неПК-(б) и однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – общее количество ГР-ИП клеток; б,в,г – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

Таким образом, ТГ у неПК и ПК крыс приводила к увеличению уровня экспрессии ГР в неокортексе, однако паттерн экспрессии был различен при разных режимах гипобарической гипоксии. В частности, ТГ у неПК крыс вызывала умеренное увеличение уровня экспрессии ГР. У однократно ПК-животных наблюдалось возрастание уровня экспрессии ГР к 3 суткам после ТГ. У трехкратно ПК-животных, напротив, наблюдалась ранняя (через 24 ч) активация экспрессии ГР после ТГ.

Гиппокамп

В поле СА1 гиппокампа в контрольной группе животных отмечался умеренный уровень экспрессии ГР, преобладали в основном слабо ИП клетки (рис. 28. Аа).

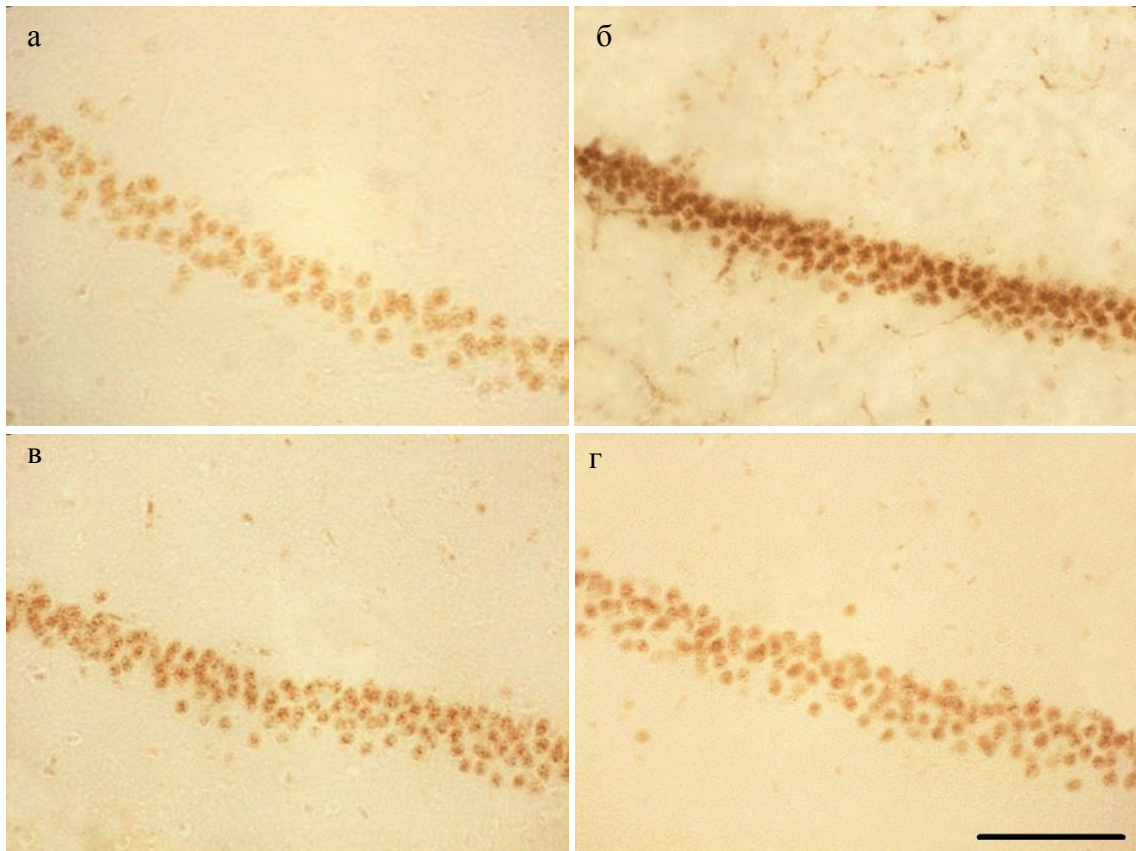


Рис. 28. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии ГР в поле СА1 гиппокампа через 24 ч после ТГ у неПК(б), однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – контроль. Маркер 100 мкм.

Воздействие ТГ у неПК-животных не вызывало изменений общего количества ИП к ГР клеток в поле СА1 гиппокампа к 3 и 24 ч после воздействия (рис. 29 Аа). Однако к 24 ч после ТГ происходило существенное увеличение доли интенсивно экспрессирующих клеток (до 191% относительно контроля) (рис. 28 б; рис. 29 Аб). К 3 суткам после ТГ, напротив, наблюдалось снижение как общего количества ИП к ГР клеток (на 25%), так и количества интенсивно ИП клеток (на 30% относительно контроля). Однократное ПК приводило к увеличению экспрессии ГР в СА1. Это выражалось в увеличении общего числа ИП клеток на 37% через 3 ч и на 18% через 3 суток после ТГ (рис. 29 Аа). Вместе с тем происходило усиление интенсивности экспрессии на 30-40% через 3-24 ч и на 60% через 3 дня после ТГ (рис. 28 в; рис. 29 Ав). При трехкратном ПК-воздействии уровень экспрессии ГР в СА1 к 3 ч после ТГ уменьшался за счет снижения содержания интенсивно экспрессирующих клеток (на 37% относительно контроля), но к 24 ч и 3 суткам после ТГ достоверно не отличался от контроля (рис. 28 г; рис. 29 Ааг).

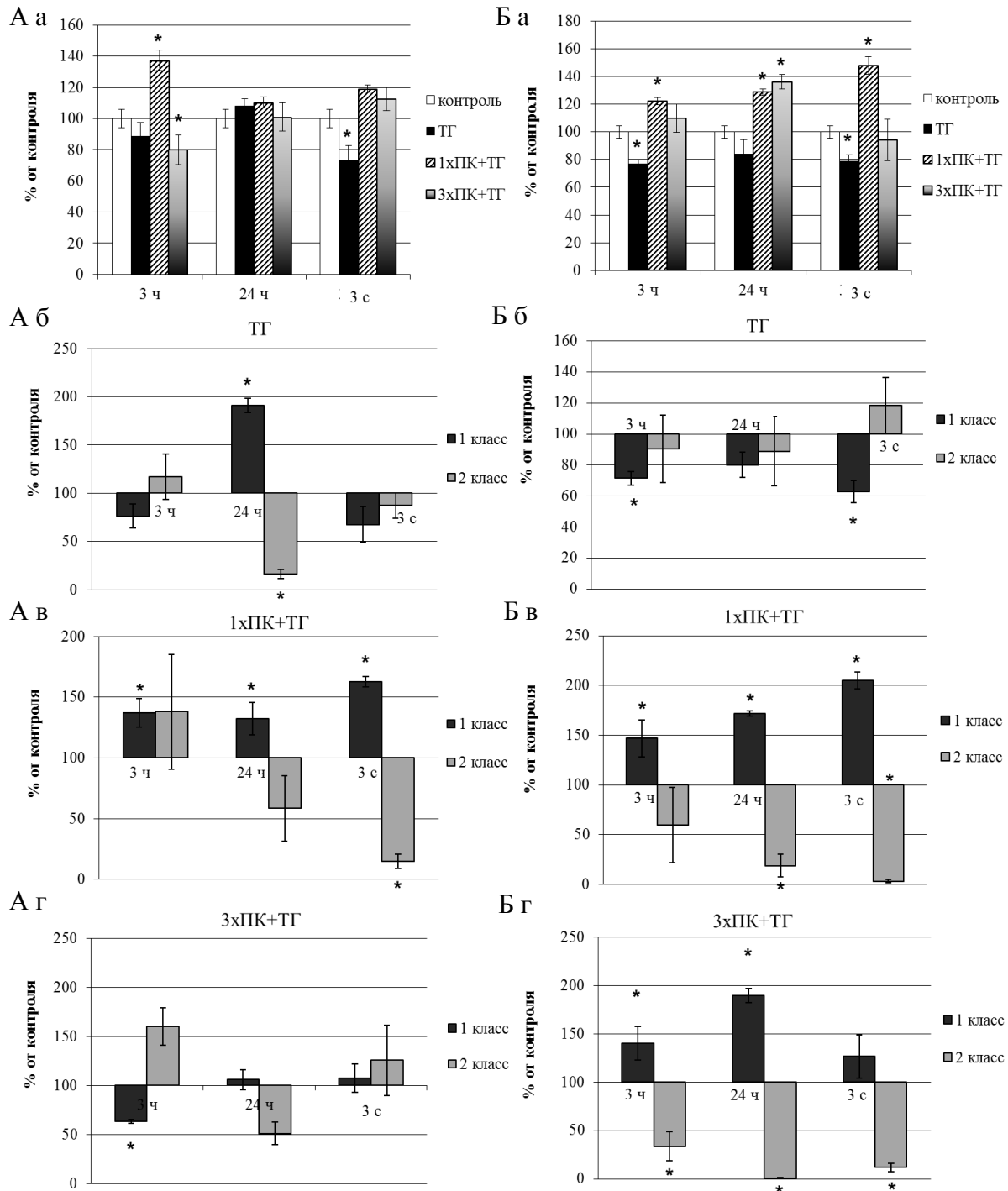


Рис. 29. Паттерн экспрессии ГР в поле СА1 (А) и зубчатой извилине (Б) гиппокампа крыс через 3 ч-3 суток после ТГ у неПК-(б) и однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – общее количество ГР-ИП клеток; б,в,г – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

В зубчатой извилине наблюдалось подавление экспрессии ГР после ТГ у неПК-крыс. Это проявлялось в снижении общего числа ИП клеток на 20% через 3 ч и 3 суток после ТГ, а также в уменьшении интенсивности экспрессии в среднем на 20-40% по сравнению с контролем на всех сроках после ТГ (рис. 29 Баб; рис. 30 б). Однократное ПК приводило к постепенному увеличению уровня экспрессии ГР от 3 ч к 3 суткам после ТГ. При этом общее количество

возрастало на 22% через 3 ч и 47% от контроля к 3 суткам (рис. 29 Ба). Количество интенсивно ИП клеток также возрастало на 46% через 3 ч и 105% относительно контроля через 3 суток после ТГ (рис. 29 Бв). В ответ на трехкратное ПК в зубчатой извилине происходило увеличение уровня экспрессии ГР к 3-24 ч после ТГ. При этом максимальное увеличение экспрессии отмечалось через 24 ч после ТГ – также как и в неокортексе: общее количество ИП клеток возрастало на 36%, а количество интенсивно ИП клеток – на 90% ($F=80.731$, $p=4.2E-06$) относительно контроля (рис. 29 Баг; рис. 30 г). К 3 суткам после ТГ уровень экспрессии ГР возвращался к контрольному значению.

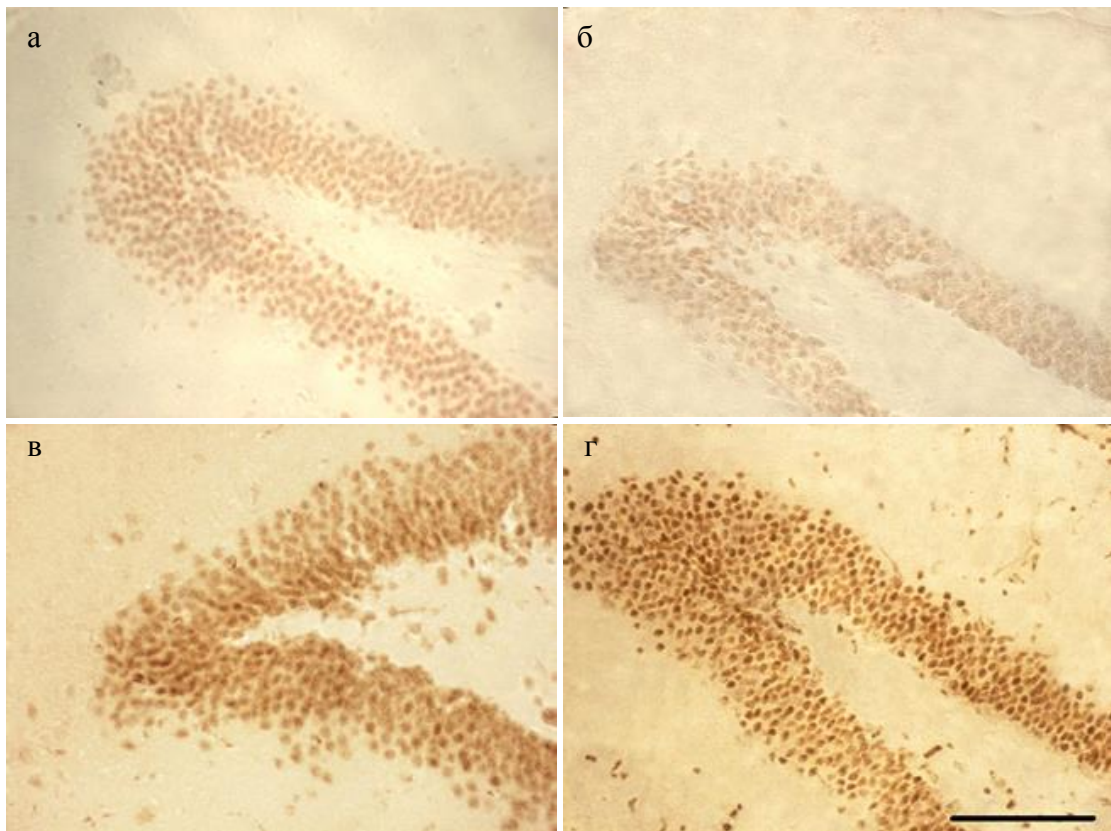


Рис. 30. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии ГР в поле зубчатой извилины гиппокампа через 24 ч после ТГ у неПК(б), однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – контроль. Маркер 100 мкм.

3.2.2.2. Особенности экспрессии глюкокортикоидных рецепторов при действии одного или трех сеансов УГГ

Неокортекс

УГГ в обоих используемых режимах (один или три сеанса) приводила к увеличению уровня экспрессии ГР в неокортексе, но в ответ на трехкратную УГГ изменения были наиболее выраженными. Один сеанс УГГ увеличивал количество интенсивно ИП клеток на 100% относительно контроля в обоих слоях неокортекса (рис. 31 Ааб, Баб; рис. 32 б). В ответ на три сеанса УГГ во II слое происходило увеличение количества интенсивно ИП клеток на 200% ($F=109.25$, $p=1.6E-05$) относительно контроля (рис. 31 Бб). В V слое трехкратная УГГ имела

более выраженный эффект, чем во II слое – количество интенсивно ИП клеток увеличивалось на 1150% ($F=264.677$, $p=8.07E-07$) (рис. 31 Бб; рис. 32 в). Вместе с тем происходило увеличение общего числа ИП клеток на 70% относительно контроля (рис. 31 Ба).

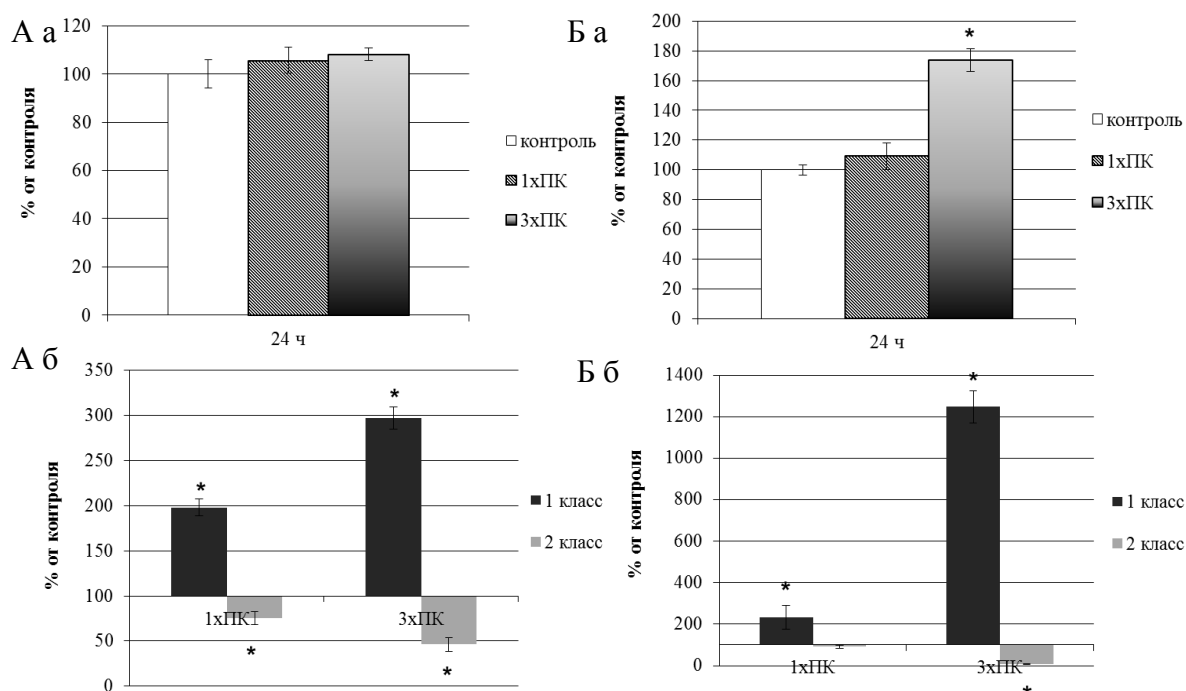


Рис. 31. Паттерн экспрессии ГР во II (А) и V (Б) слоях неокортекса крыс через 24 ч после предъявления одного или трех сеансов УГГ. а – общее количество ГР-ИП клеток; б – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

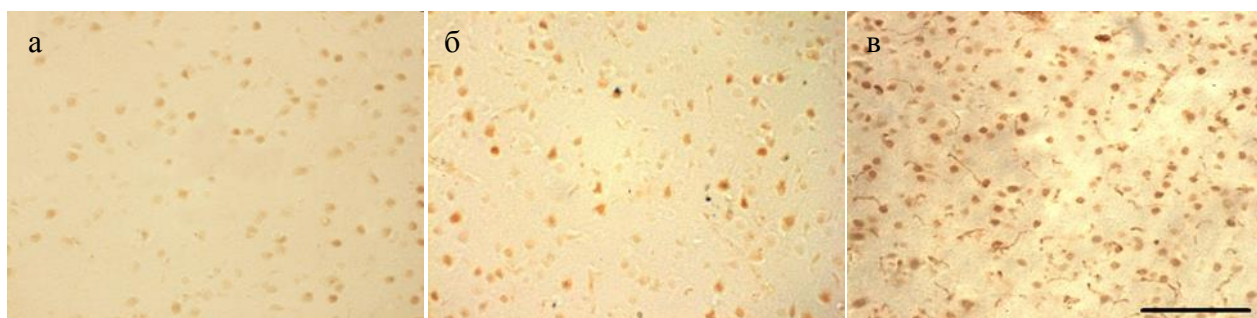


Рис. 32. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии ГР в V слое неокортекса крыс через 24 ч после последнего сеанса УГГ. а – контроль; б – однократная УГГ; в – трехкратная УГГ. Маркер 100 мкм.

Гиппокамп

В ответ на действие УГГ, в нейронах поля СА1 гиппокампа ни одно-, ни трехкратные сеансы УГГ не изменяли иммунореактивности к ГР через 24 ч после воздействия (рис. 33 Ааб; рис. 34 А). В зубчатой извилине в ответ на однократное воздействие УГГ не было выявлено достоверных изменений экспрессии ГР относительно контроля на сроке 24 ч (рис. 33 Баб; рис. 34 Бб). Напротив, три сеанса УГГ приводили к существенному увеличению экспрессии ГР (рис. 34 Бв). При этом общее число ИП клеток составляло 117%, а доля интенсивно ИП - 174% относительно контроля (рис. 33 Баб).

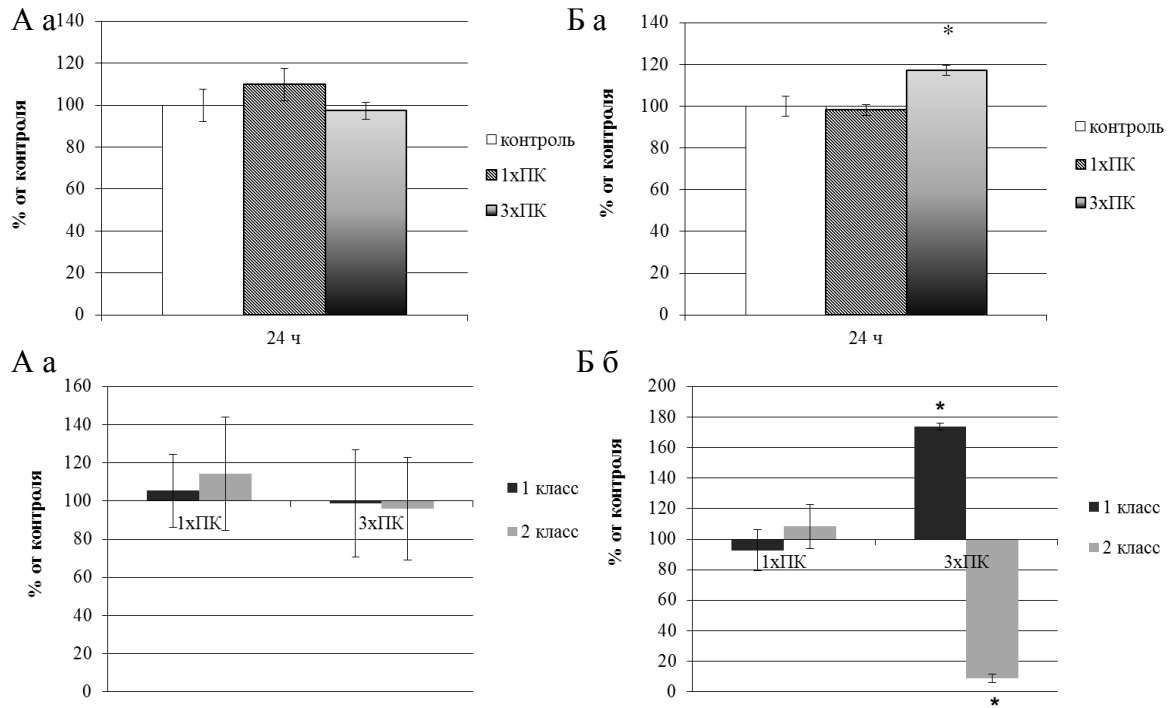


Рис. 33. Паттерн экспрессии ГР в поле СА1 (А) и зубчатой извилине (Б) гиппокампа крыс через 24 ч после предъявления одного или трех сеансов УГГ. а – общее количество ГР-ИП клеток; б – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

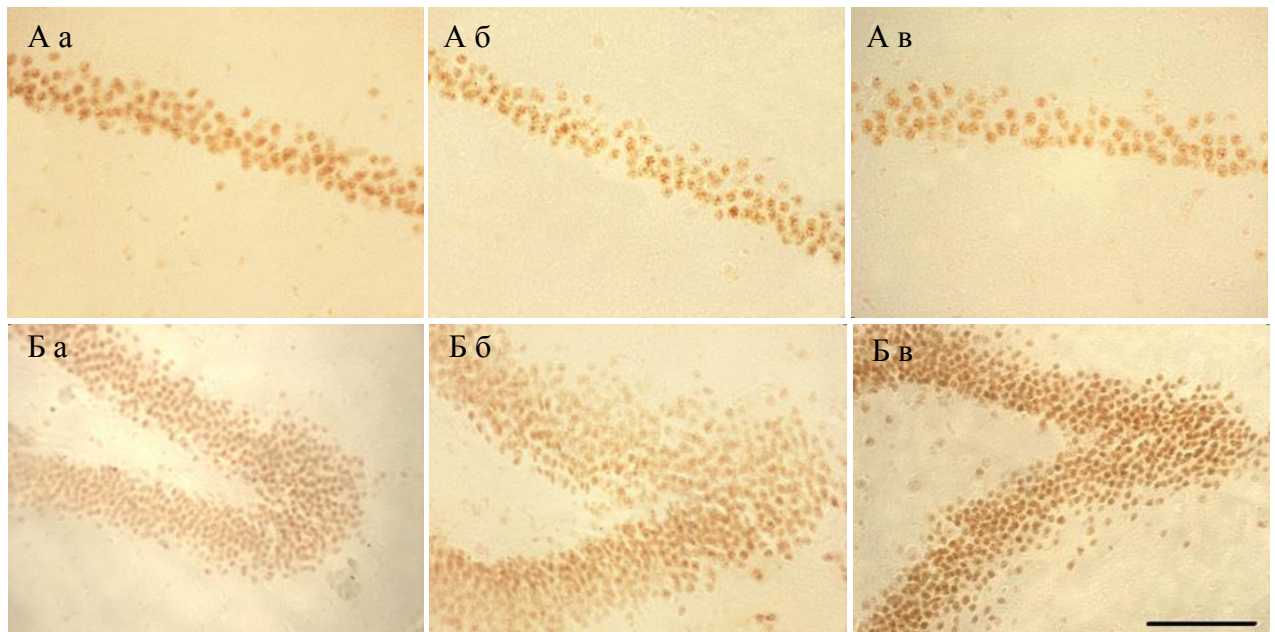


Рис. 34. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии ГР в поле СА1 (А) и зубчатой извилине (Б) гиппокампа крыс через 24 ч после последнего сеанса УГГ. а – контроль; б – однократная УГГ; в – трехкратная УГГ. Маркер 100 мкм.

Таким образом, в неокортексе (особенно в V слое) наблюдалось усиление экспрессии ГР в ответ на оба режима УГГ, однако наиболее выраженное увеличение уровня экспрессии ГР отмечалось при предъявлении трех сеансов УГГ. В гиппокампе эффект УГГ был менее выраженным по сравнению с неокортексом, и увеличение экспрессии наблюдалось только в зубчатой извилине гиппокампа в ответ на трехкратную УГГ.

3.2.2.3. Влияние ТГ на уровень экспрессии минералокортикоидных рецепторов в нейронах неокортекса и гиппокампа неПК-, однократно или трехкратно ПК-крыс

Неокортекс

В неокортексе (II и V слои) контрольной группы животных присутствовали иммунореактивные к минералокортикоидным рецепторам (МР) клетки, большинство из которых составляли слабо ИП нейроны. Воздействие ТГ не изменяло общего количества ИП нейронов, но сильно подавляло интенсивность экспрессии в обоих слоях неокортекса у неПК-крыс. При этом во II слое неокортекса количество интенсивно ИП клеток снижалось на 65% и 100% через 3 ч и 3 суток после ТГ, соответственно, а в V слое количество клеток этого класса уменьшалось на 95-100% относительно контроля на всех сроках после ТГ (рис. 35 Аб, Бб). У однократно ПК-крыс ТГ индуцировала незначительное увеличение общего количества ИП клеток в верхнем слое неокортекса на всех исследуемых сроках (3 ч – 3 суток) (рис. 35 Аа). Вместе с тем, через 3 ч после ТГ наблюдалось увеличение количества интенсивно ИП клеток во II слое (на 700%; $F=54.34$, $p=0.0003$) и незначительное в V слое неокортекса (на 150%) (рис. 35 Ав, Бв). Однако к 24 ч после ТГ отмечалась тенденция к снижению их количества до 21% и 35 % от контроля во II и V слоях неокортекса, соответственно, а к 3 суткам после ТГ интенсивно ИП клетки отсутствовали. У трехкратно ПК-животных ТГ не изменяла общего числа ИП клеток во II слое неокортекса, но увеличивала интенсивность экспрессии на 170% от контроля через 3 ч после воздействия (рис. 35 Ааг). К 3 суткам после ТГ уровень экспрессии МР во II слое неокортекса возвращался к контрольному значению. В V слое неокортекса в ответ на ТГ у трехкратно ПК-животных происходило незначительное снижение общего числа ИП клеток (на 30% от контроля) через 3 ч после воздействия (рис. 35 Ба). К 24 ч происходила активация экспрессии МР - количество интенсивно экспрессирующих клеток составляло 400% от контроля (рис. 35 Бг). Однако к 3 суткам после воздействия их количество снижалось на 50% относительно контроля.

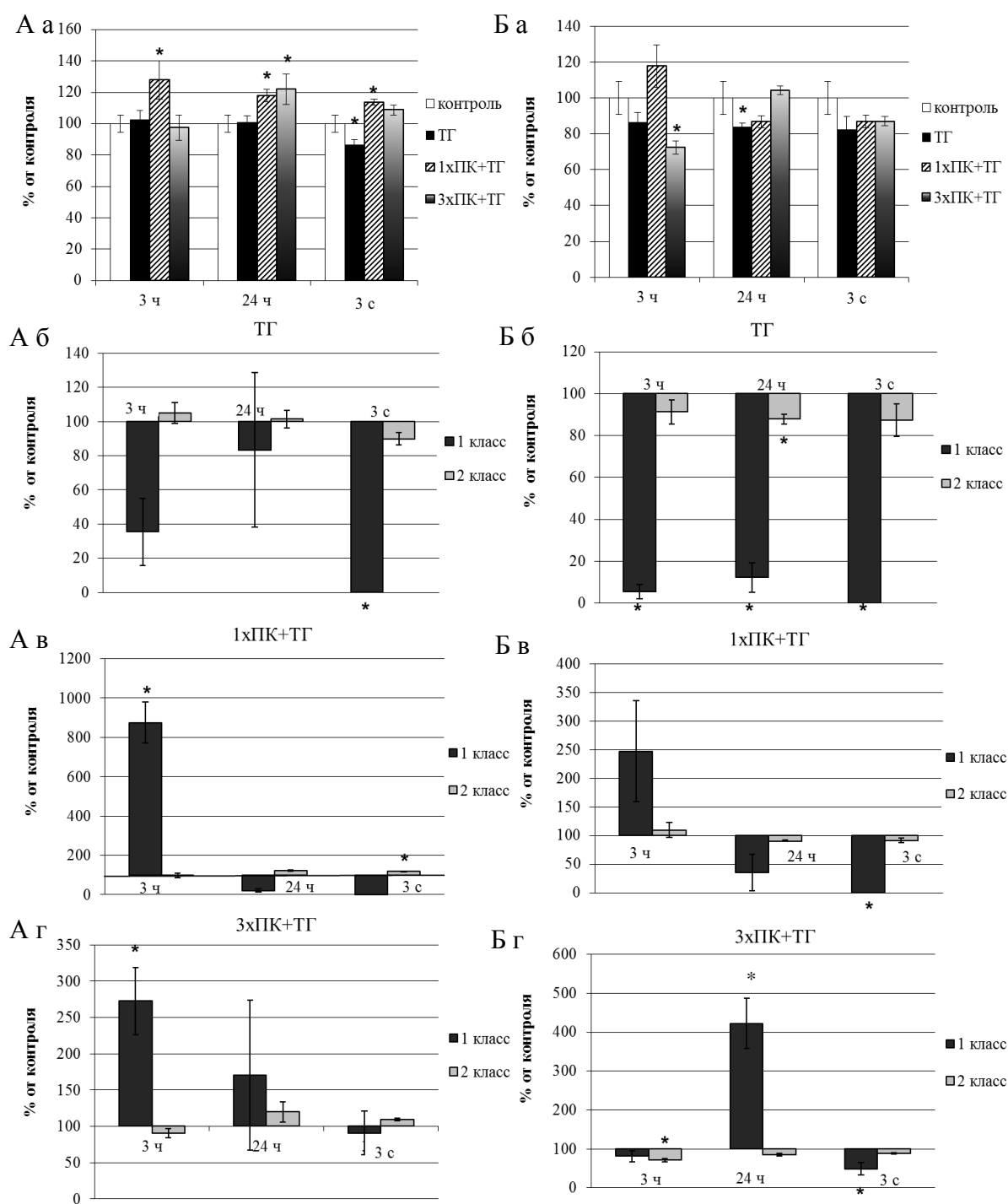


Рис. 35. Паттерн экспрессии МР во II(А) и V (Б) слоях неокортекса крыс через 3 ч-3 суток после ТГ у неПК-(б) и однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – общее количество МР-ИП клеток; б,в,г – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

Гиппокамп

В контрольной группе животных в поле СА1 гиппокампа наблюдался умеренный уровень экспрессии МР, преобладали, в основном, слабо ИП клетки (рис. 36 а). ТГ характеризовалась глубоким подавлением экспрессии МР в поле СА1 гиппокампа на всех сроках после воздействия (рис. 36 б). Это выражалось снижением доли интенсивно экспрессирующих клеток

на 96-100% ($F=85.575$, $p=8.57E-05$, 3 ч) относительно контроля, хотя общее количество иммунореактивных к МР клеток не изменялось (рис. 37 Ааб). Однократное ПК приводило к увеличению экспрессии МР через 3 ч после ТГ, что выражалось увеличением общего числа ИП клеток (на 34%) и увеличением доли интенсивно ИП клеток на 91% относительно контроля (рис. 37 Аав). Однако к 24 ч после ТГ доля интенсивно экспрессирующих клеток снижалась на 123% от 3-часового уровня и составляла 68% относительно контроля (рис.36 в), а к 3 суткам после ТГ интенсивно ИП клетки отсутствовали. В ответ на трехкратное ПК ТГ вызывала незначительное уменьшение доли интенсивно экспрессирующих клеток на 3-часовом сроке, но к 24 ч доля этого класса клеток превышала контроль (рис. 36 г; рис. 37 Ааг). К 3 суткам после ТГ также происходило снижение количества интенсивно ИП клеток (на 70% от контроля).

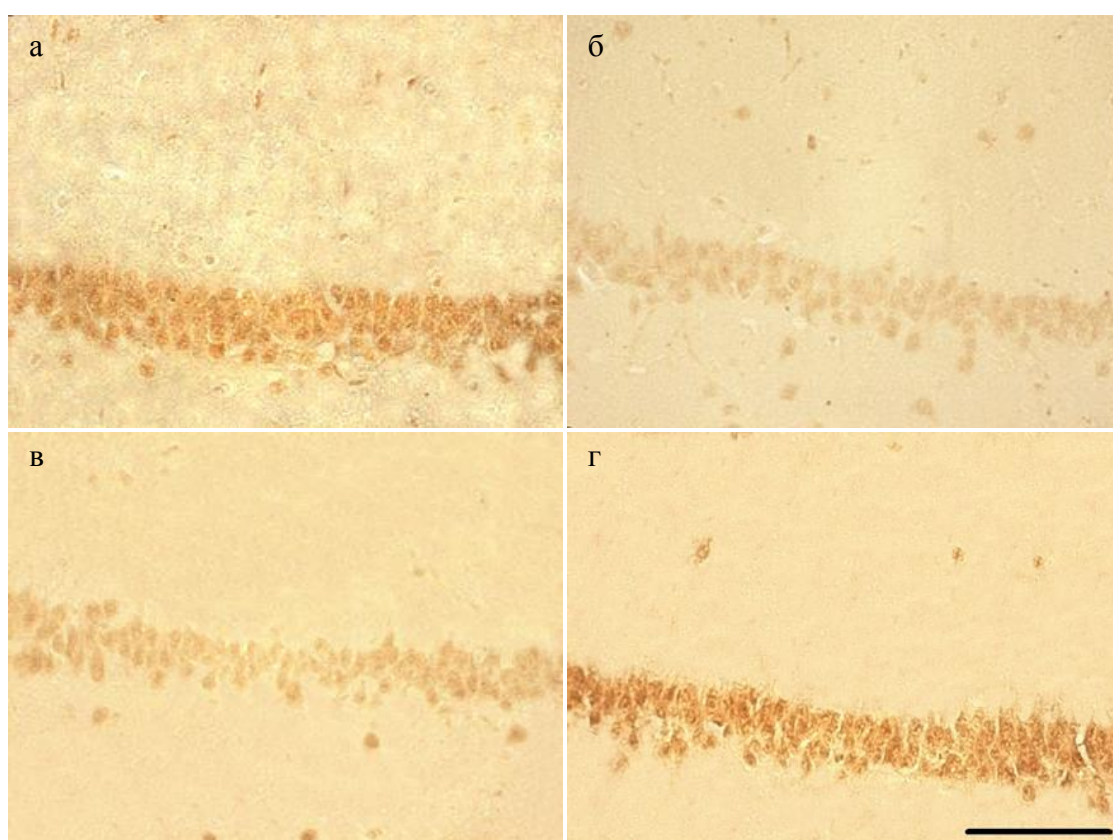


Рис. 36. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии МР в поле СА1 гиппокампа через 24 ч после ТГ у неПК(б), однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – контроль. Маркер 100 мкм.

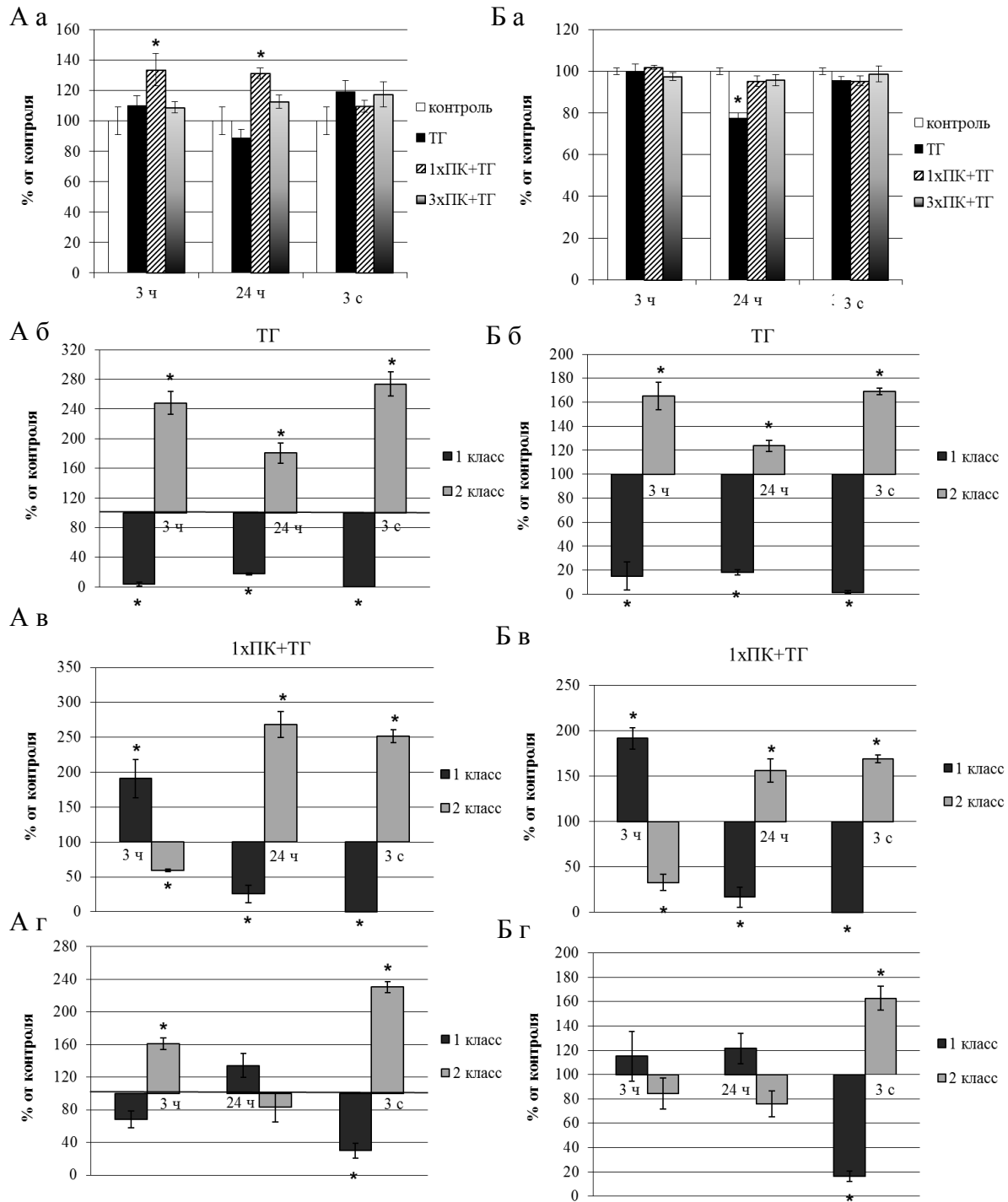


Рис. 37. Паттерн экспрессии МР в поле СА1 (А) и зубчатой извилине (Б) гиппокампа крыс через 3 ч-3 суток после ТГ у неПК-(б) и однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – общее количество МР-ИП клеток; б,в,г – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

Схожая картина паттернов экспрессии МР наблюдалась и в зубчатой извилине. Через 24 ч после ТГ у неПК животных снижалось общее число ИП к МР клеток на 20%, а также происходило выраженное уменьшение (на 80-100% относительно контроля) доли интенсивно ИП клеток на всех сроках после ТГ (рис. 37 Баб; рис. 38 б). В ответ на однократное ПК не наблюдалось изменения общего числа ИП клеток, но как и в поле СА1, происходило увеличение

(на 92% относительно контроля) к 3 ч, а затем снижение на 80-100% доли интенсивно экспрессирующих клеток к 24 ч и 3 суткам после ТГ (рис. 37 Бав; рис. 38 в). Трехкратное ПК-воздействие предотвращало подавление экспрессии МР на ранних сроках (3-24 ч) в зубчатой извилине, вызванное ТГ. При этом интенсивность экспрессии МР была близка к контрольному значению через 3-24 ч после ТГ (рис. 37 Бг; рис. 38 г). Однако к 3 суткам после ТГ происходило снижение количества интенсивно ИП клеток на 85% относительно контроля.

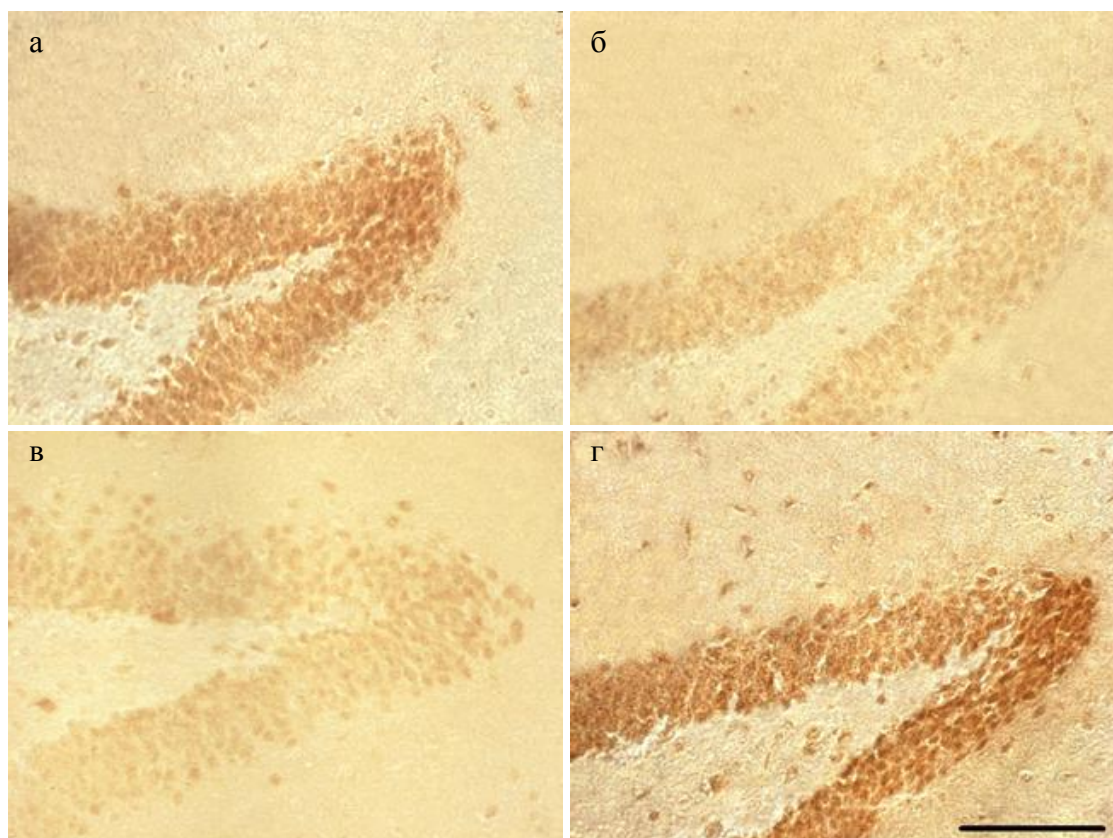


Рис. 38. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии МР в зубчатой извилине гиппокампа через 24 ч после ТГ у неПК(б), однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – контроль. Маркер 100 мкм.

Таким образом, ТГ приводила к подавлению экспрессии МР в неокортексе и гиппокампе крыс. Однократное ПК вызывало увеличение уровня экспрессии МР только через 3 ч, а к 24 ч после ТГ также наблюдалось снижение уровня экспрессии МР. В отличие от этого, трехкратное ПК-воздействие не вызывало снижения уровня экспрессии МР, а, напротив, способствовало ее увеличению в ранний период (3-24 ч) после ТГ. Следует отметить, что в отдаленный период после ТГ во всех используемых режимах наблюдалось снижение уровня экспрессии МР.

3.2.2.4. Особенности экспрессии минералокортикоидных рецепторов при действии одного или трех сеансов УГГ

Неокортекс

В серии экспериментов по влиянию УГГ, без действия последующей ТГ, было выявлено, что один сеанс УГГ не изменял общего количества ИП к МР клеток, но приводил к усилению интенсивности экспрессии на 300% и 400% относительно контроля во II и V слоях неокортекса, соответственно (рис. 39 Ааб, Баб; рис. 40 б). Значительно более выраженные изменения экспрессии МР наблюдались в ответ на трехкратную УГГ: происходило увеличение общего количества ИП клеток в 15,-2 раза, и возрастало количество интенсивно экспрессирующих клеток в 13 (F=469.823, $p=1.12E-07$) и 19 раз (F=776.344, $p=1.41E-07$) во II и V слоях неокортекса, соответственно (рис. 39 Аб, Бб; рис. 40 в).

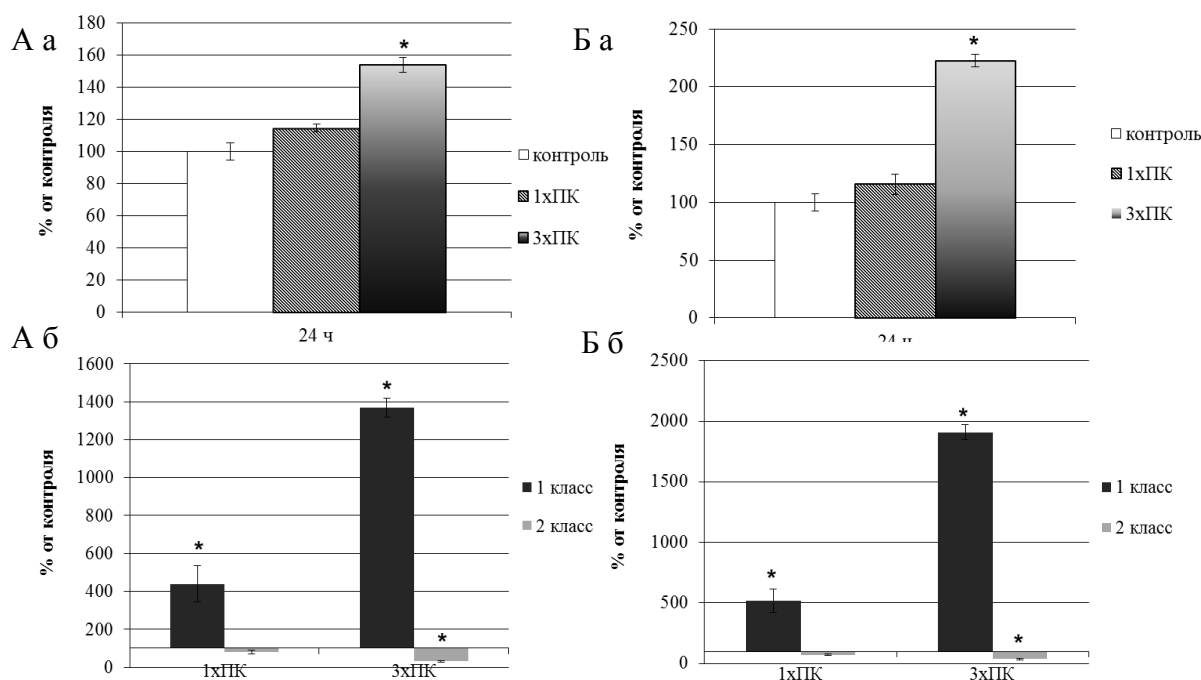


Рис. 39. Паттерн экспрессии МР во II (А) и V (Б) слоях неокортекса крыс через 24 ч после предъявления одного или трех сеансов УГГ. а – общее количество МР-ИП клеток; б – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

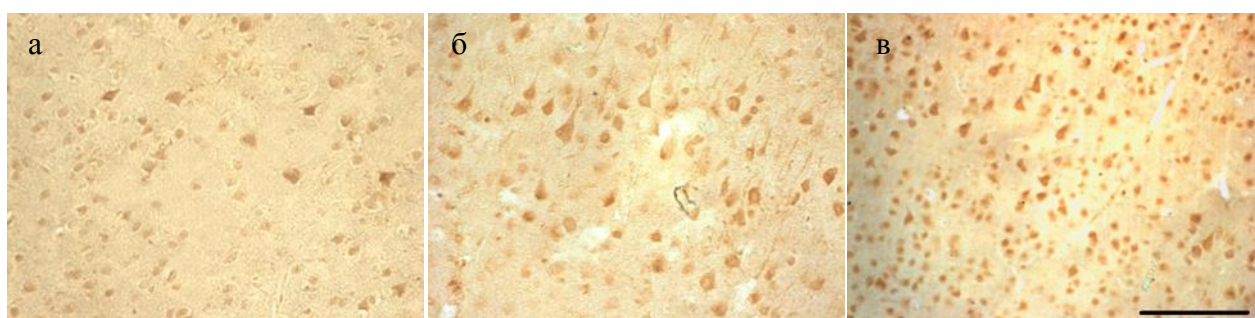


Рис. 40 Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии МР в V слое неокортекса крыс через 24 ч после последнего сеанса УГГ. а – контроль; б – однократная УГГ; в – трехкратная УГГ. Маркер 100 мкм.

Гиппокамп

В поле СА1 гиппокампа оба режима УГГ приводили к увеличению экспрессии МР. Один сеанс УГГ не изменял общего количества ИП к МР клеток и слабо увеличивал количество интенсивно экспрессирующих клеток (на 81% относительно контроля) к 24 ч (рис. 41 Аа; рис. 42 Аб).

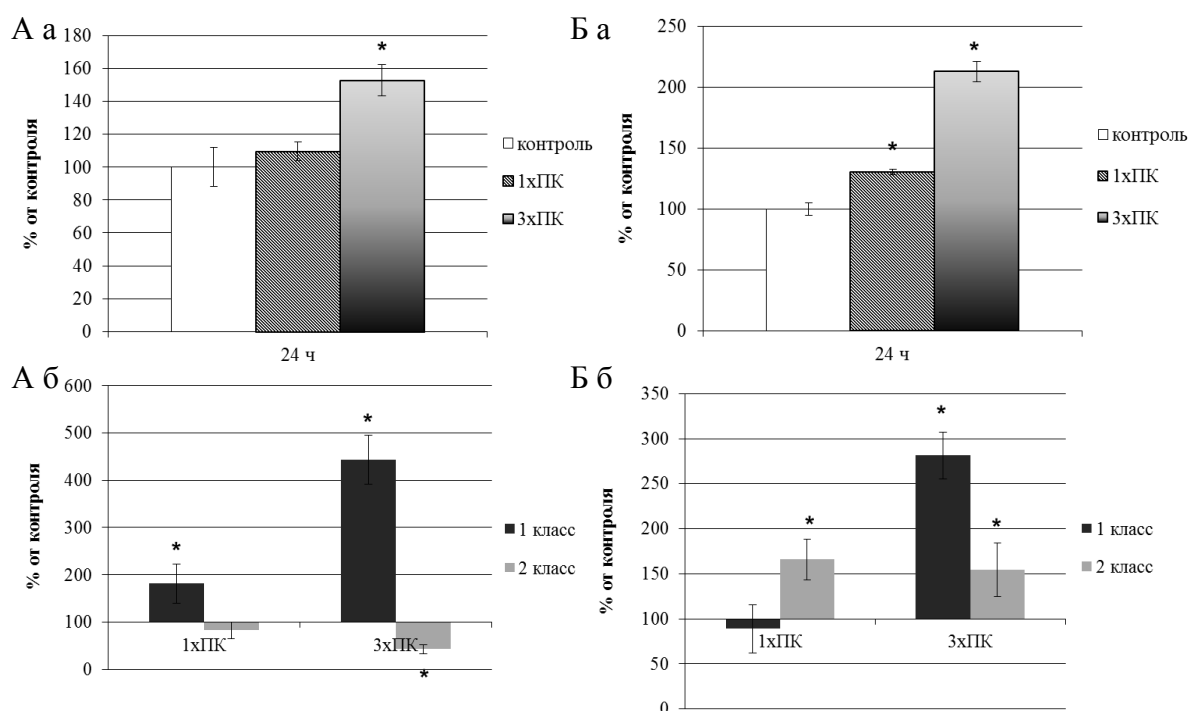


Рис. 41. Паттерн экспрессии МР в поле СА1 (А) и зубчатой извилине (Б) гиппокампа крыс через 24 ч после предъявления одного или трех сеансов УГГ. а – общее количество МР-ИП клеток; б – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

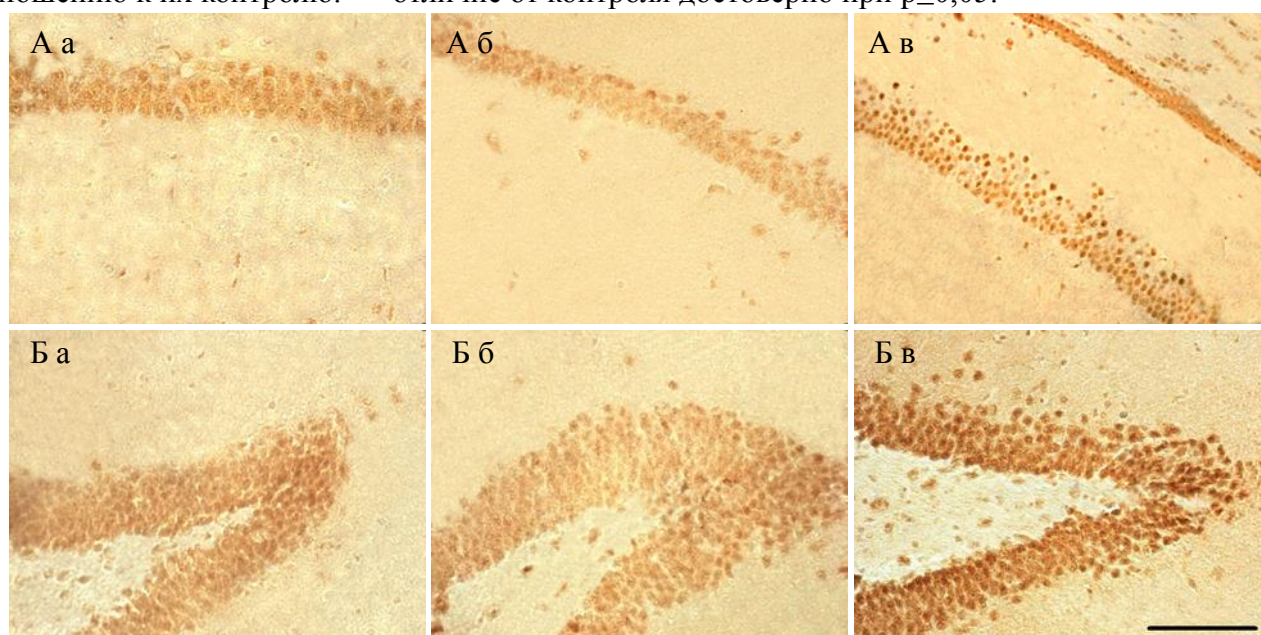


Рис. 42. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии МР в поле СА1(А) и зубчатой извилине(Б) гиппокампа через 24 ч после последнего сеанса УГГ. а – контроль; б – однократная УГГ; в – трехкратная УГГ. Маркер 100 мкм.

Существенно отличался от этого паттерн экспрессии МР в ответ на трехкратную УГГ. В данном случае увеличивалось общее количество ИП клеток на 53%, а количество интенсивно ИП клеток составляло 443% относительно контроля (рис. 41 Ааб; рис. 42 Ав). В зубчатой извилине гиппокампа наиболее выраженные изменения экспрессии МР также наблюдались в ответ на трехкратное воздействие. Через 24 ч после последнего сеанса трехкратной УГГ увеличивалось общее количество ИП клеток на 113% и количество интенсивно экспрессирующих - на 181% ($F=25.032$, $p=0.00156$) относительно контроля (рис. 41 Баб; рис. 42 Бв). Однократная УГГ приводила к увеличению общего числа ИП клеток на 30% и не изменяла интенсивности экспрессии МР.

Таким образом, однократная и трехкратная УГГ увеличивали в различной степени выраженности уровень экспрессии МР в неокортексе и гиппокампе. В ответ на однократную УГГ изменения уровня МР в клетках были существенно менее выражены по сравнению с действием трехкратной УГГ.

В проведенном исследовании установлено, что различные режимы гипобарической гипоксии (ТГ, однократный и трехкратный сеансы УГГ, ТГ в сочетании с ПК) вызывают специфические эффекты на экспрессию ГР и МР в неокортексе и гиппокампе крыс.

В ответ на ТГ к 24 ч после воздействия на фоне увеличения уровня экспрессии ГР в неокортексе и поле СА1 гиппокампа происходит сильное подавление экспрессии МР. Как указывалось выше, при действии экстремальных факторов важная роль в механизмах гибели/выживания нейронов принадлежит соотношению экспрессии ГР и МР (Almeida et al., 2000; Crochemore C 2005; Hassan et al., 1996; Rogalska, 2010). В частности, оверэкспрессия ГР приводит к гибели нейронов (Sapolsky, Pulsinelli, 1985). Наоборот, сдвиг соотношения ГР и МР в сторону увеличения экспрессии МР, наряду с ингибированием ГР, защищает нейроны от ишемического инсульта (Krugers et al., 2000). Активация МР предотвращает повреждающее действие, оказываемое чрезмерной экспрессией ГР на выживаемость нейронов (Almeida et al., 2000; Hassan et al., 1996). Вместе с тем, ТГ индуцирует развитие апоптоза в нейронах неокортекса и поля СА1 гиппокампа (Rybnikova et al., 2005; 2006), подавляя экспрессию МР и увеличивая экспрессию ГР, приводит к нарушению баланса ГР и МР в исследуемых областях. Как указано выше (см. п.3.1), однократное ПК не предотвращает структурные повреждения нейронов неокортекса и гиппокампа, вызываемых ТГ. У однократно ПК-животных, также как и у неПК-животных, ТГ приводит к увеличению экспрессии ГР на фоне подавления экспрессии МР в неокортексе и поле СА1 гиппокампа через 24 ч после воздействия. В зубчатой извилине гиппокампа также обнаружено снижение экспрессии МР после ТГ. Таким образом, однократное ПК оказывается неэффективным с точки зрения коррекции нарушенной действием ТГ

экспрессии ГР и МР в неокортексе и гиппокампе. В противоположность этому, в ответ на трехкратное ПК-воздействие, которое предотвращает индуцируемые ТГ структурные повреждения нейронов гиппокампа (см. п.3.1), не наблюдается дисбаланса экспрессии ГР и МР в поле СА1 после ТГ. После кратковременной глобальной ишемии также отмечается увеличение экспрессии МР в нейронах неокортекса и гиппокампа, и это коррелирует с выживаемостью нейронов (Macleod et al., 2003).

Через 24 ч после УГГ, без воздействия ТГ, выявлены разные паттерны экспрессии ГР и МР в зависимости от кратности воздействия и области гиппокампа. Ранее было показано, что трехкратная УГГ активирует в гиппокампе и неокортексе семейства транскрипционных факторов (CREB, NF- κ B, NGFI-A, c-Fos) (Rybnikova et al., 2005, 2008, 2009). В настоящей работе выявлено, что трехкратное, но не однократное, воздействие УГГ индуцирует выраженную экспрессию ТФ ГР и МР. К мишеням вышеперечисленных ТФ относятся гены, продуктами которых являются про-адаптивные белки (Самойлов, Рыбникова, 2012; Almeida et al., 2000; Hansson et al., 2000; Rybnikova et al., 2008). Очевидно, увеличение экспрессии кортикостероидных рецепторов, обнаруженное в ответ на трехкратное воздействие УГГ, способствует формированию толерантности нейронов мозга к последующей ТГ, что наглядно проявляется в наиболее чувствительных к действию ТГ областях – неокортексе и поле СА1 гиппокампа. В настоящем исследовании показано, что трехкратная УГГ выражено активирует МР в этих отделах мозга. Очевидно, МР опосредуют нейропротективный эффект, увеличивая уровень анти-апоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL, нейротрофических факторов и приводя к уменьшению экспрессии про-апоптотического белка p53 (Almeida et al., 2000; Hansson et al., 2000; McCullers, Herman, 1998). Известно, что в протекции, создаваемом ишемическим ПК, ведущая роль принадлежит ап-регуляции Bcl-2, Bcl-xL (Wu et al., 2003). Ранее было показано, что экспрессия Bcl-2 также повышена в ответ на ПК с помощью трехкратной УГГ (Rybnikova et al., 2006).

Вместе с тем, кортикостероидные рецепторы играют ключевую роль в регуляции гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (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., 1998, 2005; Rogalska, 2010; Rybnikova et al., 2007a). Их согласованная активность направлена на нормальное функционирование ГГАС (De Kloet et al., 2005, 2008; Pryce, 2008). МР гиппокампа индуцируют тоническое ингибирование активности ГГАС, а ГР в зубчатой извили вовлечены в механизмы глюкокортикоидной отрицательной обратной связи (De Kloet et al., 1998; Pryce, 2008; Rogalska, 2010). Ранее было установлено, что ТГ приводит к нарушению регуляции ГГАС, а также способствует развитию тревожно-депрессивных состояний (Рыбникова и др., 2006; Rybnikova et

al., 2007a). В настоящей работе установлено, что ТГ снижает уровень ГР и МР в зубчатой извилине. Ингибирование ГР в нейронах мозга вызывает нарушение регуляции ГГАС (Tronche et al., 1999). Блокирование МР приводит к ухудшению процессов обучения и некоторым нарушениям поведенческих реакций на новую обстановку (Berger et al., 2006). Принимая во внимание все вышеуказанное, можно предположить, что выявленные нарушения экспрессии кортикостероидных рецепторов, очевидно, способствуют нарушению регуляции активности ГГАС в ответ на ТГ (Самойлов, Рыбникова, 2012). Напротив, у трехкратно ПК-животных уровень экспрессии ГР в зубчатой извилине повышается после ТГ, что, очевидно, обуславливает активацию глюкокортикоидной отрицательной обратной связи. Вместе с тем, у трехкратно ПК-животных, в отличие от неПК-животных, не наблюдается подавления экспрессии МР после ТГ, а в то же время у однократно ПК-животных отмечается снижение интенсивности экспрессии МР через 24 ч после ТГ.

Ранее было установлено, что именно трех-, но не однократная, УГГ умеренно активизирует ГГАС и ее стресс-реактивность (Самойлов, Рыбникова, 2012). В настоящей работе обнаружено, что трехкратная, но не однократная, УГГ увеличивает уровень экспрессии ГР и МР в зубчатой извилине гиппокампа. В неокортексе наблюдается усиление экспрессии ГР и МР в ответ на однократную и трехкратную УГГ, однако наиболее выраженные изменения вызывает трехкратная УГГ. Очевидно, выявленные изменения экспрессии кортикостероидных рецепторов в ответ на трехкратные воздействия УГГ играют важную роль в ГГАС-зависимых механизмах адаптации к различным повреждающим воздействиям, включая ТГ.

ГР неокортекса также участвуют в регуляции ГГАС (Furay et al., 2008; Boyle et al., 2005). Показано, что при специфическом блокировании ГР нейронов фронтальной коры у животных выявляются нарушения регуляции отрицательной обратной связи ГГАС и повышается уровень тревожности (Boyle et al., 2005). В нашей работе установлено, что ТГ не вызывает подавления ГР в неокортексе неПК-животных, но вместе с тем, выраженное увеличение экспрессии ГР наблюдается только у трехкратно ПК-животных. Наряду с этим ТГ у неПК-животных вызывает подавление экспрессии МР в неокортексе. Трехкратное, но не однократное, ПК предотвращает это снижение после ТГ. Очевидно, выявленные ранее индуцируемые ТГ расстройства поведения, обучения, памяти могут быть связаны и с нарушениями регуляции экспрессии ГР и МР в неокортексе. А протективный эффект трехкратного ПК на поведенческом уровне, возможно, в какой-то степени обусловлен и модификацией активности этих рецепторов в неокортексе.

Таким образом, ТГ вызывает существенные нарушения экспрессии обоих типов кортикостероидных рецепторов, которые вовлекаются в механизмы гибели/выживания нейронов и регуляции ГГАС. Вместе с тем, трехкратные ПК-воздействия предотвращают эти

повреждения после ТГ. Следует отметить, что само трехкратное, но не однократное, воздействие УГГ индуцирует процесс экспрессии кортикостероидных рецепторов как в дорзальном, так и в вентральном гиппокампе, что, очевидно, способствует репрограммированию ТГ-обусловленных внутриклеточных процессов, ответственных за гибель нейронов и нарушение регуляции ГГАС.

3.2.3. Про-адаптивные белки *Bcl-2* и *BDNF*

Как указывалось выше, мишенями исследуемых в работе ТФ являются про-адаптивные белки, ответственные за механизмы выживания нейронов, нейрональную пластичность, в частности, нейротрофины (*BDNF*) и антиапоптотические факторы (*Bcl-2*). Учитывая это, нами проведено исследование влияния различных режимов гипобарической гипоксии на изменения их экспрессии в неокортексе и гиппокампе.

3.2.3.1. Влияние ТГ на уровень экспрессии *BDNF* в нейронах неокортекса и гиппокампа неПК-, одно- или трехкратно ПК-крыс

Неокортекс

В неокортексе контрольной группы животных наблюдался достаточно слабый уровень иммунореактивности к *BDNF*, интенсивно ИП клеток было мало (рис. 43 а).

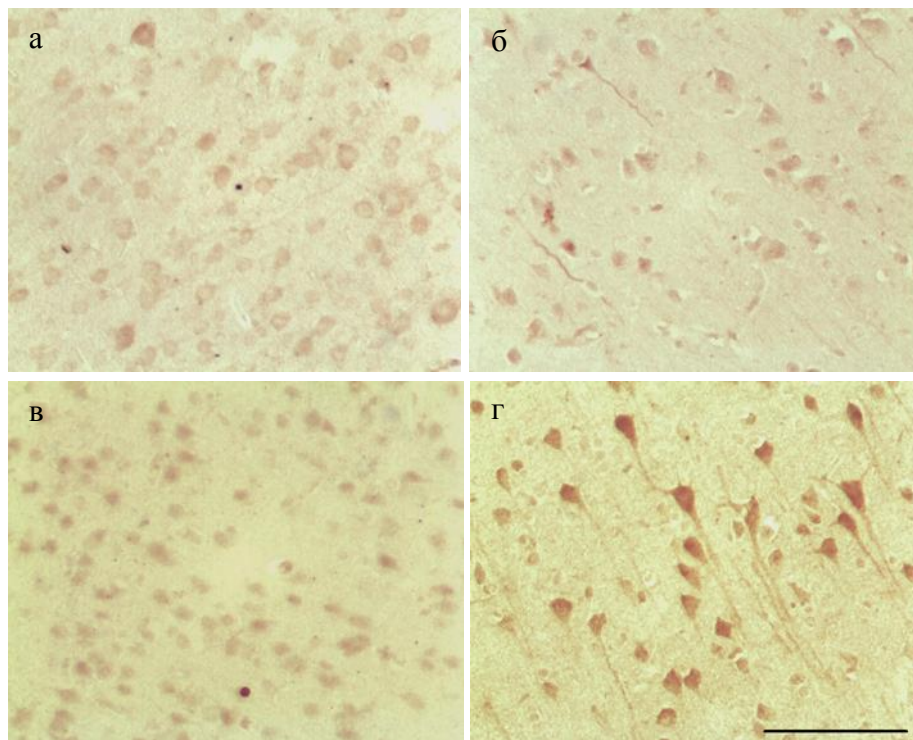


Рис. 43. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии *BDNF* в V слое неокортекса через 24 ч после ТГ у неПК- (б), однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – контроль. Маркер 100 мкм.

Во II слое неокортекса ТГ приводила к подавлению экспрессии *BDNF* через 24 ч после воздействия, что проявлялось в снижении общего количества ИП клеток на 25% относительно контроля и в отсутствии интенсивно ИП клеток (рис. 44 Ааб). В V слое уровень экспрессии не

изменялся на сроках 3-24 ч после ТГ (рис. 43 б; рис. 44 БаБ). Через 3 суток после ТГ уровень экспрессии BDNF не отличался от контроля во II слое, а в V слое наблюдалось незначительное увеличение интенсивности экспрессии, которое было недостоверным.

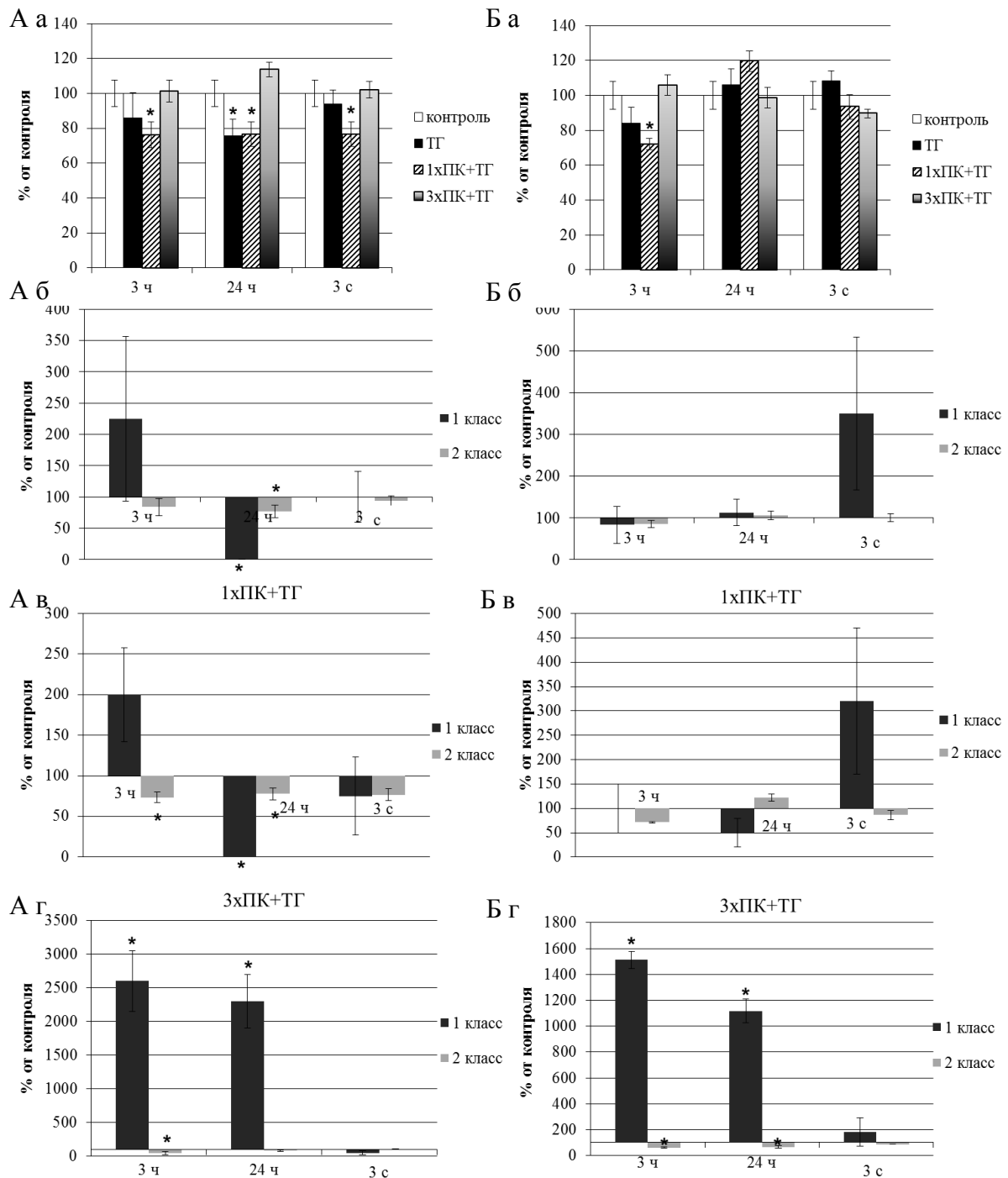


Рис.44. Паттерн экспрессии BDNF во II (А) и V (Б) слоях неокортекса крыс через 3 ч-3 суток после ТГ у неПК-(б) и однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – общее количество BDNF -ИП клеток; б,в,г – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

У однократно ПК-животных ТГ приводила к снижению общего количества ИП клеток на 24% на всех сроках (3 ч-3 суток) после ТГ во II слое и на 28% через 3 ч после ТГ в V слое неокортекса (рис. 41 Аа, Ба). Во II слое отмечалось небольшое увеличение интенсивности

экспрессии через 3 ч после ТГ, а затем ее резкое подавление на 100% к 24 ч (рис. 41 Ав). К 3 суткам после ТГ во II слое неокортекса уровень интенсивности возвращался к контрольному значению. В V слое неокортекса интенсивность экспрессии не изменялась на раннем сроке (3-24 ч) после ТГ, но к 3 суткам после ТГ отмечалась тенденция к ее увеличению (рис.40 в; рис. 41 Бв). В ответ на трехкратное ПК не изменялось общее количество ИП клеток, но происходило сильное увеличение интенсивности экспрессии BDNF на ранних сроках в обоих слоях неокортекса (3-24 ч) после ТГ. Количество интенсивно ИП клеток увеличивалось в 26 ($F=30.242$, $p=0.0053$) и 15 раз ($F=311.439$, $p=2.13E-06$) по сравнению с контролем через 3 ч после ТГ, а к 24 ч немного снижалось по сравнению с 3 ч и составляло 2300% и 1116% относительно контроля во II и V слоях неокортекса, соответственно (рис.40 г; рис. 41 Аг, Бг). К 3 суткам после ТГ уровень экспрессии BDNF возвращался к контрольному значению.

Гиппокамп

В контрольной группе животных отмечался слабый уровень иммунореактивности к BDNF в исследуемых отделах гиппокампа (CA1, CA3/CA4, зубчатой извилине) (рис. 45 а). При этом окраска была преимущественно цитоплазматической. ТГ приводила к подавлению уровня экспрессии BDNF в полях CA3/CA4 через 3 ч после воздействия, что проявлялось в отсутствии интенсивно ИП клеток (рис. 45 б; рис. 46 б).

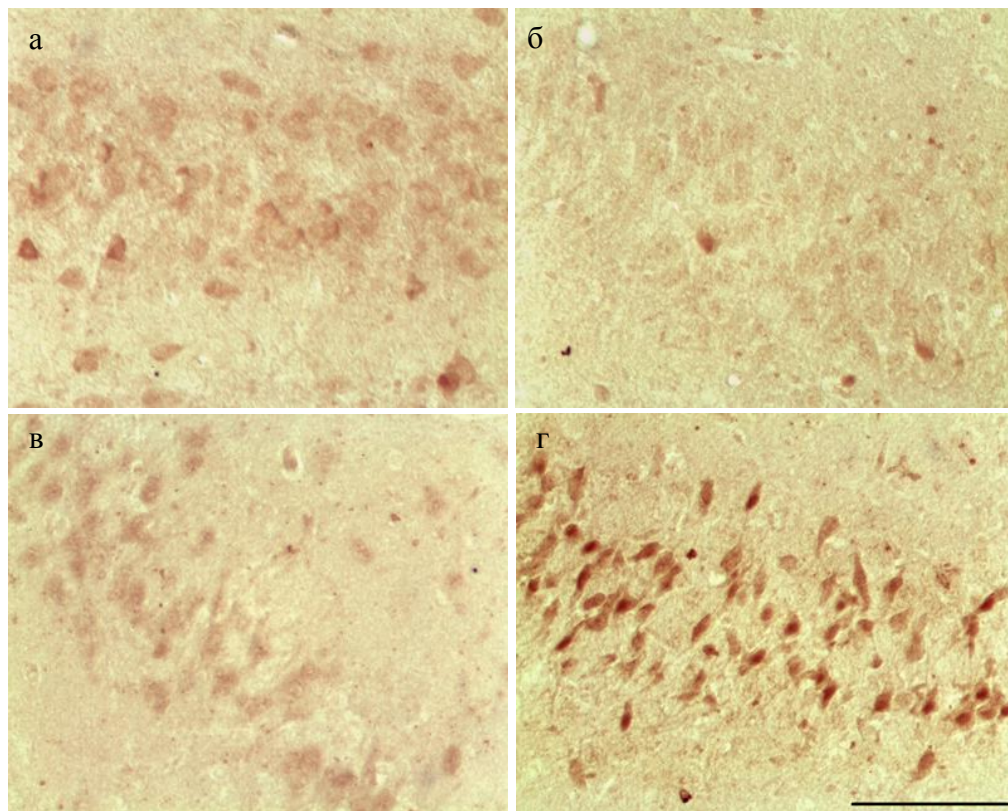


Рис. 45. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии BDNF в поле CA4 гиппокампа через 3 ч после ТГ у неПК- (б), однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – контроль. Маркер 100 мкм.

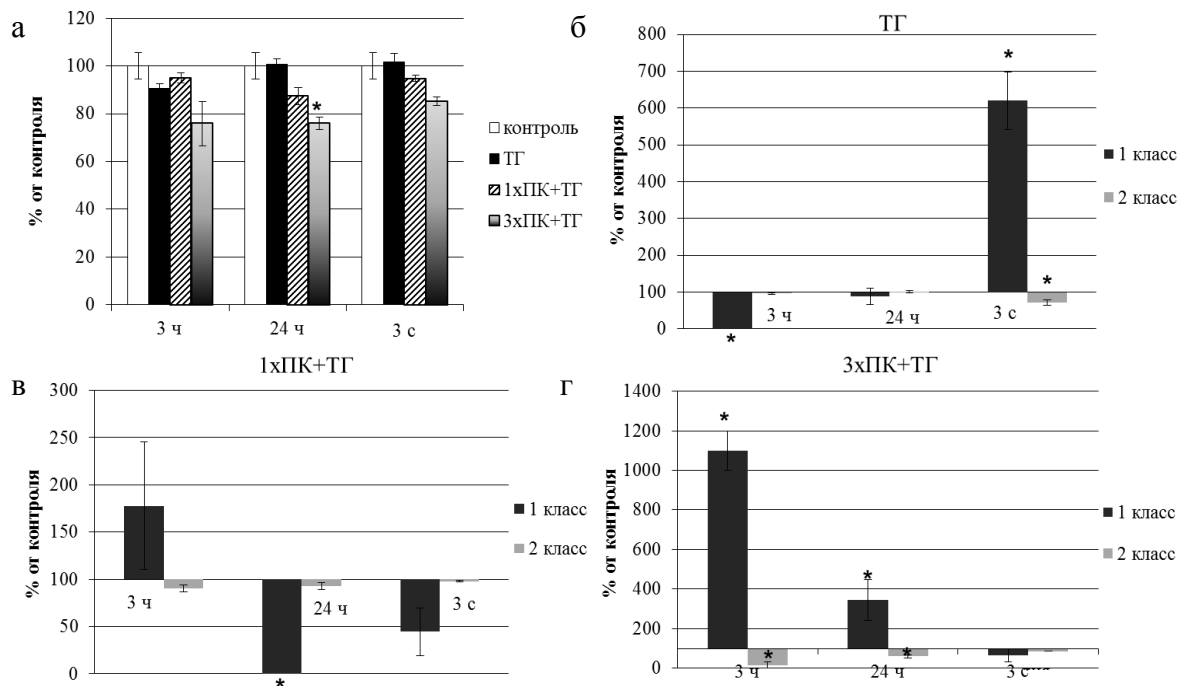


Рис. 46. Паттерн экспрессии BDNF в поле CA4 гиппокампа крыс через 3 ч-3 суток после ТГ у неПК- и однократно или трехкратно ПК-крыс. а – общее количество BDNF -ИП клеток; б,в,г – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

К 24 ч после ТГ уровень иммунореактивности к BDNF был равным контрольному значению, а к 3 суткам после воздействия наблюдалось шестикратное увеличение количества интенсивно ИП клеток относительно контроля. В поле CA1 и зубчатой извилине ТГ не оказывала эффекта на уровень экспрессии BDNF через 3 ч после воздействия. К 24 ч иммунореактивность к BDNF оставалась на прежнем уровне в CA1, а в зубчатой извилине несколько усиливалась. К 3 суткам после ТГ, аналогично полям CA3/CA4, наблюдалось увеличение уровня экспрессии BDNF как в CA1, так и в зубчатой извилине. У однократно ПК-животных ТГ не изменяла уровня экспрессии BDNF через 3 ч после воздействия в CA3/CA4 (рис. 45 в). Но к 24 ч и 3 суткам после ТГ наблюдалось сильное подавление интенсивности экспрессии BDNF (на 60-100%) относительно контроля (рис. 46 в). В CA1 и зубчатой извилине ТГ у однократно ПК животных не вызывала изменений уровня экспрессии BDNF на сроке 3 ч, но приводила к ее увеличению через 24 ч и 3 суток. У трехкратно ПК-животных в CA3/CA4 наблюдалось снижение общего количества ИП клеток на 25% относительно контроля через 24 ч после ТГ (рис. 46 а). Интенсивность экспрессии при этом увеличивалась в 11 раз по сравнению с контролем ($F=150.0$, $p=0.000255$) на раннем сроке (3 ч), а затем постепенно снижалась и к 3 суткам после ТГ не отличалась от контрольного значения (рис. 45 г; рис. 46 г). В CA1 и зубчатой извилине также происходило увеличение уровня экспрессии BDNF в ответ на трехкратное ПК, однако наиболее выраженные изменения наблюдались через 24 ч после ТГ, когда появлялись

интенсивно ИП клетки, которые отсутствовали на других сроках после ТГ.

Таким образом, ТГ на ранних сроках после воздействия либо не изменяла уровня экспрессии BDNF либо приводила к его снижению, а в отсроченный период (3 суток) способствовала увеличению интенсивности экспрессии исследуемого фактора в гиппокампе. По всей видимости, такая поздняя активация этого про-адаптивного белка (BDNF) носит отсроченный компенсаторный характер и обусловлена тем, что в ранний период она была подавлена. Однократное ПК приводило преимущественно к подавлению уровня экспрессии BDNF в ранний период (3-24 ч) после ТГ в неокортексе и гиппокампе. В отличие от этого, трехкратное ПК вызывало раннюю активацию экспрессии BDNF в неокортексе и гиппокампе, а в отдаленный период (3 суток) после ТГ уровень иммунореактивности к BDNF возвращался к контрольному значению.

3.2.3.2. Особенности экспрессии BDNF при действии одного или трех сеансов УГТ

Неокортекс

Один сеанс УГТ приводил к снижению общего числа ИП к BDNF клеток в 2 раза в обоих слоях неокортекса, интенсивность экспрессии при этом не изменялась (рис. 47 Ааб, Баб; рис. 48 б).

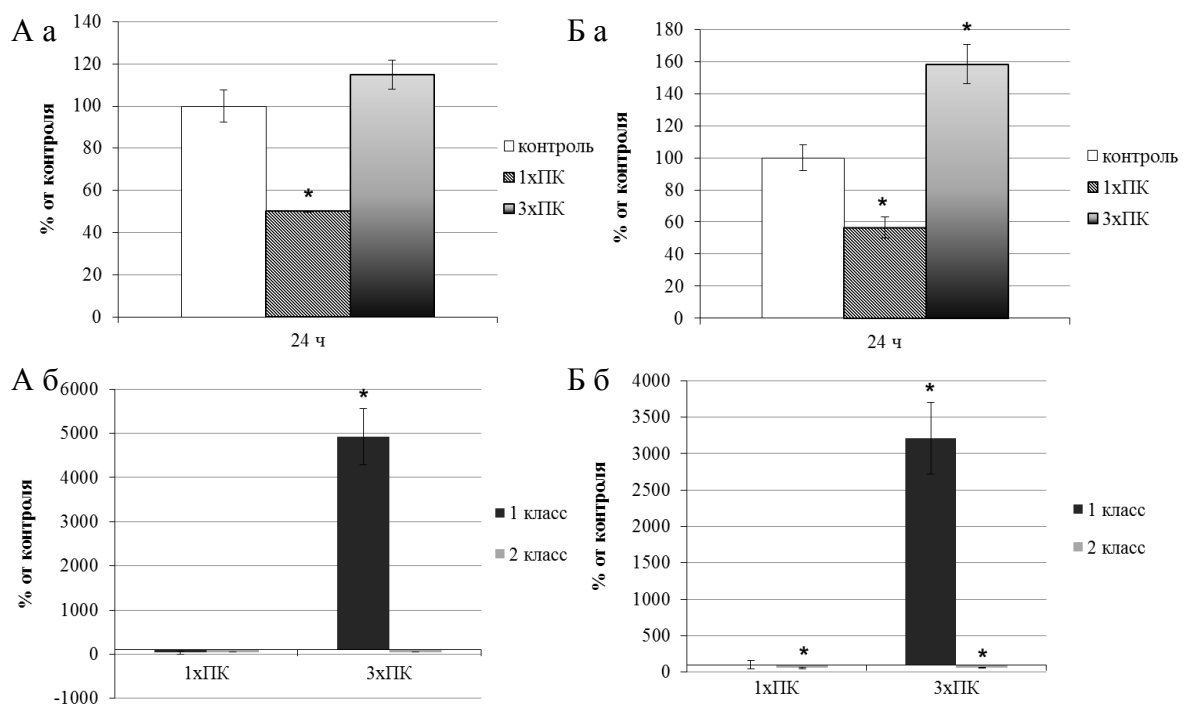


Рис. 47. Паттерн экспрессии BDNF во II (А) и V (Б) слоях неокортекса крыс через 24 ч после предъявления одного или трех сеансов УГТ. а – общее количество BDNF-ИП клеток; б – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

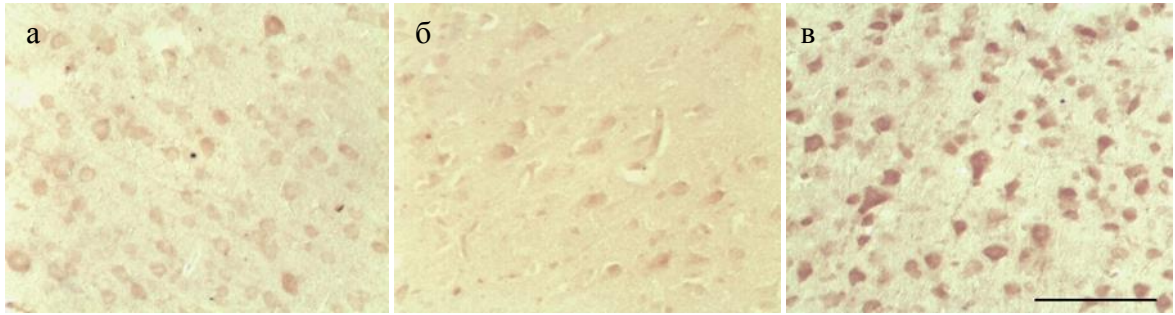


Рис. 48. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии BDNF в V слое неокортекса через 24 ч после последнего сеанса УГГ. а – контроль; б – однократная УГГ; в – трехкратная УГГ. Маркер 100 мкм.

Трехкратная УГГ вызывала увеличение общего количества ИП нейронов на 58% только в V слое неокортекса, но вместе с тем усиливала интенсивность экспрессии BDNF в 50 раз ($F=40.333$, $p=0.0014$) и 32 раза ($F=39.584$, $p=0.00075$) по сравнению с контролем во II и V слоях неокортекса, соответственно (рис. 47 Ааб, Баб; рис. 48 в).

Гиппокамп

В полях CA3/CA4 не наблюдалось изменений общего числа ИП к BDNF клеток в ответ на оба режима УГГ. Паттерн интенсивности экспрессии BDNF в CA3/CA4 был схож с паттерном в V слое неокортекса. Как и в неокортексе, не было выявлено изменений интенсивности экспрессии BDNF в ответ на однократную УГГ и наблюдалось увеличение количества интенсивно ИП клеток (на 640% относительно контроля; $F=171.633$, $p=4.62E-05$) в ответ на трехкратное воздействие (рис. 49 аб; рис. 50 бв). В поле CA1 и зубчатой извилине в ответ на однократную УГГ уровень иммунореактивности к BDNF снижался и был меньше контроля. В отличие от CA3/CA4 три сеанса УГГ не изменяли уровня экспрессии BDNF в CA1 и зубчатой извилине.

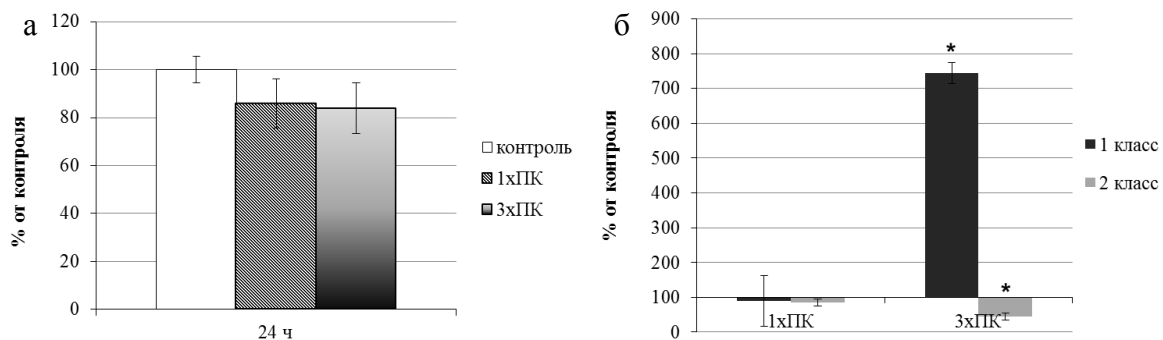


Рис. 49. Паттерн экспрессии BDNF в поле CA4 гиппокампа крыс через 24 ч после предъявления одного или трех сеансов УГГ. а – общее количество BDNF-ИП клеток; б – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

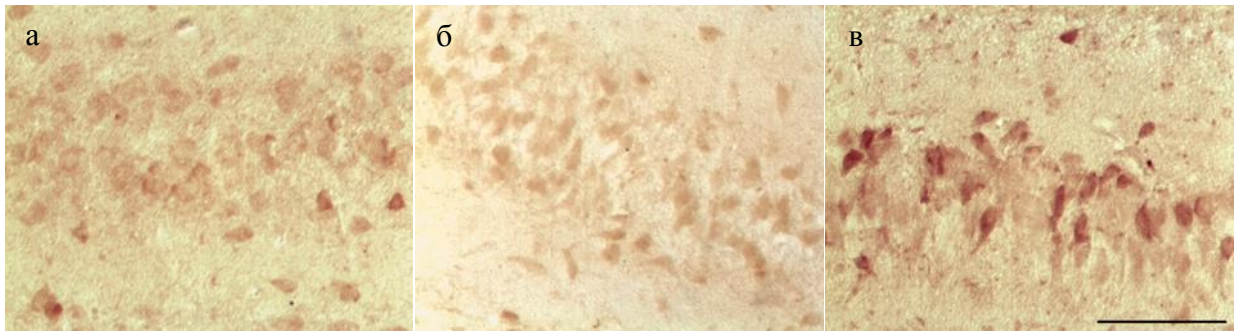


Рис. 50. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии BDNF в поел СА4 гиппокампа через 24 ч после последнего сеанса УГГ. а – контроль; б – однократная УГГ; в – трехкратная УГГ. Маркер 100 мкм.

В целом, однократная УГГ либо не оказывала эффекта на уровень экспрессии BDNF либо приводила к его снижению. В отличие от этого, трехкратные воздействия УГГ способствовали усилению иммунореактивности к BDNF в неокортексе и отделах вентрального гиппокампа (CA3/CA4). В СА1 и зубчатой извилине трехкратная УГГ не оказывала влияния на уровень экспрессии BDNF.

Таким образом, ТГ у неПК-крыс приводит к снижению иммунореактивности к BDNF либо не изменяет ее в неокортексе в ранний период (3-24 ч) после воздействия. Аналогичный эффект имеет ТГ у однократно ПК-животных. В противоположность этому, трехкратный сеанс ПК индуцирует раннюю экспрессию BDNF как в неокортексе, так и в гиппокампе. Таким образом, только многократные ПК-воздействия оказываются достаточно выраженными для индукции экспрессии BDNF в условиях ТГ в нейронах неокортекса и гиппокампа. Результаты исследования согласуются с данными, выполненными в модели ишемии, где в инфарктной области уровень экспрессии мРНК BDNF снижен, а в пери-инфарктной области, напротив, повышен (Kokaia et al., 1995). При этом авторы полагают, что усиление экспрессии мРНК BDNF выполняет нейропротективную роль (Kokaia et al., 1995). Ряд других работ также свидетельствует о нейропротективной роли исследуемого фактора (Mattson, 2008; Han, Holtzman, 2000; Jiang et al., 2005; Marini et al., 1998, 2007).

К 3 суткам после ТГ у неПК и однократно ПК-животных наблюдается увеличение уровня экспрессии BDNF в некоторых отделах гиппокампа. Как известно, запуск программы апоптоза происходит в первые часы после действия гипоксии/ишемии (Fujimura et al., 2000). Как указывалось выше (см. п.3.1), к 3 дню после ТГ в нейронах гиппокампа неПК- и однократно ПК-животных выявляются апоптотические нейроны, и к 7 дню после ТГ происходит снижение их количества. Очевидно, наблюдаемое увеличение экспрессии BDNF в данный временной интервал может носить отсроченный компенсаторный характер в переживших ТГ нейронах гиппокампа. У однократно ПК-животных такой эффект наблюдается в зубчатой извилине. У

трехкратно ПК-животных уровень экспрессии BDNF возвращается к контрольному значению к 3 дню после ТГ. В работе Kokaia et al также указывается, что уровень мРНК BDNF возвращается к контрольному значению через 24 ч после ишемии (Kokaia et al., 1995). Как показано выше (см. п.3.1), трехкратные, но не однократные, ПК-воздействия, предотвращают гибель нейронов после действия ТГ. Паттерн экспрессии BDNF у трехкратно ПК-животных (ранняя активация и возвращение к контрольному значению), возможно, отражает своевременную реакцию клетки и адекватный ответ на повреждающее воздействие ТГ. Однократное ПК не вызывает ранней индукции BDNF. Таким образом, результаты настоящего исследования и данные литературы, свидетельствуют о том, что ранняя индукция экспрессии BDNF трехкратным ПК является важным условием в нейропротективных механизмах выживания нейронов при действии ТГ.

При исследовании влияния УГГ, без последующей ТГ, обнаружено, что один сеанс УГГ приводит к снижению уровня экспрессии BDNF в неокортексе и гиппокампе крыс. Согласно ранее полученным данным, УГГ не вызывает структурных повреждений нейронов данных областей. Поэтому снижение иммунореактивности к BDNF в данном случае вызвано не гибелью нейронов, а может быть обусловлено снижением активности ТФ, регулирующих уровень транскрипции гена *bdnf*, к которым относятся, прежде всего, pCREB и NF-κB (Shieh et al., 1998; Tao et al., 1998; Lipsky et al., 2001). Как указано выше, однократная УГГ также не вызывает усиления экспрессии данных ТФ (см. п.3.2.1). Напротив, трехкратная УГГ существенно ап-регулирует уровень BDNF в нейронах неокортекса и гиппокампа, что также совпадает с увеличением уровня экспрессии pCREB и NF-κB (см. п.3.2.1). BDNF реализует нейропротективное действие, связываясь с тирозин-киназными рецепторами B (TrkB) и активируя внутриклеточные сигнальные каскады, опосредуемые протеин киназой B и фосфолипазой C (Kaplan, Stephens, 1994), MAPK/ ERK (Sweatt, 2001; Ying et al. 2002), кальций кальмодулин-зависимой киназой IV. Активация внутриклеточных каскадов завершается индукцией экспрессии генов, в частности, Bcl-2 и антиоксидантов (Mattson et al., 1995; Koronen et al., 2004; Bonni et al., 1999). Кроме того, действуя через кальций кальмодулин-зависимые киназы II или IV и MAPK/ERK внутриклеточный каскад, BDNF стимулирует фосфорилирование и активацию CREB (Finkbeiner et al., 1997; Ying et al. 2002; Bonni et al., 1999), образуя, таким образом, положительную обратную связь. BDNF, после связывания с TrkB рецепторами, может положительно влиять на транскрипцию собственного гена *bdnf*, что приводит к увеличению экспрессии BDNF (Jiang et al., 2005).

Таким образом, опираясь на данные литературы о нейропротективной роли BDNF и на результаты проведенного исследования, можно заключить, что увеличение уровня экспрессии BDNF, очевидно, необходимо для формирования толерантности нейронов мозга к гипоксии и

предотвращения повреждений, вызванных предъявлением последующей ТГ. Вместе с тем, только трехкратные, а не однократные, воздействия УГГ способны индуцировать экспрессию BDNF.

3.2.3.3. Влияние ТГ на уровень экспрессии Vcl-2 в нейронах неокортекса и гиппокампа неПК-, одно или трехкратно ПК-крыс

Неокортекс

В неокортексе в контрольной группе животных отмечался низкий уровень иммунореактивности к Vcl-2, причем преобладали клетки, относящиеся к слабо-ИП нейронам (рис. 51 а).

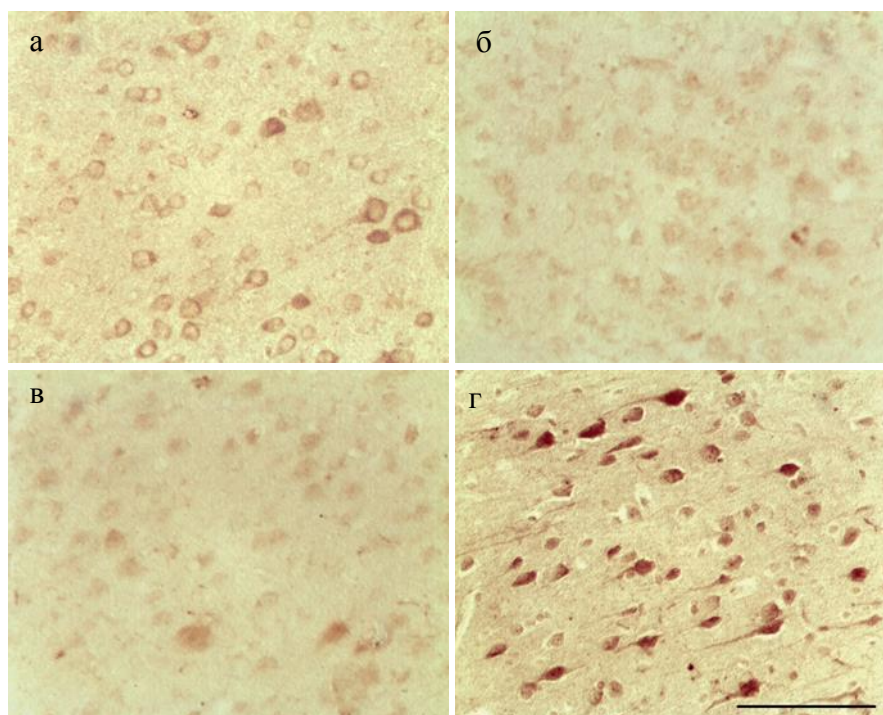


Рис. 51. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии Vcl-2 в V слое неокортекса через 3 ч после ТГ у неПК(а), однократно(б), однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – контроль. Маркер 100 мкм.

ТГ у неПК крыс приводила к подавлению экспрессии Vcl-2 в неокортексе на сроках 3-24 ч. В частности, во II слое неокортекса общее количество ИП клеток не изменялось, но отсутствовали интенсивно ИП клетки на данном сроке (рис. 52 Ааб). В V слое наблюдалось снижение как общего количества на 20-30%, так и количества интенсивно ИП клеток на 80-90% относительно контроля (рис. 51 б; рис. 52 Баб). Однако к 3 суткам после ТГ, напротив, отмечалось усиление интенсивности экспрессии до 900% и 600% относительно контроля во II и V слоях неокортекса, соответственно (рис. 52 Аб, Бб).

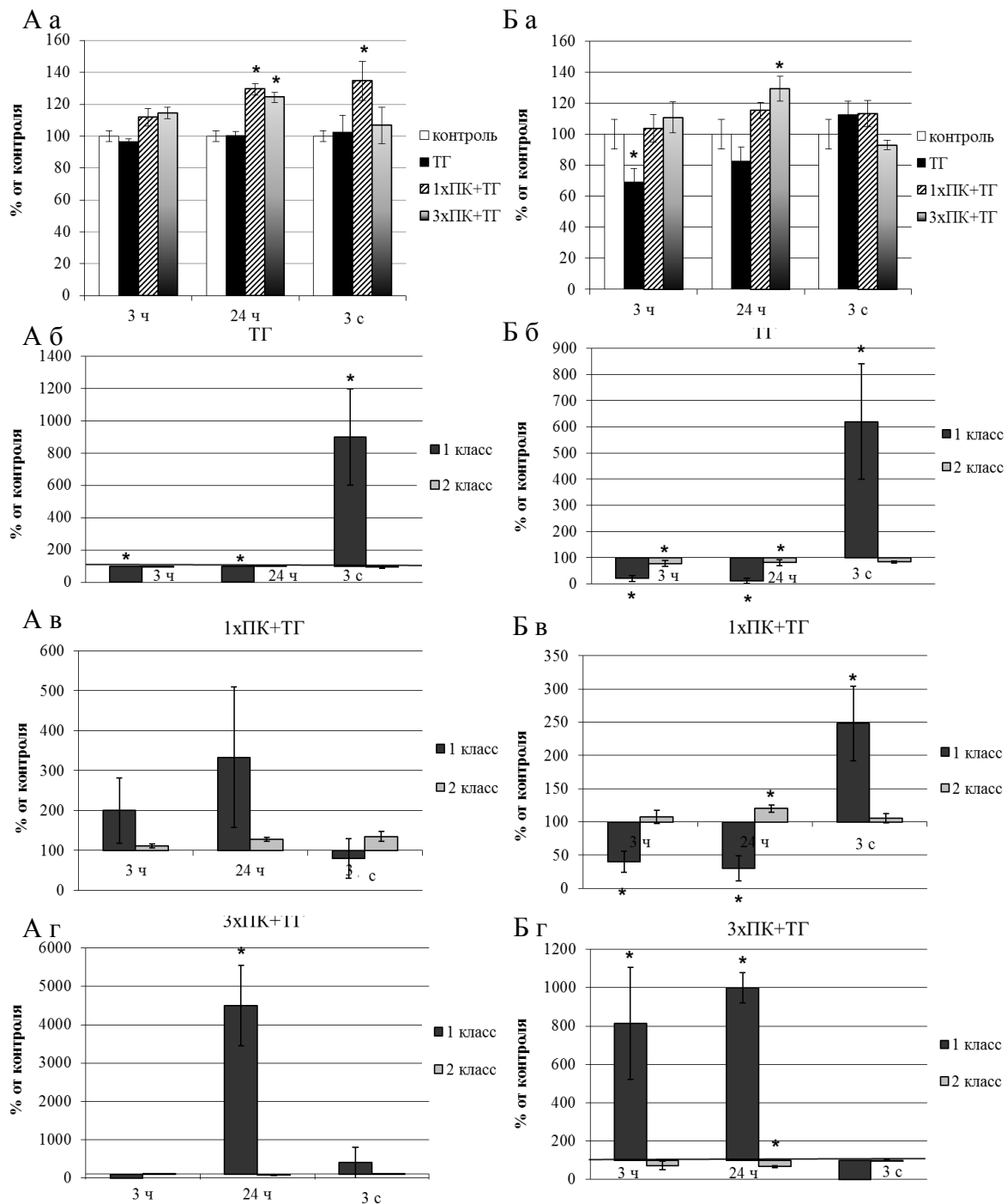


Рис. 52. Паттерн экспрессии Bcl-2 во II (А) и V (Б) слоях неокортекса крыс через 3 ч-3 суток после ТГ у неПК- (б) и однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – общее количество Bcl-2-ИП клеток; б,в,г – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

У однократно ПК-животных отмечалось незначительное увеличение общего числа ИП клеток (на 30%) только во II слое на сроках 24 ч и 3 суток после ТГ (рис. 52 Аа). Паттерны интенсивности экспрессии во II и V слоях были различными. Во II слое наблюдалось незначительное увеличение интенсивности экспрессии (на 100-200%), но не достоверное, на сроках 3-24 ч, а к 3 суткам после ТГ количество интенсивно ИП клеток достоверно не отличалось от контроля (рис. 52 Ав). В V слое, напротив, на сроках 3-24 ч наблюдалось падение

количества интенсивно ИП клеток на 60-70%, а к 3 суткам после ТГ – увеличение их количества до 250% относительно контроля (рис. 51 в; рис. 52 Бв). Следует отметить, что паттерн интенсивности экспрессии у однократно ПК-крыс в V слое был схож с таковым у неПК-животных. Трехкратное ПК-воздействие существенно усиливало экспрессию Bcl-2 в неокортексе через 3-24 ч после ТГ. К 3 ч после ТГ в V слое неокортекса отмечалось увеличение количества интенсивно ИП клеток на 700% относительно контроля (рис. 51 Бг; рис. 52 г). На сроке 24 ч после ТГ уровень экспрессии Bcl-2 был максимальным. При этом происходило увеличение как общего числа Bcl-2-ИП клеток на 20% и 30%, так и интенсивно-ИП нейронов на 4400% ($F=11.97$, $p=0.004$) и 900% ($F=72.973$, $p=0.001$) относительно контроля во II слое и V слое неокортекса, соответственно (рис. 52 Ааг, Баг). К 3 суткам после ТГ уровень экспрессии Bcl-2 возвращался к контрольному значению во II слое или снижался (на 100% - недостоверно) в V слое.

Гиппокамп

В нейронах отделов гиппокампа (CA1, CA3/CA4 и зубчатой извилине) в контрольной группе животных наблюдался низкий уровень иммунореактивности к Bcl-2 (рис. 53 а). Следует отметить, что уровень иммунореактивности к Bcl-2 в гиппокампе был гораздо ниже, чем в неокортексе. Окрашивалась в основном цитоплазма, в то время как ядра нейронов оставались не-иммунореактивными к Bcl-2.

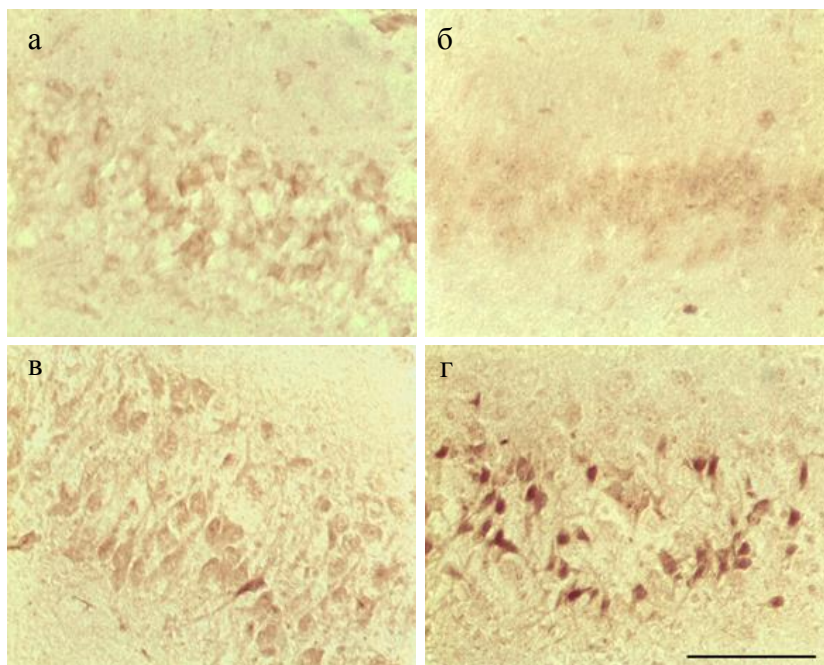


Рис. 53. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии Bcl-2 в поле CA4 гиппокампа через 3 ч после ТГ у неПК(б), однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – контроль. Маркер 100 мкм.

ТГ у неПК- и однократно ПК-животных не влияла на уровень экспрессии Bcl-2 в нейронах полей CA3/CA4 гиппокампа к 3-24 ч после воздействия (рис. 53. б,в; рис. 54 а,б,в).

Однако к 3 суткам после ТГ у неПК-крыс наблюдалось увеличение интенсивности экспрессии на 3500% ($F=76.563$, $p=0.00094$) относительно контроля (рис. 54 б). У однократно ПК-крыс интенсивность экспрессии не отличалась от контроля через 3 суток после ТГ (рис. 54 в). В поле СА1 у неПК-животных на ранних сроках (3-24 ч) после ТГ уровень иммунореактивности также, как и в полях СА3/СА4, не отличался от контроля, однако к 3 суткам после ТГ существенно повышался. В зубчатой извилине, которая является более устойчивой к гипоксии областью, увеличение иммунореактивности к Bcl-2 отмечалось уже на сроке 3 ч после ТГ и увеличивалось к 3 суткам после ТГ. У однократно ПК-животных в поле СА1 и зубчатой извилине паттерн экспрессии в ответ на ТГ был схожим с таковым у неПК-животных. Но при этом через 3 суток после ТГ уровень иммунореактивности к Bcl-2 был несколько ниже, чем у неПК-животных на том же сроке.

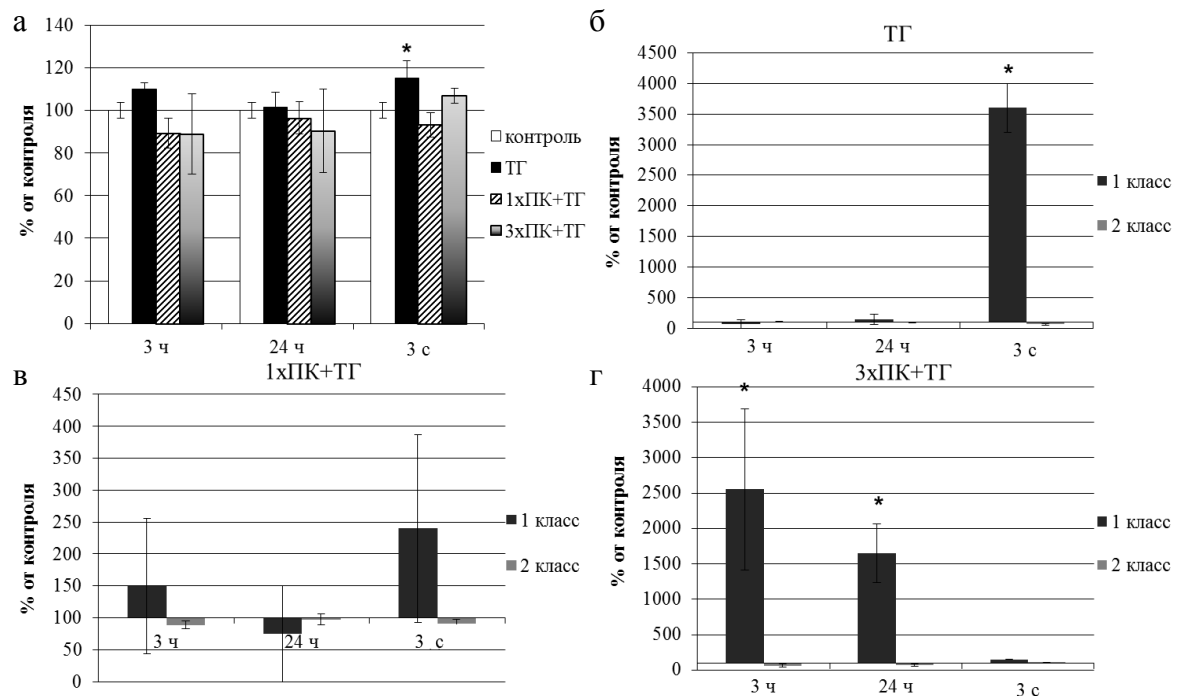


Рис. 54. Паттерн экспрессии Bcl-2 в поле СА4 гиппокампа крыс через 3 ч-3 суток после ТГ у неПК-(б) и однократно(в) или трехкратно(г) ПК-крыс. а – общее количество Bcl-2-ИП клеток; б,в,г – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

В отличие от этого, при предъявлении трехкратного ПК происходило существенное увеличение экспрессии Bcl-2 на ранних сроках (3-24 ч) после ТГ во всех отделах гиппокампа, в основном за счет увеличения доли интенсивно-ИП клеток. В полях СА3/СА4 интенсивность экспрессии составляла 2550% относительно контроля к 3 ч после ТГ (рис. 53 г; рис. 54 г). К 24 ч отмечалось незначительное снижение доли интенсивно-ИП клеток до 1650% относительно контроля, а к 3 суткам после ТГ уровень экспрессии возвращался к контрольному значению. В поле СА1 через 3 ч после ТГ у трехкратно ПК-животных уровень иммунореактивности к Bcl-2

не отличался от контроля, но увеличивался к 24 ч. В зубчатой извилине гиппокампа отмечалось значительное увеличение уровня экспрессии Bcl-2 уже на сроке 3 ч, который сохранялся и к 24 ч. Следует отметить, что в зубчатой извилине эти изменения были более выраженными, чем в СА1. К 3 суткам после ТГ у трехкратно ПК-животных уровень экспрессии Bcl-2 в СА1 и зубчатой извилине не отличался от контрольного значения.

Таким образом, ТГ у неПК-крыс приводила к подавлению экспрессии Bcl-2 в ранний период (3-24 ч), однако индуцировала ее увеличение в поздний период (3 суток) после воздействия в неокортексе и гиппокампе. ТГ у однократно ПК-животных также приводила к индукции Bcl-2 только в поздний период (3 суток). В отличие от этого, трехкратное ПК увеличивало уровень Bcl-2 в ранний период (3-24 ч) и приводило к снижению экспрессии данного фактора в отдаленный период (3 суток) после ТГ как в неокортексе, так и в гиппокампе крыс.

3.2.3.4. Особенности экспрессии Bcl-2 при действии одного или трех сеансов УГГ

Неокортекс

Один сеанс УГГ приводил к увеличению общего количества Bcl-2-ИП клеток на 70% и 65%, но вместе с тем вызывал снижение интенсивности иммунореактивности на 100% и 70% относительно контроля во II и V слоях неокортекса, соответственно (рис.55 б; рис. 56 Ааб, Баб). В отличие от этого, три сеанса УГГ существенно увеличивали уровень Bcl-2 в обоих слоях неокортекса. При этом происходило возрастание как общего количества Bcl-2-ИП клеток на 330% и 250%, так и интенсивно-ИП клеток на 700% и 600% относительно контроля во II и V слоях неокортекса, соответственно (рис. 55 в; рис. 56 Ааб, Баб).

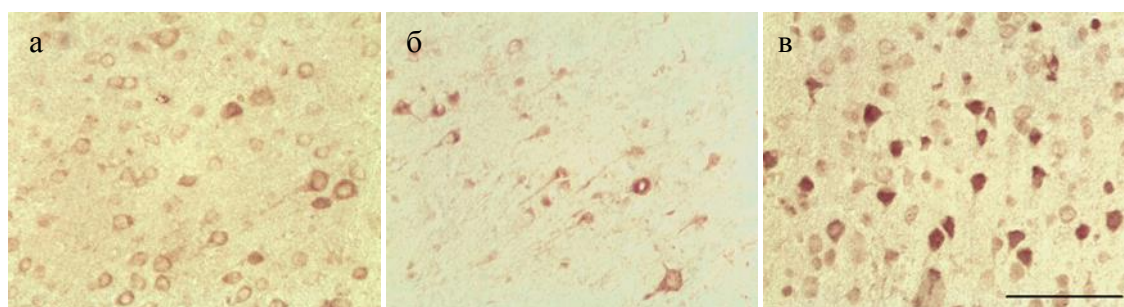


Рис. 55. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии Bcl-2 в V слое неокортекса через 24 ч после последнего сеанса УГГ. а – контроль; б – однократная УГГ; в – трехкратная УГГ. Маркер 100 мкм.

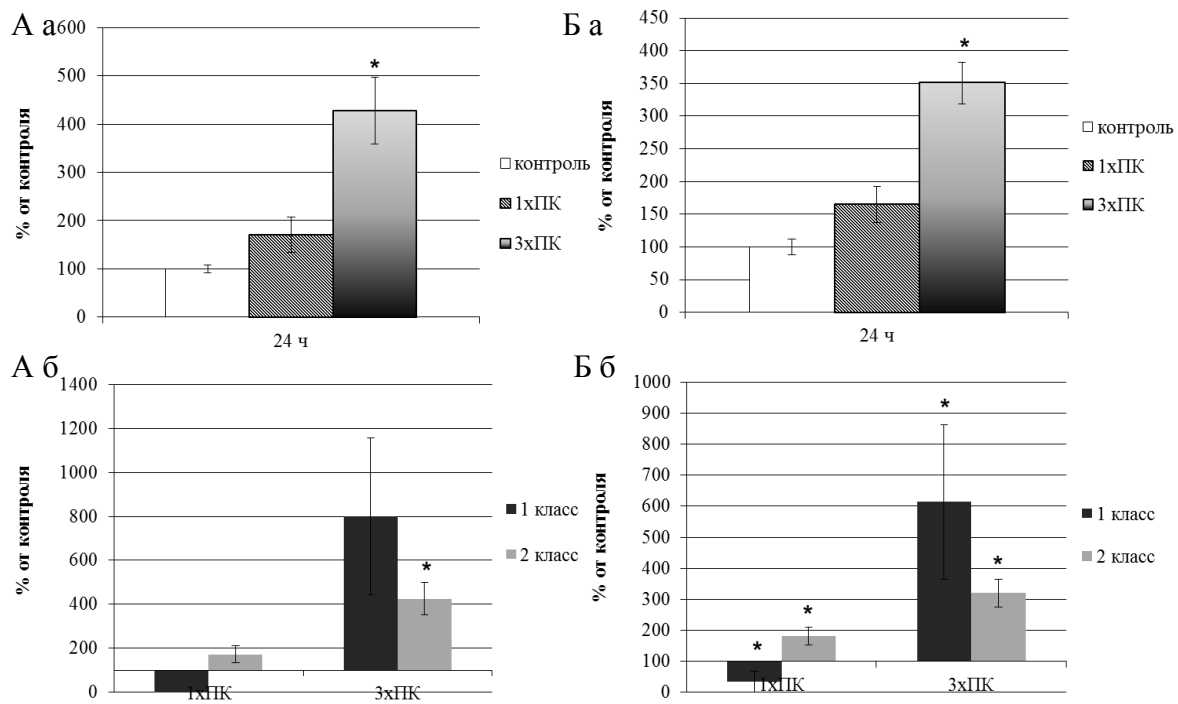


Рис. 56. Паттерн экспрессии Bcl-2 во II (А) и V (Б) слоях неокортекса крыс через 24 ч после предъявления одного или трех сеансов УГГ. а – общее количество Bcl-2-ИП клеток; б – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

Гиппокамп

В полях CA1, CA3/CA4 и зубчатой извилине гиппокампа в ответ на один сеанс УГГ уровень экспрессии Bcl-2 не изменялся (рис. 57 а,б; рис. 58 б). В ответ на трехкратную УГГ паттерн экспрессии Bcl-2 в полях CA3/CA4 гиппокампа был схож с паттерном экспрессии данного фактора в неокортексе. Общее количество Bcl-2-ИП клеток увеличивалось на 880% ($F=120.664$, $p=0.000109$), а доля интенсивно-ИП клеток – на 612% относительно контроля (рис. 57 а,б; рис. 58 в). В CA1 и зубчатой извилине гиппокампа также отмечалось увеличение уровня экспрессии Bcl-2 при применении трех сеансов УГГ.

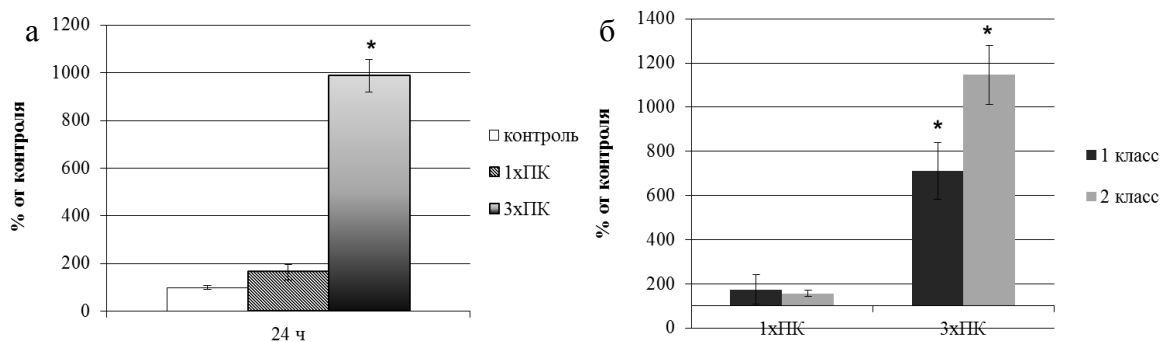


Рис. 57. Паттерн экспрессии Bcl-2 в поле CA4 гиппокампа крыс через 24 ч после предъявления одного или трех сеансов УГГ. а – общее количество Bcl-2-ИП клеток; б – изменение количества интенсивно ИП (1 класс) и слабо ИП (2 класс) клеток по отношению к их контролю. * - отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$.

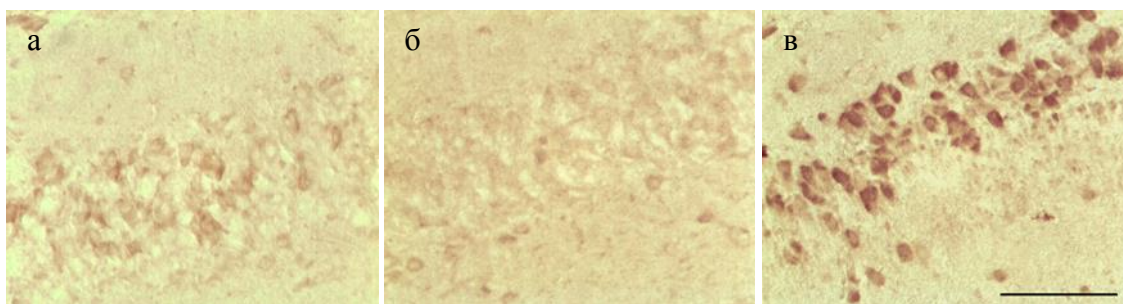


Рис. 58. Микрофотографии, иллюстрирующие характер экспрессии Bcl-2 в поле СА4 гиппокампа через 24 ч после последнего сеанса УГГ. а – контроль; б – однократная УГГ; в – трехкратная УГГ. Маркер 100 мкм.

Таким образом, один сеанс УГГ либо не изменял либо снижал уровень экспрессии Bcl-2 в неокортексе и гиппокампе крыс. В отличие от этого, трехкратное воздействие УГГ существенно увеличивало уровень экспрессии исследуемого белка.

В проведенном исследовании выявлено, что ТГ у неПК-крыс вызывает существенное подавление экспрессии Bcl-2 в нейронах неокортекса через 3-24 часа после воздействия. У однократно ПК-крыс ТГ оказывает схожее действие. В отличие от этого, трехкратное ПК не только устраняет эти изменения, но и выраженно усиливает нейрональную экспрессию Bcl-2. В гиппокампе (поля СА1, СА3/СА4), где в контроле наблюдаются единичные Bcl-2-экспрессирующие нейроны, ТГ как у неПК-, так и однократно ПК-крыс, не оказывает влияния на Bcl-2-иммунореактивность на ранних сроках (3-24 ч). В то же время через 3-24 ч после ТГ у трехкратно ПК-животных происходит активация экспрессии исследуемого фактора.

Ранее с использованием морфологических методов (окраски по Нисслю и детекции апоптоза *in situ*) было показано, что ТГ индуцирует апоптоз множества нейронов исследуемых областей мозга, а трехкратное ПК-воздействие в значительной мере предотвращает этот процесс (Rybnikova et al., 2005, 2006). Как показано в настоящей работе (см п.3.1), однократные, в отличие от трехкратных, сеансов ПК с использованием УГГ не оказывают протективного эффекта на вызываемые ТГ структурные повреждения по типу апоптоза нейронов неокортекса и гиппокампа. Сопоставление этих наблюдений с результатами исследования по экспрессии Bcl-2 и данными литературы, свидетельствующими о важной роли Bcl-2 в регуляции апоптоза (Gillies, Kuwana, 2014; Mayer, Oberbauer, 2003; Ouyang, Giffard, 2004; Gewies, 2003), позволяет сделать заключение о том, что, в отличие от однократных, трехкратные воздействия гипоксического ПК способны запускать нейропротективные антиапоптотические внутриклеточные процессы. Данные также согласуются с результатами, полученными в модели ишемии. В частности, нейроны, оверэкспрессирующие Bcl-2, менее подвержены действию ишемии (Kitagawa et al., 1998). 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).

Установлено, что первые 2-4 часа после ишемического инсульта являются критическими для нарушения проницаемости митохондриальной мембраны и высвобождения из этих органелл цитохрома C с последующим запуском апоптотического каскада (Fujimura et al., 2000; Gewies, 2003). Одной из основных функций белка Bcl-2 является предотвращение этого процесса. Согласно нашим данным уже через 3 ч после ТГ у многократно-, но не однократно, ПК-крыс отмечается высокий уровень содержания Bcl-2 в нейронах неокортекса и гиппокампа, что, очевидно, имеет важное значение для предотвращения запуска программы апоптоза и повреждения/гибели нейронов. Вместе с тем, у неПК- и однократно ПК-животных наблюдается увеличение уровня экспрессии Bcl-2 как в неокортексе, так и в гиппокампе к 3 суткам после ТГ. Очевидно, активация этого фактора через 3 суток после ТГ, возможно, уже оказывается слишком поздней и недостаточной для предотвращения развития апоптоза клетки (что можно видеть из морфологических исследований, см. п.3.1) либо носит отсроченный компенсаторный характер в нейронах, переживших ТГ. Напротив, у трехкратно ПК-животных отмечается возвращение уровня экспрессии Bcl-2 к контрольному значению в данный временной период. Следует отметить, что в зубчатой извилине, наиболее устойчивой к гипоксии области гиппокампа, у неПК-животных наблюдается усиление иммунореактивности к Bcl-2 уже на ранних сроках (3-24 ч) и происходит ее увеличение к 3 суткам после ТГ. Подобный эффект описан в модели ишемического воздействия, где экспрессия Bcl-2 также увеличивается к 4 ч и сохраняется до 3 дней после ишемии. Авторы связывают такой паттерн экспрессии Bcl-2 в устойчивой к гипоксии области с нейропротекцией (Chen et al., 1997).

Большой интерес представляют обнаруженные нами особенности влияния самого одно- и трехкратного воздействия УГГ на паттерн нейрональной Bcl-2-экспрессии в исследуемых областях мозга. Трехкратные сеансы УГГ, в отличие от однократного, индуцируют активацию экспрессии Bcl-2 в нейронах неокортекса и гиппокампа к 24 ч после воздействия. Умеренная ишемия также усиливает экспрессию Bcl-2, и авторы связывают это с нейропротективными механизмами, индуцируемыми ишемическим ПК (Wu et al., 2003). Таким образом, трехкратные воздействия УГГ приводят к повышению уровня содержания Bcl-2 в нейронах, и ТГ, протекающая на этом фоне, может способствовать формированию внутриклеточных защитных механизмов. Наряду с указанным выше механизмом протективного действия Bcl-2, этот белок вовлечен в контроль трансмиссии Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума в митохондрии и предотвращении избыточного патологического накопления в них Ca^{2+} , которое приводит к нарушению функций этих органелл (Ouyang, Giffard, 2013). Как известно, экспрессия гена *bcl-2* индуцируется рядом семейств ТФ, в частности, активационными pCREB, NF-κappaB, а также MР. Как указано выше, многократные сеансы УГГ индуцируют экспрессию данных ТФ в

неокортексе и гиппокампе (см. п. 3.2.1, 3.2.2.). Вероятно, обнаруженное усиление экспрессии Bcl-2 в ответ на трехкратные воздействия УГГ обусловлено активацией этих ТФ. В то же время однократное ПК не проявляет такое действие (см.п. 3.2.1, 3.2.2.).

Таким образом, полученные данные убедительно свидетельствуют о важной роли антиапоптотического белка Bcl-2 в механизмах нейропротективных эффектов ПК-воздействия, индуцируемого трехкратными, но не однократными, сеансами УГГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 транскрипционных факторов (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.

В проведенном исследовании оценены морфологические характеристики нейронов после непрекондиционированной и однократно или трехкратно прекондиционированной тяжелой гипоксии (ТГ). Выявлено, что однократное прекондиционирование (ПК) не предотвращает структурные повреждения нейронов неокортекса и гиппокампа, вызванные действием ТГ. Трехкратные ПК-воздействия предотвращают данные нарушения.

Характер молекулярных изменений выявлялся с помощью иммуоцитохимического метода, позволяющего количественно определять изменения экспрессии молекулярных факторов в определенных нейронах неокортекса и гиппокампа. С помощью иммуоцитохимического метода выявлено, что ТГ подавляет или не изменяет уровень экспрессии активационных ТФ pCREB и NF-карраВ (p65 и c-Rel) в неокортексе и гиппокампе в ранний период после ТГ (3-24 ч) (табл. 1). Однократное ПК не оказывает влияния на уровень экспрессии активационных ТФ, а трехкратное ПК, напротив, существенно увеличивает его после ТГ. Характер экспрессии субъединицы NF-карраВ p65 отличается в гиппокампе: ТГ в данном случае вызывает увеличение экспрессии p65, а не подавление. Как и в неокортексе, у однократно ПК-животных ТГ имеет схожий эффект, что и у неПК-животных, а трехкратное ПК оказывает более выраженное действие на уровень экспрессии p65 по сравнению с неПК- и однократно ПК-животными после ТГ. Таким образом, трехкратное ПК преимущественно оказывает значительно более выраженный эффект на индукцию экспрессии активационных ТФ по сравнению с однократным ПК после ТГ. Учитывая, что данным активационным ТФ отводится нейропротективная роль, очевидно, ранняя и выраженная индукция их экспрессии трехкратным ПК является одним из механизмов, предотвращающих повреждения нейронов, вызванных ТГ.

Наряду с этим, проанализированы паттерны экспрессии лиганд-зависимых ТФ кортикостероидных рецепторов после ТГ у неПК- и ПК-крыс. В различных областях мозга паттерны экспрессии ГР различаются, что, очевидно, обусловлено разным функциональным назначением исследуемых областей. В частности, глюкокортикоидные рецепторы (ГР) вентрального гиппокампа участвуют в регуляции отрицательной обратной связи гипоталамо-гипофизарно-адреналокортикальной системы (ГГАС). В настоящей работе показано, что ТГ у неПК-крыс приводит к подавлению ГР в зубчатой извилине, что, очевидно, способствует

нарушению регуляции ГГАС и адаптивных процессов. Действительно, ранее в нашей лаборатории было показано, что ТГ приводит к нарушениям отрицательной обратной связи ГГАС и ее гиперактивации без последующего торможения. В отличие от однократно ПК-животных, у трехкратно ПК-животных уровень ГР в зубчатой извилине увеличивается после ТГ.













































Фактор		ТГ		1ПК+ТГ		3ПК+ТГ	
		неокортекс	гиппокамп	неокортекс	гиппокамп	неокортекс	гиппокамп
Активационные ТФ	pCREB						
	NF-кappaB (p65)						
	NF-кappaB (c-Rel)						
Лиганд-зависимые ТФ	ГР		CA1  ЗИ 				CA1  ЗИ 
	МР						
Про-адаптивные	BDNF						
	Bcl-2						

Таблица 1. Сводная таблица, иллюстрирующая уровень экспрессии ТФ и белковых продуктов их генов-мишеней через 3-24 ч после ТГ у неПК-, однократно или трехкратно ПК-крыс. Стрелки отражают уровни интенсивности их экспрессии: маленькая стрелка – незначительное изменение; средняя стрелка – умеренное изменение; большая стрелка – значительное изменение.

Вместе с тем, уровень минералокортикоидных рецепторов (МР) в гиппокампе, которые осуществляют тоническое ингибирование ГГАС, у однократно ПК-животных снижен, тогда как у трехкратно ПК-животных он не отличается от контроля после ТГ. Эти данные свидетельствуют о преимуществе трехкратного ПК по сравнению с однократным ПК в реализации механизмов регуляции ГГАС при действии ТГ. Наряду с этим, увеличение экспрессии ГР в неокортексе у трехкратно ПК-животных после ТГ может способствовать предотвращению нарушений обучения

и памяти, вызванных ТГ.

Кортикостероидным рецепторам отводится важная роль в регуляции процессов гибели и выживания нейронов. В настоящей работе показано, что ТГ приводит к сильному подавлению экспрессии МР в наиболее чувствительных к гипоксии областях мозга – неокортексе и дорзальном гиппокампе. Поскольку данные литературы свидетельствуют о нейропротективной роли МР, то ингибирование их активности, очевидно, вносит весомый вклад в нейрональные повреждения, индуцируемые действием ТГ. Однократное ПК, в меньшей степени, но также снижает уровень экспрессии МР в гиппокампе после ТГ. В отличие от этого, трехкратное ПК предотвращает подавление экспрессии МР, что, возможно, способствует выживанию нейронов при действии ТГ. Трехкратное, но не однократное, ПК также предотвращает увеличение экспрессии ГР в СА1, индуцируемое ТГ.

Таким образом, активационные ТФ и лиганд-зависимые ТФ играют важную роль в активации нейропротективных механизмов, индуцируемых трехкратным ПК, при действии ТГ. Одним из звеньев в реализации нейропротективных механизмов является активация данными ТФ экспрессии про-адаптивных белков, в частности нейротрофического фактора BDNF и антиапоптотического фактора Bcl-2. Обнаружено, что ТГ у неПК-крыс в основном подавляет экспрессию BDNF и Bcl-2 в неокортексе и гиппокампе. У однократно ПК-крыс ТГ оказывает схожее действие. Паттерн экспрессии у трехкратно ПК-крыс существенно отличается от такового у неПК- и однократно ПК-крыс: трехкратное ПК индуцирует выраженное усиление экспрессии про-адаптивных белков после ТГ. Очевидно, активация данных факторов трехкратным ПК в значительной мере ответственна за выживание нейронов при действии ТГ. Причем увеличение содержания про-адаптивных белков на ранней стадии после действия ТГ совпадает с активацией ТФ, регулирующих активность их генов.

Несомненный интерес представляют полученные данные о повышении экспрессии ряда исследуемых молекулярных факторов в отсроченный период (3 суток) после воздействия ТГ. Интерпретация этого факта затруднительна. Можно предположить, что этот процесс носит отсроченный компенсаторный характер, направленный на выживание части нейронов мозга.

С целью понимания молекулярных механизмов различных эффектов однократного и трехкратного ПК при действии ТГ, было проведено исследование влияния различных сеансов умеренной гипобарической гипоксии (УГГ), используемой в качестве ПК-воздействия, без последующей ТГ, на экспрессию изучаемых ТФ и про-адаптивных белков. Сравнивая однократное и трехкратное применение 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 (табл. 2). В то же время, трехкратное применение УГГ индуцирует выраженную активацию экспрессии исследуемых

молекулярных факторов. Следовательно, последующее предъявление ТГ происходит на этом фоне. Учитывая важную роль активационных, лиганд-зависимых ТФ и про-адаптивных белков BDNF и Bcl-2 в механизмах нейропротекции, можно полагать, что для их эффективной кооперативной активации при формировании механизмов толерантности нейронов мозга необходимо использовать определенный режим ПК-воздействия, в частности, как показано в нашей работе, трехкратное воздействие УГГ.







































Фактор		1ПК		3ПК					
		неокортекс	гиппокамп	неокортекс	гиппокамп				
Активационные ТФ	pCREB								
	NF-kappaB (p65)								
	NF-kappaB (c-Rel)								
Лиганд-зависимые ТФ	ГР				<table><tr><td>CA1</td><td>ЗИ</td></tr><tr><td></td><td></td></tr></table>	CA1	ЗИ		
	CA1	ЗИ							
									
МР		<table><tr><td>CA1</td><td>ЗИ</td></tr><tr><td></td><td></td></tr></table>	CA1	ЗИ					
CA1	ЗИ								
									
Про-адаптивные	BDNF								
	Bcl-2								

Таблица 2. Сводная таблица, иллюстрирующая уровень экспрессии ТФ и белковых продуктов их генов-мишеней через 24 ч после одного или трех сеансов УГГ. Обозначения, как в табл.1.

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 однократно 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агарков Ф.Т. Материалы к изысканию возможных путей повышения тепловой устойчивости организма // В кн.: Материалы конференции по проблеме адаптации, тренировки и другим способам повышения устойчивости организма. Донецк. - 1960. - С.7-9.
2. Баранова К.А., Рыбникова Е.А., Миронова В.И., Самойлов М.О. Эффект гипоксического прекондиционирования на экспрессию транскрипционного фактора NGFI-A в мозге крыс после неизбежного стресса в модели «выученная беспомощность» // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - 2009. - Т.94, №4. - С.405-416.
3. Барбашова З.И., Гинецинский А.Г. Выносливость к отравлению цианидами акклиматизированных к высоте животных // Труды Физиологического института им. И.П.Павлова АН СССР. М. – Л, 1945. - Т.1. - С.103-114.
4. Васильев Г.А. Влияние акклиматизации к гипоксии на радиорезистентность собак. Материалы конференции по проблеме адаптации, тренировки и другим способам повышения устойчивости организма // Донецк. - 1960. - С.23-24.
5. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Влияние предварительного воздействия умеренной гипоксии на нарушения выработки и воспроизведения условной реакции пассивного избегания, вызываемые тяжелой гипобарической гипоксией у крыс // Журн. высш. нерв. деятельности. - 2004а. - Т.54, №6. - С.795-801.
6. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Влияние тяжелой гипоксии на эмоциональное поведение крыс: корректирующий эффект прекондиционирования // Докл. РАН. - 2004б. - Т.395. - С.109-111.
7. Гаркави Л. Х. Реакция активации — общая неспецифическая адаптационная реакция на раздражители «средней» силы. В кн.: «Адаптационные реакции и резистентность организма» // Ростов. - 1990. - С.36-63.
8. Гаркави Л. Х., Квакина Е. Б. О критериях оценки неспецифической резистентности организма при действии различных биологически активных факторов с позиции теории адаптационных реакций // «М. М.- волны в биологии и медицине». - 1995. - № 6. - С.11-21.
9. Гублер Е.В., Фенстер Г.С. Тренировка (адаптация) к гипоксии как профилактическое и лечебное средство при некоторых патогенных воздействиях (тяжелые ожоги и глубокое охлаждение). В кн.: Материалы конференции по проблеме адаптации, тренировки и другим способам повышения устойчивости организма // Донецк. - 1960. - С.30-31.
10. Крепс Е.М., Вержбинская Н.А., Ченыкаева Е.Ю., Чирковская Е.В., Говурина Ц.К. О приспособлении животных к хронической гипоксии (Влияние приспособления к хронической гипоксии на «потолок» и на высоту газообмена при пониженном содержании кислорода) // Физиол. Журн. СССР. - 1956. - Т.42, №2. - С.149-158.

11. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции // патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2011. - Т.1, С.2-18.
12. Меерсон Ф.З. Адаптационная медицина: механизмы и защитные эффекты адаптации // М. - 1993. - 331с.
13. Назаренко А.И. Влияние акклиматизации к гипоксии на течение экспериментальных эпилептиформных судорог у крыс // Бюл.эксперим.биологии и медицины. - 1962. - Т.53, №1. - С.48-50.
14. Рыбникова Е.А., Миронова В.И., Пивина С.Г., Ордян Н.Э., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Гипоксическое прекондиционирование предотвращает развитие постстрессорных депрессивных состояний у крыс // Докл. РАН. - 2006. - Т.411, №1. - С. 122-124.
15. Рыбникова Е.А., Хожай Л.И., Тюлькова Е.И. и др. Влияние гипобарической гипоксии на экспрессию белков ранних генов и структурные изменения нейронов мозга: корректирующий эффект прекондиционирования // Морфология. - 2004. - Т.125. №2. - С.10-15.
16. Самойлов М.О. Мозг и адаптация. Молекулярно-клеточные механизмы. - СПб: Ин-т физиологии им. И.П.Павлова РАН, 1999. - 272 с.
17. Самойлов М.О. Реакции нейронов мозга на гипоксию // Л.: Наука, 1985. - 190 с.
18. Самойлов М.О., Лазаревич Е.В., Семенов Д.Г., Мокрушин А.А., Тюлькова Е.И., Романовский Д.Ю., Милякова Е.А., Дудкин К.Н. Адаптивные эффекты прекондиционирования нейронов мозга // Физиол.журн. им. И.М. Сеченова. - 2001а. - Т.87, №6. - С.714-729.
19. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А. Молекулярно-клеточные и гормональные механизмы индуцированной толерантности мозга к экстремальным факторам среды // Российский физиол. журн. им. И.М.Сеченова. – 2012. – Т.98, №1. – С.108-126.
20. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Ситник Н.А., Глущенко Т.С., Тюлькова Е.И., Гринкевич Л.Н. Прекондиционирование модифицирует активность митоген-активируемых протеинкиназ и транскрипционного фактора c-jun в гиппокампе крыс вслед за тяжелой гипобарической гипоксией // Нейрохимия. - 2007. - Т.24, №1. - С.219-226.
21. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Отеллин В.А., Хожай Л.И., Пелто-Хьюкко М. Влияние гипобарической гипоксии на поведенческие реакции и экспрессию ранних генов в мозге крыс: корректирующий эффект прекондиционирующего воздействия // Докл. РАН. - 2001б. - Т.381, №1. - С.513-515.
22. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Тюлькова Е.И., Спирау Я., Пелто-Хьюкко М. Митохондриальные антиоксиданты тиоредоксин-2 и Mn-супероксиддисмутаза вовлекаются в механизмы гипоксической толерантности мозга // Докл. РАН. - 2002. - Т.387, №3. - С.498-500.
23. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Чурилова А.В. Сигнальные молекулярные и гормональные

- механизмы формирования протективных эффектов гипоксического preconditionирования // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2012. - №3. – С.3-10.
24. Самойлов М.О., Семенов Д.Г., Мокрушин А.А., Тюлькова Е.И., Романовский Д.Ю., Милякова Е.А. Вовлечение глутаматных рецепторов NMDA типа в реакции нейронов мозга на аноксию // Вестник РАМН. - 2000. - №9. - С.34-39.
 25. Самойлов М.О., Семенов Д.Г., Тюлькова Е.И., Болехан Е.А. Молекулярно-клеточные механизмы протектирующего эффекта краткосрочной аноксии // Физиол.журн.им. И.М.Сеченова. - 1994. - Т. 80, №12. - С.71-75.
 26. Самойлов М.О., Ситник Н.А., Рыбникова Е.А., Глущенко Т.С., Тюлькова Е.И. Особенности экспрессии про- и антиапоптотических белков Вах и Bcl-2 в нейронах мозга крыс в ответ на тяжелую гипобарическую гипоксию: корректирующий эффект гипоксического preconditionирования // Докл. РАН. - 2005. - Т.403, №4. - С.1-3.
 27. Семенов Д.Г., Беляков А.В., Глущенко Т.С., Самойлов М.О. Участие метаботропных глутаматных рецепторов мозга в механизмах гипоксической сигнализации // Ж. Патологической физиологии. - 2012. - Т.3. - С.11-19.
 28. Семенов Д.Г., Самойлов М.О., Лазаревич Е.В. DTNB подавляет кальциевые ответы срезов коры мозга крыс на аноксию различной длительности // Бюлл. экспер. биологии и медицины. - 2001. – Т.131, №6. – С.526-528.
 29. Сидорова М.В., Рыбникова Е.А., Чурилова А.В., Самойлов М.О. Влияние различных режимов умеренной гипобарической гипоксии на экспрессию hif-1 α в неокортексе крыс // Украинский физиологический журнал. - 2013. - Т.59, №6. – С.111-115.
 30. Сиротинин Н.Н. Влияние адаптации к гипоксии и акклиматизации к высокогорному климату на устойчивость животных к некоторым экстремальным воздействиям // Патол.физиология и эксперим.терапия. - 1964. - Т.5. - С.12-15.
 31. Сиротинин Н.Н. Влияние акклиматизации к высокогорному климату на толерантность некоторых экстремальных воздействий (аноксия, кинетозы) / В кн.: Материалы конференции по проблеме адаптации, тренировки и другим способам повышения устойчивости организма. – Винница, 1962. С.3.
 32. Строев С.А., Самойлов М.О. Эндогенные антиоксиданты и гипоксическая толерантность мозга - СПб.: Ин-т физиологии им. И.П.Павлова РАН. - 2006. - 145с.
 33. Тиунов Л.А., Васильев Г.А., Остапенко О.Ф. Влияние акклиматизации к гипоксии на устойчивость экспериментальных животных к токсическому действию органических перекисей / В сб.: Материалы конференции по проблеме адаптации, тренировки и другим способам повышения устойчивости организма. – Винница, 1962. - С.162-163.
 34. Тюлькова Е.И., Семенов Д.Г., Самойлов М.О. участие кальциевой и фосфоинозитидной систем

внутриклеточной регуляции в адаптации нейронов срезов обонятельной коры мозга к гипоксии *in vitro* // Бюл.эксперим. биологии и медицины. - 1998. - Т.125, №3. - С.259-262.

35. Федин А.И., Румянцева С.А. Интенсивная терапия ишемического инсульта. - М: Медицинская книга, 2004. - С.284.
36. Almeida O., Conde G., Crochmore C., Demeinieux B., Fischer D., Hassan A., Meyer M., Holsboer F., Michaelidis T. Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate // *Faseb J.* –2000. V.14. – P.779-790.
37. Altman J. Programmed cell death: the paths to suicide // *Trends Neurosci.* – 1992. – V.15, №8. – P.278-280.
38. Andoh T., Chock P., Chiueh C.. The roles of thioredoxin in protection against oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells // *J Biol Chem.* – 2002. – V.277, №12. – P.9655-9660.
39. Antonawich F., Miller G., Rigsby D., Davis J. Regulation of ischemic cell death by glucocorticoids and adrenocorticotrophic hormone // *Neuroscience.* – 1999. - V.88. – P.319–325.
40. Ao H., Ko S., Zhuo M. CREB activity maintains the survival of cingulate cortical pyramidal neurons in the adult mouse brain // *Mol. Brain.* – 2006. – V.2. – P.15.
41. Arieli Y, Eynan M, Gancz H., Arieli R., Kashi Y. Heat acclimation prolongs the time to central nervous system oxygen toxicity in the rat. Possible involvement of HSP72 // *Brain Res.* - 2003. - V.962. - P.15–20.
42. Bacsikai B., Hochner B., Mahaut-Smith M., Adams S., Kaang B., Kandel E., Tsien R. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons // *Science.* – 1993. – V.260. – P.222–226.
43. Bakalkin G., Yakovleva T., Terenius L. NF- κ B-like factors in the murine brain. Developmentally-regulated and tissuespecific expression // *Mol. Brain Res.* - 1993. - V.20. - P.137–146.
44. Bamberger C., Schulte H., Chrousos G. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids // *Endocr Rev.* – 1996. – V.17. – P.245–261.
45. Baranova O., Miranda L., Pichiule P., Dragatsis I., Johnson R., Chavez J. Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 α increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia // *J Neurosci.* – 2007. – V.27. – P.6320–6332.
46. Barco A., Alarcon J., Kandel E. Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of longterm potentiation by enhancing synaptic capture // *Cell.* – 2002. – V.108. – P.689–703.
47. Barger S., Horster D., Furukawa K., Goodman Y., Krieglstein J., Mattson M. Tumor necrosis factors α and β protect neurons against amyloid β -peptide toxicity: evidence for involvement of a κ B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca^{2+} accumulation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1995. - V.92. - P.9328–9332.
48. Barger S., Mattson M. Induction of neuroprotective κ B-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's β -amyloid precursor // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 1996. – V.40. – P.116–126.

49. Beato M., Sanchez-Pacheco A. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex // *Endocr Rev.* – 1996. – V.17. – P.587–609.
50. Beck T., Lindholm D., Castren E., Wree A. Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 1994. – V.14. – P.689–692.
51. Behl C., Lezoualch F., Trapp T., Widmann M., Skutella T., Holsboer F. Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro // *Endocrinology.* – 1997. – V.38. – P.101–106.
52. Beilharz E., Williams C., Dragunow M., Sirimanne E., Gluckman P. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss // *Mol. Brain Res.* – 1995. – V.29. – P.1–14.
53. Beiter-Johnson D., Millhorn D. Hypoxia induces phosphorylation of the cyclic AMP response element-binding protein by a novel signaling mechanism // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V.273. – P.19834–19839.
54. Bentires-Alj M., Dejardin E., Viatour P., Van Lint C., Froesch B., Reed J., Merville M., Bours V. Inhibition of the NF-kappa B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines // *Oncogene.* – 2002. – V.20. – P.2805-2813.
55. Bergeron M., Gidday J., Yu A., Semenza G., Ferriero D., Sharp F. Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain // *Ann Neurol.* – 2000. – V.48, №3. – P.285-296.
56. Bernaudin M., Nedelec A., Divoux D., MacKenzie E., Petit E., Schumann-Bard P. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2002a. – V.22. – P.393-403.
57. Bernaudin M., Tang Y., Reilly M., Petit E., Sharp F. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance // *J Biol Chem.* – 2002b. – V.277. – P.39728–39738.
58. Berridge M., Irvine R. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction // *Nature.* – 1984. – V.312, №5992. – P.315-321.
59. Bito H., Deisseroth K., Tsien R. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca^{2+} - and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression // – 1996. – V.87, №7. – P.1203-1214.
60. Blendy J., Kaestner K., Schmid W., Gass P., Schutz G. Targeting of the CREB gene leads to up-regulation of a novel CREB mRNA isoform // *EMBO J.* – 1996. – V.15. – P.1098–1106.
61. Blondeau N., Widmann C., Lazdunski M., Heurteaux C. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance // *J. Neurosci.* – 2001. – V.21. – P.4668-4677.
62. Blum R., Kafitz K., Konnerth A. Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel $\text{Na(V)}1.9$ // *Nature.* – 2002. – V.419. – P.687–693.
63. Bokura H., Robinson R. Long-term cognitive impairment associated with caudate stroke // *Stroke.* – 1997. – V.28. – P.970-975.

64. Bond A., Lodge D., Hicks C., Ward M., O'Neill M. NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus // *Eur J Pharmacol.* – 1999. – V.380, №2-3. – P.91-99.
65. Bonni A., Brunet A., West A., Datta S., Takasu M., Greenberg M. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and - independent mechanisms // *Science.* – 1999. V.286. – P.1358–1362.
66. Botchkina G., Geimonen E., Bilof M., Villarreal O., Tracey K. Loss of NF-kappaB activity during cerebral ischemia and TNF cytotoxicity // *Mol. Med.* - 1999. - V.5. - P.372-381.
67. Bourtchuladze R., Frenguelli B., Blendy J., Cioffi D., Schutz G., Silva A. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein // *Cell.* – 1994. – V.79, №1. – P.59-68.
68. Boyle M., Brewer J., Funatsu M., Wozniak D., Tsien J., Izumi Y., Muglia L. Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2005. – V.102, №2. – P.473-478.
69. Brightwell J., Smith C., Countryman R., Neve R., Colombo P. Hippocampal overexpression of mutant creb blocks long-term, but not short-term memory for a socially transmitted food preference // *Learn. Mem.* - 2005. - V.12, №1. - P.12–17.
70. Brunet A., Bonni A., Zigmond M., Lin M., Juo P., Hu L., Anderson M., Arden K., Blenis J., Greenberg M. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor // *Cell.* – 1999. – V.96, №6. – P.857-868.
71. Bui N., Livolsi A., Peyron J., Prehn J. Activation of nuclear factor kappaB and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha // *J. Cell Biol.* – 2001. – V.152. – P.753-764.
72. Burgering B., Coffey P. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction // *Nature.* – 1995. – V.376, №6541. - P.599-602.
73. Canossa M., Griesbeck O., Berninger, B., Campana G., Kolbeck R., Thoenen H. Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1997. – V.94. P.13279–13286.
74. Carbonell T., Rama R. Iron, oxidative stress and early neurological deterioration in ischemic stroke // *Curr Med Chem.* – 2007. - V.14. – P.857–874.
75. Cardone M., Roy N., Stennicke H., Salvesen G., Franke T., Stanbridge E., Frisch S., Reed J. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation // *Science.* – 1998. – V.282, №5392. – P.1318-1321.
76. Carlezon W., Duman R., Nestler E. The many faces of CREB // *Trends Neurosci.* – 2005. – V.28. – P.436--445.
77. Carroll C., Carroll S., Overgoor M., Tobin G., Barker J. Acute ischemic preconditioning of skeletal muscle

- prior to flap elevation augments muscle-flap survival // *Plast Reconstr Surg.* - 1997. - V.100. - P.58–65.
78. Carter B., Kaltschmidt C., Kaltschmidt B., Offenhäuser N., Böhm-Matthaei R., Baeuerle P., Barde Y. Selective activation of NF- κ B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75 // *Science.* - 1996. - V.272. - P.542–545.
 79. Chalovich E., Zhu J., Caltagarone J., Bowser R., Chu C. Functional repression of cAMP response element in 6-hydroxydopamine-treated neuronal cells // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V.281. – P.17870–17881.
 80. Chao M. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2003. – V.4. – P.299–309.
 81. Charciaut-Marlangue C., Ben-ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis // *Neuroreport.* - 1995. - V.7, №1. - P.61-64.
 82. Chavez J., LaManna J. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1 // *J Neurosci.* – 2002. – V.22, №20. – P.8922–8931.
 83. Chen J., Graham S., Nakayama M., Zhu R., Jin K., Stetler R., Simon R. Apoptosis repressor genes Bcl-2 and Bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 1997. – V.17, №1. – P.2-10.
 84. Chen L., Greene W. Shaping the nuclear action of NF- κ B // *Nat Rev Mol Cell Biol.* - 2004. - V.5. - P.392–401.
 85. Chen L., Mu Y., Greene W. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF- κ B // *EMBO J.* - 2002. - V.21. - P.6539–6548.
 86. Cheng B., Christakos S., Mattson M. Tumor necrosis factors protect neurons against excitotoxic/metabolic insults and promote maintenance of calcium homeostasis // *Neuron.* - 1994. - V.12. - P.139–153.
 87. Chipuk J., Moldoveanu T., Llambi F., Parsons M., Green D. The BCL-2 family reunion // *Mol. Cell.* – 2010. – V.37. – P.299–310.
 88. Chiueh C., Andoh T., Chock P. Induction of thioredoxin and mitochondrial survival proteins mediates preconditioning-induced cardioprotection and neuroprotection // *Ann. N Y Acad. Sci.* - 2005. - V.1042. - P.403-418.
 89. Choi D. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage // *Trends Neurosci.* – 1998. – V.11. – P.465–469.
 90. Choi D., Rothman S. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death // *Annu Rev Neurosci.* – 1990. – V.13. – P.171-182.
 91. Choi O. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent // *Neurosci Lett.* - 1985. – V.5, №8. – P.293-297.
 92. Choi Y., Lee B., Cho H., Reyes I., Pu X., Saido T., Hoyt K., Obrietan K. CREB is a key regulator of striatal vulnerability in chemical and genetic models of Huntington's disease // *Neurobiol. Dis.* - 2009. –

V.36. – P. 259–268.

93. Chopp M., Chen H., Ho K., Dereski M., Brown E., Hetzel F., Welch K. Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat // *Neurology*. - 1989. - V.39. - P.1396-1398.
94. Chrivia J., Kwok R., Lamb N., Hagiwara M., Montminy M., Goodman R. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP // *Nature*. – 1993. – V.365. – P.855-859.
95. Chrousos G. The glucocorticoid receptor gene, longevity, and the complex disorders of Western societies // *Am. J. Med.* – 2004. – V.117. – P.204–207.
96. Chuang D., Gao X., Paul S. N-methyl-D-aspartate exposure blocks glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells // *Mol Pharmacol.* – 1992. – V.42, №2. – P.210-216.
97. Clarkson A. Anesthetic-mediated protection/preconditioning during cerebral ischemia // *Life Sci.* - 2007. - V.80. - P.1157–1175.
98. Clemens J., Stephenson D., Smalstig E., Dixon E., Little S. Global ischemia activates nuclear factor-kB in forebrain neurons of rats // *Stroke*. - 1997. - V.28. - P.1073–1080.
99. Clifton G., Christensen M. Use of moderate hypothermia during elective craniotomy // *Tex Med.* - 1992. - V.88. - P.66-69.
100. Cory S., Adams J. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch // *Nat Rev Cancer*. – 2002. – V.2, №9, - P.647-656.
101. Crochemore C., Lu J., Wu Y., Liposits Z., Sousa N., Holsboer F., Almeida O. Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation // *Mol Psychiatry*. – 2005. – V.10, №8. – P.790-798.
102. Culmsee C., Gerling N., Lehmann M., Nikolova-Karakashian M., Prehn J., Mattson M., Kriegstein J. Nerve growth factor survival signalling in cultured hippocampal neurons is mediated through TrkA and requires the common neurotrophin receptor P75 // *Neuroscience*. - 2002. - V.115. - P.1089-1108.
103. Dash P., Karl K., Colicos M., Prywes R., Kandel E. cAMP response element-binding protein is activated by Ca²⁺/calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1991. – V.88. – P.5061–5065.
104. Datta S., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery // *Cell*. – 1997. – V.91, №2. – P.231-241.
105. Davis D., Patel P. Ischemic preconditioning in the brain // *Curr. Opin. Anaesthesiol.* – 2003. – V.16. – P.447-452.
106. Davis S., Vanhoutte P., Pages C., Caboche J., Laroche S. The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo // *J. Neurosci.* – 2000. – V.20. – P.4563-4572.
107. Dawson V., Dawson T. Neuronal ischaemic preconditioning // *Trends Pharmacol Sci.* - 2000. - V.21. - P.423–424.

108. Dawson V., Dawson T., London E., Bredt D., Snyder S. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. – 1991. – V.88. – P.6368–6371.
109. Deak M., Clifton A., Lucocq L., Alessi D. Mitogenand stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB // *EMBO J*. 1998. – V.17. – P.4426–4441.
110. Deisseroth K., Kevin Heist E., Tsien R. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons // *Nature*. – 1998. – V.392. – P.198–202.
111. de Kloet E. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control // *Front Neuroendocrinol*. – 1991. – V.12. – P.95–164.
112. de Kloet E., Joëls M., Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease // *Nat. Rev. Neurosci*. – 2005. – V.6. – P.463–475.
113. de Kloet E., Karst H., Joëls M. Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow // *Front Neuroendocrinol*. – 2008. – V.29, №2. – P.268–272.
114. de Kloet E., Vreugdenhil E., Oitzl M., Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease // *Endocrine Reviews*. – 1998. – V.19, №3. – P.269–301.
115. Deroo B., Rentsch C., Sampath S., Young J., de Franco D., Archer T. Proteasomal inhibition enhances glucocorticoid receptor transactivation and alters its subnuclear trafficking // *Mol Cell Biol*. – 2002. – V.22, №12. – P.4113–4123.
116. Digicaylioglu M., Lipton S. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades // *Nature*. - 2001. - V.412. - P.641–647.
117. Dirnagl U., Meisel A. Endogenous neuroprotection: mitochondria as gateways to cerebral preconditioning? // *Neuropharmacology*. - 2008. - V.55. - P.334–344.
118. Dodson G., Tibbetts R. DNA replication stress-induced phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein mediated by ATM // *J. Biol. Chem*. – 2006. – V.281. – P.1692–1697.
119. Drouin J., Sun Y., Chamberland M., Gauthier Y., De Lean A., Nemer M., Schmidt T. Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene // *EMBO J*. – 1993. V.12. – P.145–156.
120. Du K., Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB // *J. Biol. Chem*. – 1998. – V.273. – P.32377–32379.
121. Duma D., Jewell C., Cidlowski J. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification // *J Steroid Biochem Mol Biol*. – 2006. – V.102, №1–5. – P.11–21.
122. Duman R., Voleti B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents // *Trends Neurosci*. – 2012. – V.35, №1. – P.47–56.
123. Eliseev R., Vanwinkle B., Rosier R., Gunter T. Diazoxide-mediated preconditioning against apoptosis involves activation of cAMP-response element-binding protein (CREB) and NF-kappaB // *J. Biol. Chem*.

- 2004. - V.279. - P.46748-46754.
124. Ferraguti F., Shigemoto R. Metabotropic glutamate receptors // *Cell Tissue Res.* – 2006. – V.326, №2. – P.483-504.
 125. Finkbeiner S., Tavazoie S., Maloratsky A., Jacobs K., Harris K., Greenberg M. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses // *Neuron.* – 1997. – V.19. – P.1031–1047.
 126. Fisher M., Ratan R. New perspectives on developing acute stroke therapy // *Ann Neurol.* - 2003. - V.53. - P.10–20.
 127. Frank L., Ventimiglia R., Anderson K., Lindsay R., Rudge J. BDNF down-regulates neurotrophin responsiveness, TrkB protein and TrkB mRNA levels in cultured rat hippocampal neurons // *Eur. J. Neurosci.* - 1996. – V.8. – P.1220–1230.
 128. Franke T., Yang S., Chan T., Datta K., Kazlauskas A., Morrison D., Kaplan D., Tsichlis P. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase // *Cell.* – 1995. – V.81, №5. – P.727-736.
 129. Fridmacher V., Kaltschmidt B., Goudeau B., Ndiaye D., Rossi F., Pfeiffer J., Kaltschmidt C., Israël A., Mémet S. Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection // *J. Neurosci.* - 2003. - V.23. - P.9403-9408.
 130. Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Noshita N., Sugawara T., Kawase M., Chan P. The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice // *J Neurosci.* – 2000. – V.20, №8. – P.2817-2824.
 131. Furay A., Bruestle A., Herman J. The role of the forebrain glucocorticoid receptor in acute and chronic stress // *Endocrinology.* – 2008. – V.149. – P.5482–5490.
 132. Furukawa K., Mattson M. The transcription factor NF-kB mediates increases in calcium currents and decreases in NMDA and AMPA/kainate-induced currents induced by tumor necrosis factor- α in hippocampal neurons // *J. Neurochem.* - 1998. - V.70. - P.1876–1886.
 133. Gartner A., Polnau D., Staiger V., Sciarretta C., Minichiello L., Thoenen H., Bonhoeffer T., Korte M. Hippocampal long-term potentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase Cgamma signaling // *J. Neurosci.* - 2006. V.26. – P.3496–3504.
 134. Gewies A. introduction to apoptosis. – 2003. <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>.
 135. Ghosh A., Carnahan J., Greenberg M. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons // *Science.* – 1994. – V.263. – P.1618–1623.
 136. Ghosh A., Greenberg M. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences // *Science.* - 1995. V.268. – P.239–247.
 137. Gidday J., Fitzgibbons J., Shah A., Park T. Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat // *Neurosci Lett.* - 1994. - V.168. - P.221-224.

138. Gillardon F., Spranger M., Tiesler C., Hossmann K.A. Expression of cell death-associated phospho-c-Jun and p53-activated gene 608 in hippocampal CA1 neurons following global ischemia // *Brain Res. Mol. Brain Res.* - 1999. - V.73. - P.138-143.
139. Gillies L., Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane // *J Cell Biochem.* – 2014. – V.115, №4. – P.632-640.
140. Gilmore T. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives // *Oncogene.* – 2006. – V.25. – P.6680–6684.
141. Gómez-Palacio-Schjetnan A., Escobar M. Neurotrophins and Synaptic Plasticity // *Curr Top Behav Neurosci.* – 2013. – V.15. – P.117-136.
142. Gonzalez G., Montminy M. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133 // *Cell.* – 1989. – V.59. – P.675–680.
143. Goodman Y., Bruce A., Cheng B., Mattson M. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons // *J. Neurochem.* - 1996. – V.66. – P.1836–1844.
144. Goodman Y., Mattson M. Ceramide protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative insults, and amyloid b-peptide toxicity // *J. Neurochem.* - 1996. - V.66. - P.869–872.
145. Green D., Evan G. A matter of life and death // *Cancer Cell* 1. – 2002. – P.19–30.
146. Greenberg M., Xu B., Lu B., Hempstead B. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function // *J. Neurosci.* – 2009. – V.29. – P.12764–12767.
147. Grilli M., Memo M. Nuclear factor- κ B/Rel proteins: a point of convergence of signalling pathways relevant in neuronal function and dysfunction // *Biochem. Pharmacol.* - 1998. - V.57. - P.1-7.
148. Groeneweg F., Karst H., de Kloet E., Joëls M. Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response // *J Endocrinol.* – 2011. – V.209, №2. – P.153-167.
149. Gu Z., Jiang Q., Zhang G. Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal protein kinase in ischemic tolerance // *Neuroreport.* - 2001a. – V.12. – P.3487–3491.
150. Gu Z., Jiang Q., Zhang G. c-Jun N-terminal kinase activation in hippocampal CA1 region was involved in ischemic injury // *Neuroreport.* - 2001b. - V.12. - P.897-900.
151. Guerrini L., Blasi F., Denis-Donini S. Synaptic activation of NF- κ B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V.92. – P.9077–9081.
152. Haapasalo A., Sipola I., Larsson K., Akerman K., Stoilov P., Stamm S., Wong G., Castren E. Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V.277. – P.43160–43167.
153. Hagiwara M., Alberts A., Brindle P., Meinkoth J., Feramisco J., Deng T., Karin M., Shenolikar S., Montminy M. Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB // *Cell.* – 1992. - V.70. – P.105–113.

154. Han B., Holtzman D. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway // *J Neurosci.* – 2000. – V.20, №15. – P.5775-5781.
155. Han F., Ozawa H., Matsuda K., Nishi M., Kawata M. Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus // *Neurosci Res.* - 2005. – V.51. – P.371-381.
156. Hansen A. Effect of anoxia on ion distribution in the brain // *Physiol Rev.* – 1985. – V.65, №1. – P.101-148.
157. Hansson A., Cintra A., Belluardo N., Sommer W., Bhatnagar M., Bader M., Ganten D., Fuxe F. Gluco and mineralocorticoid receptor mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and neocortex of the rat // *Eur. J. Neurosci.* – 2000. – V.12. – P.2918–2934.
158. Hara H., Kato H., Kogure K. Protective effect of alpha-tocopherol on ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus // *Brain Res.* - 1990a. – V.510, №2. – P.335-338.
159. Hara H., Onodera H., Yoshidomi M., Matsuda Y., Kogure K. Staurosporine, a novel protein kinase C inhibitor, prevents postischemic neuronal damage in the gerbil and rat // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 1990b. – V.10. – P.646-653.
160. Hara T., Hamada J., Yano S., Morioka M., Kai Y., Ushio Y. CREB is required for acquisition of ischemic tolerance in gerbil hippocampal CA1 region // *J Neurochem.* - 2003. – V.86. – P.805–814.
161. Hardingham G., Fukunaga Y., Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways // *Nat. Neurosci.* – 2002. – V.5. – P.405–414.
162. Hartley D., Kurth M., Bjerkness L., Weiss J., Choi D. Glutamate receptor-induced Ca²⁺ accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration // *J. Neurosci.* - 1993. – V.13, №5. – P.1993-2000.
163. Hassan A., von Rosenstiel P., Patchev V., Holsboer F., Almeida O. Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone // *Exp Neurol.* – 1996. – V.140, №1. – P.43-52.
164. Hata R., Gass P., Mies G., Wiessner C., Hossmann K. Attenuated c-fos mRNA induction after middle cerebral artery occlusion in CREB knockout mice does not modulate focal ischemic injury // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 1998. – V.18, №12. – P.1325-1335.
165. Haynes L., Griffiths M., Hyde R., Barber D., Mitchell I. Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: Implications for mood disorders // *Neuroscience.* - 2001. – V.104. – P.57–69.
166. Heck S., Kullmann M., Gast A., Ponta H., Rahmsdorf H., Herrlich P., Cato A. A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1 // *EMBO J.* – 1994. – V.13. – P.4087–4095.
167. Heck S., Lezoualc'h F., Engert S., Behl C. Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection

- against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor-kappaB // *J. Biol.Chem.* - 1999. - V.274. - P.9828-9835.
168. Herman J., Patel P., Akil H., Watson S. Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat // *Mol Endocrinol.* - 1989. – V.3. – P.1886-1894.
 169. Herzig S., Long F., Jhala U., Hedrick S., Quinn R., Bauer A., Rudolph D., Schutz G., Yoon C., Puigserver P., Spiegelman B., Montminy M. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1 // *Nature.* – 2001. – V.413. – P.179–183.
 170. Hillion J., Li Y., Maric D., Takanohashi A., Klimanis D., Barker J., Hallenbeck J. Involvement of Akt in preconditioning-induced tolerance to ischemia in PC12 cells // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2006. – V.26. – P.1323–1331.
 171. Hirschberg D., Jagerbrink T., Samskog J., Gustafsson M., Stahlberg M., Alvelius G., Husman B., Carlquist M., Jornvall H., Bergman T. Detection of phosphorylated peptides in proteomic analyses using microfluidic compact disk technology // *Anal Chem.* - 2004. – V.76. – P.5864-5871.
 172. Hittelman A., Burakov D., Iñiguez-Lluhi J., Freedman L., Garabedian M. Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins // *EMBO J.* – 1999. – V.18. – P.5380–5388.
 173. Hofmeier G., Lux H. The time courses of intracellular free calcium and related electrical effects after injection of CaCl₂ into neurons of the snail, *Helix pomatia* // *Pflügers Arch.* – 1981. – V.391, №3. – P.242-251.
 174. Hu B., Fux C., Martone M., Zivin J., Ellisman M. Persistent phosphorylation of cyclic AMP responsive element-binding protein and activating transcription factors following transient cerebral ischemia in rat brain // *Neuroscience.* – 1999. – V.89. – P.437–452.
 175. Huang B., Yang X., Lamb A., Chen L. Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. // *Cell Signal.* – 2010. – V.22, №9. – P.1282-1290.
 176. Huang E., Reichardt L. Neurotrophins: roles in neuronal development and function // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2001. – V.24. – P.677–736.
 177. Hutchison K., Dittmar K., Pratt W. All of the factors required for assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with heat shock protein 90 are preassociated in an intracellular protein folding structure, a “foldosome.” // *J Biol Chem.* – 1994. – V.269. – P.27894–27899.
 178. Hwang I., Yoo K., Namb Y., Choi J., Lee S., Kwon Y., Kang T., Kim Y., Won M. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor expressions in astrocytes and microglia in the gerbil hippocampal CA1 region after ischemic insult // *Neurosci. Res.* – 2006. – V.54. – P.319–327.
 179. Ikeda T., Xia X., Xia Y., Ikenoue T. Hyperthermic preconditioning prevents blood-brain barrier disruption produced by hypoxia-ischemia in newborn rat // *Brain Res Dev Brain Res.* - 1999. - V.117. -

P.53-58.

180. Impey S., Obrietan K., Storm D. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity // *Neuron*. – 1999. – V.23, №1. – P.11-14.
181. Irving E., Barone F., Reith A., Hadingham S., Parson A. Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurons and glia following focal cerebral ischemia in the rat // *Mol Brain Res*. - 2000a. – V.77. – P.65–75.
182. Irving E., Hadingham S., Roberts J., Gibbons M., Chabot-Fletcher M., Roshak A., Parsons A. Decreased nuclear factor-kappaB DNA binding activity following permanent focal cerebral ischemia in the rat // *Neurosci Lett*. - 2000b. - V.288. - P.45-48.
183. Ismaili N., Garabedian M. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation // *Ann N Y Acad Sci*. – 2004. – V.1024. – P.86–101.
184. Ito K., Yamamura S., Essilfie-Quaye S., Cosio B., Ito M., Barnes P., Adcock I. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF- κ B suppression // *J Exp Med*. – 2006. – V.203, №1. – P.7–13.
185. Jankord R., Herman J. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress // *Ann N Y Acad Sci*. – 2008. – V.1148. – P.64-73.
186. Jiang X., Tian F., Mearow K., Okagaki P., Lipsky R., Marini A. The excitoprotective effect of N-methyl-D-aspartate receptors is mediated by a brain-derived neurotrophic factor autocrine loop in cultured hippocampal neurons // *J Neurochem*. – 2005. – V.94, №3. – P.713-722.
187. Joels M., de Kloet E. Mineralocorticoid receptor-mediated effects on membrane properties of rat CA1 pyramidal neurons in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1990. – V.87. – P.4495–4498.
188. Joels M., Karst H., Krugers H., Lucassen P. Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis // *Front. Neuroendocrinol*. – 2007. – V.28. – P.72–96.
189. Johannessen M., Delghandi M., Moens U. What turns CREB on? // *Cell. Signal*. - 2004. – V.16. – P.1211–1227.
190. Josselyn S., Nguyen P. CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges // *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. – 2005. – V.4, №5. – P.481-497.
191. Kadar T., Dachir S., Shukitt-Hale B., Levy A. Sub-regional hippocampal vulnerability in various animal models leading to cognitive dysfunction // *J Neural Transm*. - 1998. - V.105, №8-9. - P.987-1004.
192. Kaltschmidt B., Kaltschmidt C. Constitutive NF-kappa B activity in neurons // *Mol. Cell. Biol*. - 1994. – V.14. – P.3981–3992.
193. Kaneko T., Yokoyama K., Makita K. Late preconditioning with isoflurane in cultured rat cortical neurons // *Br J Anaesth*. - 2005. - V.95. - P.662-668.
194. Kapinya K., Lowl D., Futterer C. Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent // *Stroke*. - 2002. - V.33. - P.1889-1898.

195. Kaplan D., Miller F. "Neurotrophin signal transduction in the nervous system." // *Curr Opin Neurobiol.* - 2000. - V.10. - P.381-391.
196. Kaplan D., Stephens R. Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor // *J Neurobiol.* - 1994. - V.25. - P.1404-1417.
197. Kaplan J., Dimlich R., Biroš M., Hedges J. Mechanisms of ischemic cerebral injury // *Resuscitation.* - 1987. - V.15, №3. - P.149-169.
198. Karin M., Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity // *Annu Rev Immunol.* - 2000. - V.18. - P.621-663.
199. Karst H., Berger S., Turiault M., Tronche F., Schütz G., Joëls M. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2005. - V.102. - P.19204-19207.
200. Kato H., Kogure K., Araki T., Liu X., Kato K., Itoyama Y. Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the hippocampus following ischemia in a gerbil model of ischemic tolerance // *J Cereb Blood Flow Metab.* - 1995. - V.15, №1. - P.60-70.
201. Kato H., Liu Y., Araki T., Kogure K. MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus // *Neurosci Lett.* - 1992. - V.139, №1. - P.118-121.
202. Kawahara N., Wang Y., Mukasa A., Furuya K., Shimizu T., Hamakubo T., Aburatani H., Kodama T., Kirino T. Genome-wide gene expression analysis for induced ischemic tolerance and delayed neuronal death following transient global ischemia in rats // *J Cereb Blood Flow Metab.* - 2004. - V.24. - P.212-223.
203. Keller J., Kindy M., Holtsberg F. Mitochondrial MnSOD prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction // *J. Neurosci.* - 1998. - V.18. - P.687-697.
204. Kida S. A Functional Role for CREB as a Positive Regulator of Memory Formation and LTP // *Exp Neurobiol.* - 2012. - V.21, №4. - P.136-140.
205. Kida S., Josselyn S., Peña de Ortiz S., Kogan J., Chevere I., Masushige S., Silva A. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories // *Nat Neurosci.* - 2002. - V.5. - P.348-355.
206. Kim G., Kondo T., Noshita N., Chan P. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals // *Stroke.* - 2002. - V.33, №3. - P.809-815.
207. Kim H., Roe J., Chock P., Yim M. Transcriptional activation of the human manganese superoxide dismutase gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate // *J. Biol. Chem.* - 1999. - V.274. - P.37455-37460.
208. Kino T., Chrousos G. Tissue-specific glucocorticoid resistance-hypersensitivity syndromes: multifactorial states of clinical importance // *J Allergy Clin Immunol.* - 2002. - V.109, №4. - P.609-613.

209. Kirino T. Ischemic tolerance // *J Cerebr Blood Flow Metabol.* - 2002. - V.22. - P.1283–1296.
210. Kirino T., Tsujita Y., Tamura A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons // *J Cerebr Blood Flow Metab* – 1991. – V.11. – P.299–307.
211. Kitagawa K. CREB and cAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain // *FEBS J.* – 2007. – V.274. – P.3210-3217.
212. Kitagawa K., Matsumoto M., Tagaya M. “Ischemic tolerance” phenomenon found in the brain // *Brain Res.* - 1990. - V.528. - P.21-24.
213. Kitagawa K., Matsumoto M., Tsujimoto Y., Ohtsuki T., Kuwabara K., Matsushita K., Yang G., Tanabe H., Martinou J., Hori M., Yanagihara T. Amelioration of hippocampal neuronal damage after global ischemia by neuronal overexpression of BCL-2 in transgenic mice // *Stroke.* – 1998. – V.29, №12. – P.2616-2621.
214. Kitagawa K., Sasaki T., Terasaki Y., Yagita Y., Mochizuki H. CREB activation is a key player for ischemic tolerance in the brain // *Rinsho Shinkeigaku.* – 2012. – V.52. – P.904-907.
215. Kodama T., Shimizu N., Yoshikawa N., Makino Y., Ouchida R., Okamoto K., Hisada T., Nakamura H., Morimoto C., Tanaka H. Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V.278. – P.33384–33391.
216. Kokaia Z., Zhao Q., Kokaia M., Elmér E., Metsis M., Smith M., Siesjö B., Lindvall O. Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage // *Exp Neurol.* – 1995. – V.136. – P.73-88.
217. Koponen E., Lakso M., Castren E. Overexpression of the full-length neurotrophin receptor trkB regulates the expression of plasticity-related genes in mouse brain // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 2004. – V.130. – P.81–94.
218. Kornhauser J., Cowan C., Shaywitz A., Dolmetsch R., Griffith E., Hu L., Haddad C., Xia Z., Greenberg M. CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events // *Neuron.* – 2002. – V.34. – P.221–233.
219. Koti R., Seifalian A., Davidson B. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications // *Dig Surg.* - 2003. - V.20. - P.383–396.
220. Kristian T., Siesjö E. B. Calcium in ischemic cell death // *Stroke.* - 1998. - V.29. - P.705-718.
221. Krnjević K., Leblond J. Changes in membrane currents of hippocampal neurons evoked by brief anoxia // *J Neurophysiol.* – 1989. – V.62, №1. – P.15-30.
222. Kronke G., Bochkov V., Huber J., Gruber F., Bluml S., Furnkranz A., Kadl A., Binder B., Leitinger N. Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V.278. – P.51006–51014.
223. Krugers H., Maslam S., Korf J., Joëls M., Holsboer F. The corticosterone synthesis inhibitor metyrapone prevents hypoxia/ischemia-induced loss of synaptic function in the rat hippocampus // *Stroke.*

- 2000. – V.31, №5. – P.1162-1172.
224. Lai M., Horsburgh K., Bae S., Carter R., Stenvers D., Fowler J., Yau J., Gomez-Sanchez C., Holmes M., Kenyon C., Seckl J., Macleod M. Forebrain mineralocorticoid receptor overexpression enhances memory, reduces anxiety and attenuates neuronal loss in cerebral ischaemia // *Eur J Neurosci.* – 2007. – V.25, №6. – P.1832-1842.
 225. Lai M., Seckl J., Macleod M. Overexpression of the mineralocorticoid receptor protects against injury in PC12 cells // *Mol. Brain Res.* – 2005. – V.135. – P.276–279.
 226. Lalli E., Lee J., Masquillier D., Schlotter F., Foulkes N., Molina C., Sassone-Corsi P. Nuclear response to cyclic AMP: central role of transcription factor CREM (cyclic-AMP- responsive-element modulator) // *Biochem. Soc. Trans.* – 1993. – V.21. – P.912–917.
 227. Lamarre-Vincent N., Hsieh-Wilson L. Dynamic glycosylation of the transcription factor CREB: a potential role in gene regulation // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – V.125. – P.6612–6613.
 228. Lanzillotta A., Pignataro G., Branca C., Cuomo O., Sarnico I., Benarese M., Annunziato L., Spano P., Pizzi M. Targeted acetylation of NF-kappaB/RelA and histones by epigenetic drugs reduces post-ischemic brain injury in mice with an extended therapeutic window // *Neurobiol Dis.* – 2012. – V.49. – P.177-189.
 229. Le Drean Y., Mincheneau N., Le Goff P., Michel D. Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation // *Endocrinology.* – 2002. – V.143, №9. – P.3482–3489.
 230. Lee B., Butcher G., Hoyt K., Impey S., Obrietan K. Activity-dependent neuroprotection and cAMP response element-binding protein (CREB): kinase coupling, stimulus intensity, and temporal regulation of CREB phosphorylation at serine 133 // *J. Neurosci.* – 2005. – V.25. – P.1137–1148.
 231. Lee B., Cao R., Choi Y., Cho H., Rhee A., Hah C., Hoyt K., Obrietan K. The CREB/CRE transcriptional pathway: protection against oxidative stress-mediated neuronal cell death // *J. Neurochem.* – 2009. – V.108. – P.1251–1265.
 232. Lee H., Chang Y., Wang L., Wang S., Huang C., Ho C. cAMP response element-binding protein activation in ligation preconditioning in neonatal brain // *Ann Neurol.* – 2004. – V.56. – P.611–623.
 233. LePeillet E., Arvin B., Moncada C., Meldrum B. The non-NMDA antagonists, NBQX and GYKI 52466, protect against cortical and striatal cell loss following transient global ischemia in the rat // *Brain Res.* – 1992. – V.571. – P.115-120.
 234. Leonard M., Godson C., Brady H., Taylor C. Potentiation of glucocorticoid activity in hypoxia through induction of the glucocorticoid receptor // *J. Immunol.* – 2005. – V.174. – P.2250–2257.
 235. Levenson J., Choi S., Lee S-Y., Cao Y., Ahn H., Worley K., Pizzi M., Liou H-C., Sweatt J. A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel // *J. Neurosci.* – 2004. – V.24. – P.3933–3943.
 236. Li H., Xu X., Montell C. Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF // *Neuron.* – 1999. – V.24. – P.261–273.

237. Lightman S., Conway-Campbell B. The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2010. – V.11, №10. – P.710–718.
238. Lin C., Yeh S., Lu K., Leu T., Chang W., Gean P. A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala // *Neuron*. – 2001. – V.31. – P.841–851.
239. Lindvall O., Ernfors P., Bengzon J., Kokaia Z., Smith M., Siesjö B., Persson H. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1992. – V.89. – P.648–652.
240. Lipsky R., Xu K., Zhu D., Kelley C., Terhakopian A., Novelli A., Marini A. Nuclear factor kappa B is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection // *J. Neurochem*. – 2001. – V.78. – P.254–264.
241. Liu X., Kato H., Nakata N., Kogure K., Kato K. An immunohistochemical study of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in rat hippocampus after transient cerebral ischemia // *Brain Res*. – 1993. – V.625, - №1. – P.29–37.
242. Lonze B., Ginty D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system // *Neuron*. – 2002. – V.35. – P.605–623.
243. Lonze B., Riccio A., Cohen S., Ginty D. Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB // *Neuron*. – 2002. – V.34. – P.371–385.
244. Lu J., Goula D., Sousa N., Almeida O. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor mediation of glucocorticoid-induced apoptosis in hippocampal cells and the neuroprotective role of synaptic N-methyl-D-aspartate receptors // *Neuroscience*. – 2003a. – V.121. – P.123–131.
245. Lu Q., Hutchins A., Doyle C., Lundblad J., Kwok R. Acetylation of cAMP-responsive element-binding protein (CREB) by CREB-binding protein enhances CREB-dependent transcription // *J. Biol. Chem*. – 2003b. – V.278. – P.15727–15734.
246. Ma D., Hossain M., Pettet G., Luo Y., Lim T., Akimov S., Sanders R., Franks N., Maze M. Xenon preconditioning reduces brain damage from neonatal asphyxia in rats // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2006. – V.26. – P.199–208.
247. Ma Q., Harris-White M., Ubeda O., Simmons M., BeechW., Lim G., Teter B., Frautschy S., Cole G. Evidence of Ab- and transgene-dependent defects in ERK-CREB signaling in Alzheimer's models // *J. Neurochem*. – 2007. – V.103. – P.1594–1607.
248. Mabuchi T., Kitagawa K., Kuwabara K., Takasawa K., Ohtsuki T., Xia Z., Storm D., Yanagihara T., Hori M., Matsumoto M. Phosphorylation of cAMP response element-binding protein in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate in vitro and ischemia in vivo // *J. Neurosci*. – 2001. – V.21. – P.9204–9213.
249. Macleod M., Johansson I., Soderstrom I., Lai M., Gido G., Wieloch T., Seckl J. R., Olsson T.

- Mineralocorticoid receptor expression and increased survival following neuronal injury // *Eur. J. Neurosci.* – 2003. – V.17. – P.1549–1555.
250. Mamounas L., Blue M., Siuciak J., Altar C. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain // *J. Neurosci.* – 1995. – V.15. – P.7929–7939.
 251. Mantamadiotis T., Lemberger T., Bleckmann S., Kern H., Kretz O., Martin Villalba A., Tronche F., Kellendonk C., Gau D., Kapfhammer J., Otto C., Schmid W., Schütz G. Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration // *Nat. Genet.* – 2002. – V.31. – P.47–54.
 252. Marini A., Jiang X., Wu X., Pan H., Guo Z., Mattson M., Blondeau N., Novelli A., Lipsky R. Preconditioning and neurotrophins: a model for brain adaptation to seizures, ischemia and other stressful stimuli // *Amino Acids.* – 2007. – V.32. – P.295-297.
 253. Marini A., Rabin S., Lipsky R., Mocchetti I. Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate // *J Biol Chem.* – 1998. – V.273, №45. – P.29394-29399.
 254. Marion D., Penrod L., Kelsey S. Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia // *N Engl J Med.* - 1997. - V.20. - P.540-546.
 255. Martou G., O'Blencs C., Huang N. Development of an in vitro model for study of the efficacy of ischemic preconditioning in human skeletal muscle against ischemia-reperfusion injury // *J Appl Physiol.* - 2006. - V.101, №5. - P.1335-1342.
 256. Mattson M. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease // *Ann N Y Acad Sci.* – 2008. – V.1144. – P.97–112.
 257. Mattson M., Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders // *J Clin Invest.* – 2001. – V.107, №3. – P.247-254.
 258. Mattson M., Goodman Y., Luo H., Fu W., Furukawa K. Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration // *J Neurosci Res.* – 1997. – V.49, №6. – P.681-697.
 259. Mattson M., Lovell M., Furukawa K., Markesbery W. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca^{2+} concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons // *J Neurochem.* – 1995. – V.65. – P.1740–1751.
 260. Mattson M., Meffert M. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease // *Cell Death Differ.* – 2006. – V.13, №5. – P.852-860.
 261. Mauna J., Miyamae T., Pulli B., Thiels E. Protein phosphatases and 2A are both required for long-term depression and associated dephosphorylation of cAMP response element binding protein in hippocampal area CA1 in vivo // *Hippocampus.* - 2011. – V.21, №10. – P.1093-1104.

262. Mayer B., Oberbauer R. Mitochondrial regulation of apoptosis // *News Physiol. Sci.* – 2003. – V.18. – P 89–94.
263. McConkey D., Orrenius S., Jondal M. Cellular signalling in programmed cell death (apoptosis) // *Immunol Today.* – 1990. – V.11, №4. – P.120-121.
264. McCullers D., Herman J. Adrenocorticosteroid receptor blockade and excitotoxic challenge regulate adrenocorticosteroid receptor mRNA levels in hippocampus // *J. Neurosci. Res.* – 2001. – V.64. – P.277–283.
265. McCullers D., Herman J. Mineralocorticoid receptors regulate bcl-2 and p53 mRNA expression in hippocampus // *Neuroreport.* – 1998. – V.9, №13. – P.3085-3089.
266. McEwen B., De Kloet E., Rostene W. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system // *Physiol Rev.* – 1986. – V.66. – P.1121– 1188.
267. McEwen B., Sapolsky R. Stress and cognitive function // *Curr Opin Neurobiol.* – 1995. – V.2. – P.205–216.
268. McIntosh L., Sapolsky R. Glucocorticoids may enhance oxygen radicalmediated neurotoxicity // *Neurotoxicology.* - 1996. – V.17. – P.873–882.
269. McKee S., Thompson C., Sabourin L., Hakim A. Regulation of expression of early growth response transcription factors in rat primary cortical neurons by extracellular ATP // *Brain Res.* - 2006. - V.1088. - P.1-11.
270. Meller R., Minami M., Cameron J., Mpey S., Chen D., Lan J., Henshall D., Simon R. CREB-mediated Bcl-2 protein expression after ischemic preconditioning // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2005. – V.25. – P.234–246.
271. Gonzalez G., Yamamoto K., Fischer W., Karr D., Menzel P., Biggs W., Vale W., Montminy M. A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP- regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence // *Nature.* - 1989. – V.337. – P.749–752.
272. Merlo E., Freudenthal R., Maldonado H., Romano A. Activation of the transcription factor NF-kappaB by retrieval is required for long-term memory reconsolidation // *Learn. Mem.* - 2005. – V.12. – P.23–29.
273. Miao B., Yin X., Pei D., Zhang Q., Zhang G. Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Akt1 activation // *J Biol Chem.* – 2005. – V.280. – P.21693–21699.
274. Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang H., Lin H., Lieberman D., Hoffman B., Reed J. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo // *Oncogene.* - 1994. – V.9. – P.1799–1805.
275. Miller B., Perez R., Shah A., Gonzales E., Park T., Gidday J. Cerebral protection by hypoxic preconditioning in a murine model of focal ischemia-reperfusion // *Neuroreport.* - 2001. - V.12. - P.1663-1669.

276. Min D., Mao X., Wu K., Cao Y., Guo F., Zhu S., Xie N., Wang L., Chen T., Shaw C., Cai J. Donepezil attenuates hippocampal neuronal damage and cognitive deficits after global cerebral ischemia in gerbils // *Neurosci Lett.* – 2012. – V.510. – P.29-33.
277. Minichiello L., Calella A. M., Medina D., Bonhoeffer T., Klein R., Korte M. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation // *Neuron.* – 2002. – V.36. – P.121–137.
278. Minichiello L., Klein R. TrkB and TrkC neurotrophin receptors cooperate in promoting survival of hippocampal and cerebellar granule neurons // *Genes Dev.* - 1996. – V.10. – P.2849–2858.
279. Monila C., Foulkes N., Lalli E., Sassone-Corsi P. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor // *Cell.* - 1993. – V.75. – P.875–886.
280. Montminy M. Transcriptional regulation by cyclic AMP // *Annu. Rev. Biochem.*- 1997. – V.66. – P.807–822.
281. Munck A., Mendel D., Smith L., Orti E. Glucocorticoid receptors and actions // *Am Rev Respir Dis.* – 1990. – V.141. – P.2–10.
282. Murry C., Jennings R., Reimer K. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // *Circulation.* - 1986. - V.74. - P.1124-1136.
283. Nagakura A., Takagi N., Takeo S. Impairment of cerebral cAMP-mediated signal transduction system and of spatial memory function after microsphere embolism in rats // *Neuroscience.* - 2002. – V.113. – P.519-528.
284. Nair S., Werkman T., Craig J., Finnell R., Joëls M., Eberwine J. Corticosteroid regulation of ion channel conductances and mRNA levels in individual hippocampal CA1 neurons // *J Neurosci.* – 1998. – V.18, №7. – P.2685-2696.
285. Nakajima T., Iwabuchi S., Miyazaki H., Okuma Y., Inanami O., Kuwabara M., Nomura Y., Kawahara K. Relationship between the activation of cyclic AMP responsive element binding protein and ischemic tolerance in the penumbra region of rat cerebral cortex // *Neurosci Lett.* - 2002. – V.331. – P.13–16.
286. Nakajima T., Iwabuchi S., Miyazaki H., Okuma Y., Kuwabara M., Nomura Y., Kawahara K. Preconditioning prevents ischemia-induced neuronal death through persistent Akt activation in the penumbra region of the rat brain // *J Vet Med Sci.* – 2004. – V.66. – P.521–527.
287. Nakatsuka H., Ohta S., Tanaka J., Toku K., Kumon Y., Maeda N., Sakanaka M., Sakaki S. Cytochrome c release from mitochondria to the cytosol was suppressed in the ischemia-tolerance-induced hippocampal CA1 region after 5-min forebrain ischemia in gerbils // *Neurosci Lett.* – 2000. – V.278. – P.53–56.
288. Narisawa-Saito M., Iwakura Y., Kawamura M., Araki K., Kozaki S., Takei N., Nawa H. Brain-derived neurotrophic factor regulates surface expression of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors by enhancing the N-ethylmaleimide-sensitive factor/GluR2 interaction in developing neocortical neurons // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V.277. – P.40901–40910.

289. Nelson D., Ihekweba A., Elliott M., Johnson J., Gibney C., Foreman B., Nelson G., See V., Horton C., Spiller D., Edwards S., McDowell H., Unitt J., Sullivan E., Grimley R., Benson N., Broomhead D., Kell D., White M. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression // *Science*. - 2004. - V.22. - P.704-708.
290. Nishio S., Chen Z., Yunoki M. Hypothermia induced ischemic tolerance // *Ann N Y Acad Sci*. - 1999. - V.890. - P.26-41.
291. Nitatori T., Sato N., Waguri S. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis // *J. Neurosci*. - 1995. - V.15. - P.1001-1011.
292. Noshita N., Sugawara T., Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Chan P. Manganese Superoxide Dismutase Affects Cytochrome c Release and Caspase-9 Activation After Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2001. – V.21, №5. – P.557-567.
293. Nozaki K., Nishimura M., Hashimoto N. Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia // *Mol Neurobiol*. - 2001. - V.23, №1. - P.1-19.
294. Obrenovitch T. Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia // *Physiol Rev*. – 2008. – V.88, №1. – P.211-247.
295. Oitzl M., de Kloet E. Selective corticoid-receptor antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning // *Behav. Neurosci*. – 1992. – V.106. – P.62–71.
296. Olijslagers J., de Kloet E., Elgersma Y., van Woerden G., Joëls M., Karst H. Rapid changes in hippocampal CA1 pyramidal cell function via pre- as well as postsynaptic membranemineralocorticoid receptors // *Eur J Neurosci*. – 2008. – V.27, №10. – P.2542-2550.
297. Orrenius S., McConkey D., Jones D., Nicotera P. Ca²⁺-activated mechanisms in toxicity and programmed cell death // *ISI Atlas Sci: Pharmacology*. - 1988. – V.2. – P.319-324.
298. Ouyang Y., Giffard R. Cellular neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia: Bcl-2 family proteins and protection of mitochondrial function // *Cell Calcium*. – 2004. – V.36. – P.303–311.
299. Ouyang Y., Giffard R. MicroRNAs affect BCL-2 family proteins in the setting of cerebral ischemia // *Neurochem Int*. – 2014. - V.77. – P.2-8.
300. Pacher P., Beckman J., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease // *Physiol Rev*. – 2007. – V.87. – P.315–424.
301. Park H., Poo M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function // *Nat Rev Neurosci*. – 2013. – V.14, №1. – P.7-23.
302. Partridge L., Swandulla D. Calcium-activated nonspecific cation channels // *Trends Neurosci*. - 1988. – V.11. – P.69-72.
303. Pascual-Le Tallec L., Kirsh O., Lecomte M., Viengchareun S., Zennaro M., Dejean A., Lombes M. Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: implication of

- small ubiquitin-related modifier 1 modification // *Mol Endocrinol.* - 2003. – V.17. – P.2529-2542.
304. Patapoutian A., Reichardt L. Trk receptors: mediators of neurotrophin action // *Curr Opin Neurobiol.* - 2001. – V.11. – P.272-280.
 305. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press. Sydney, Orlando, San Diego, New York, Austin, London, Montreal, Tokyo, Toronto. - 1986.
 306. Payne R., Akca O., Roewer N., Schurr A., Kehl F. Sevoflurane-induced preconditioning protects against cerebral ischemic neuronal damage in rats // *Brain Res.* - 2005. - V.1034. - P.147-152.
 307. Perkins N. Integrating cell-signalling pathways with NF-kB and IKK function // *Nat Rev Mol Cell Biol.* - 2007. - V.8. - P.49–62.
 308. Perkins N. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappaB pathway // *Oncogene.* - 2006. - V.25. - P.6717–6730.
 309. Peters T. Calcium in physiological and pathological cell function // *Eur Neurol.* – 1986. – V.25, №1. – P.27-44.
 310. Poo M. Neurotrophins as synaptic modulators // *Nat Rev Neurosci.* – 2001. – V.2. – P.24-32.
 311. Prass K., Sharff A., Ruscher K., Löwl D., Muselmann C., Victorov I., Kapinya K., Dirnagl U., Meisel A. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin // *Stroke.* – 2003. – V.34, №8. – P.1981-1986.
 312. Pratt W. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor // *J Biol Chem.* – 1993. – V.268, №29. – P.21455–21458.
 313. Pryce C. Postnatal ontogeny of expression of the corticosteroid receptor genes in mammalian brains: inter-species and intra-species differences // *Brain Res Rev.* – 2008. – V.57, №2. – P.596-605.
 314. Pugazhenth S., Nesterova A., Sable C., Heidenreich K., Boxer L., Heasley L., Reusch J. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein // *J Biol Chem.* – 2000. – V.275, №15. – P.10761-10766.
 315. Ratan R., Siddiq A., Smirnova N., Karpisheva K., Haskew-Layton R., McConoughey S., Langley B., Estevez A., Huerta P., Volpe B., Roy S., Sen C., Gazaryan I., Cho S., Fink M., LaManna J. Harnessing hypoxic adaptation to prevent, treat, and repair stroke // *J Mol Med.* – 2007. – V.85. – P.1331–1338.
 316. Ravati A., Ahlemeyer B., Becker A., Klumpp S., Krieglstein J. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB // *J. Neurochem.* - 2001. - V.78. - P.909-919.
 317. Ray A., Prefontaine K. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NFkappaB and the glucocorticoid receptor // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1994. – V.91. – P.752–756.
 318. Reichardt L. Neurotrophin-regulated signalling pathways // *Phil. Trans. R.Soc. B.* - 2006. V.361. – P.1545–1564.

319. Reul J., de Kloet E. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation // *Endocrinology*. – 1985. – V.117. – P.2505–2511.
320. Riccio A., Ahn S., Davenport C., Blendy J., Ginty D. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons // *Science*. – 1999. – V.286. – P.2358–2361.
321. Riedl S., Salvesen G. The apoptosome: signalling platform of cell death // *Nat.Rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – V.8. – P.405–413.
322. Roberson E., English J., Adams J., Selcher J., Kondratieck C., Sweatt J. The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus // *J. Neurosci.* – 1999. – V.19. – P.4337–4348.
323. Rogalska J. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in hippocampus: their impact on neurons survival and behavioral impairment after neonatal brain injury // *Vitam Horm.* – 2010. – V.82. – P.391–419.
324. Rose C., Blum R., Kafitz K., Kovalchuk Y., Konnerth A. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels // *Bioessays*. – 2004. – V.26. – P.1185–1194.
325. Rosenzweig H., Minami M., Lessov N. Endotoxin preconditioning protects against the cytotoxic effects of TNFalpha after stroke: a novel role for TNFalpha in LPS-ischemic tolerance // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2007. – V.27. – P.1663–1674.
326. Rybnikova E., Glushchenko 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 // *Brain Res.* – 2011. – V.1381. – P.66–77.
327. Rybnikova E., Glushchenko T., Tyulkova E., Baranova K., Samoilov M. Mild hypobaric hypoxia preconditioning up-regulates expression of transcription factors c-Fos and NGFI-A in rat neocortex and hippocampus // *Neurosci Res.* – 2009. – V.65, №4. – P.360–366.
328. Rybnikova E., Gluschenko T., Tulkova E., Churilova A., Jaroshevich O., Baranova K., Samoilov M. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappa B in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia // *J Neurochem.* – 2008. – V.106, № 3. – P.1450–1458.
329. Rybnikova E., Mironova V., Pivina S., Tulkova E., Ordyan N., Nalivaeva N., Turner A., Samoilov M. Involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the antidepressant-like effects of mild hypoxic preconditioning in rats // *Psychoneuroendocrinology*. – 2007a. – V.32, №7. – P.813–823.
330. Rybnikova E., Mironova V., Pivina S., Tulkova E., Ordyan N., Vataeva L., Vershinina E., Abritalin E., Kolchev A., Nalivaeva N., Turner A., Samoilov M. Antidepressant-like effects of mild hypoxia preconditioning in the learned helplessness model in rats // *Neurosci Lett.* – 2007b. – V.417, №3. – P.234–239.
331. Rybnikova E., Sitnik N., Gluschenko T., Tyulkova E., Samoilov M. The preconditioning modified

- neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats // *Brain Res.* - 2006. - V.1089. - P.195-202.
332. Rybnikova E., Tulkova E., Pelto-Huikko M., Samoilov M. Mild preconditioning hypoxia modifies nerve growth factor-induced gene A messenger RNA expression in the rat brain induced by severe hypoxia // *Neurosci. Lett.* - 2002. - V.329, №1. - P.49-52.
 333. Rybnikova E., Vataeva L., Tyulkova E., Gluschenko T., Otellin V., Pelto-Huikko M., Samoilov M. Preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and suppression of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia // *Beh. Brain Res.* - 2005. - V.160. - P.107-114.
 334. Sakamoto K., Huang B., Iwasaki K., Hailemariam K., Ninomiya-Tsuji J., Tsuji Y. Regulation of genotoxic stress response by homeodomain-interacting protein kinase 2 through phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein at serine // *Mol. Biol. Cell.* - 2010. - V.21. - P.2966-2974.
 335. Sakamoto N., Kogure K., Kato H., Ohtomo H. Disturbed Ca²⁺ homeostasis in the gerbil hippocampus following brief transient ischemia // *Brain Res.* - 1986. - V.364. - P.372-376.
 336. Salminen A., Liu P., Hsu C. Alteration of transcription factor binding activities in the ischemic rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1995. - V.212. - P.939-944.
 337. Sapolsky RM, Pulsinelli WA. Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. *Science*. 229 (4720): 1397-400. 1985.
 338. Sapolsky R. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders // *Arch. Gen. Psychiatry.* - 2010. - V.57. - P.925-930.
 339. Sarnico I., Lanzillotta A., Benarese M., Alghisi M., Baiguera C., Battistin L., Spano P., Pizzi M. NF-kappaB dimers in the regulation of neuronal survival. // *Int Rev Neurobiol.* - 2009. - V.85. - P.351-362.
 340. Sassone-Corsi P., Visvader J., Ferland L., Mellon P., Verma I. Induction of proto-oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway: characterization of a cAMP-responsive element // *Genes Dev.* - 198. - V.2. - P.1529-1538.
 341. Scartabelli T., Gerace E., Landucci E., Moroni F., Pellegrini-Giampietro D. Neuroprotection by group I mGlu receptors in a rat hippocampal slice model of cerebral ischemia is associated with the PI3K-Akt signaling pathway: a novel postconditioning strategy? // *Neuropharmacology.* - 2008. - V.55, №4. - P.509-516.
 342. Schaaf M., Cidlowski J. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance // *J Steroid Biochem Mol Biol.* - 2002. - V.83, №1-5. - P.37-48.
 343. Scharfman H., Goodman J., Macleod A., Phani S., Antonelli C., Croll S. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats // *Exp. Neurol.* - 2005. - V.192. - P.348-356.
 344. Scheidereit C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription // *Oncogene.* - 2006. - V.25, №51. - P.6685-6705.

345. Scheinman R., Gualberto A., Jewell C., Cidlowski J., Baldwin AS Jr. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptors // *Mol Cell Biol.* – 1995. – V.15, №2. – P.943–953.
346. Schramm M., Eimerl S., Costa E. Serum and depolarizing agents cause acute neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells: role of the glutamate receptor responsive to N-methyl-D-aspartate // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1990. – V.87, №3. – P.1193-1197.
347. Schwab S., Schwarz S., Spranger M., Keller E., Bertram M., Hacke W. Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle cerebral artery infarction // *Stroke.* - 1998. - V.29. - P.2461-2466.
348. Segal R., Greenberg M. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors // *Annu Rev Neurosci.* - 1996. – V.19. – P.463–489.
349. Semenov D., Samoilov M., Lazarewicz J. Calcium transients in the model of rapidly induced anoxic tolerance in rat cortical slices: involvement of NMDA receptors // *Neurosignals.* - 2002. - V.11, №6. - P.329-335.
350. Semenza G. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology // *Trends Mol Med.* – 2001. – V.7. – P.345–350.
351. Sgambato V., Vanhoutte P., Pages C., Rogard M., Hipskind R., Besson M., Caboche J. In vivo expression and regulation of Elk-1, a target of the extracellular-regulated kinase signaling pathway, in the adult rat brain // *J. Neurosci.* – 1998. – V.18. – P.214-226.
352. Shamloo M., Rytter A., Wieloch T. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning // *Neuroscience.* – 1999. – V.93. – P.81–88.
353. Sheng M., McFadden G., Greenberg M. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB // *Neuron.* - 1990. – V.4. – P.571–582.
354. Sheng M., Thompson M., Greenberg M. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulindependent kinases // *Science.* – 1991. – V.252. – P.1427–1430.
355. Shieh P., Hu S., Bobb K., Timmusk T., Ghosh A. Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression // *Neuron.* – 1998. – V.20. – P.727–740.
356. Shimizu S., Nagayama T., Jin K., Zhu L, Loeffert J., Watkins S., Graham S., Simon R. bcl-2 Antisense treatment prevents induction of tolerance to focal ischemia in the rat brain // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2001. – V.21. – P.233–243.
357. Shpargel K., Jalabi W., Jin Y., Dadabayev A., Penn M., Trapp B. Preconditioning paradigms and pathways in the brain // *Cleve Clin J Med.* - 2008. - V.75, № 2. - P.77-82.
358. Shukitt-Hale B., Kadar T., Marlowe B., Stillman M., Galli R., Levy A., Devine J., Lieberman H. Morphological alterations in the hippocampus following hypobaric hypoxia // *Hum Exp Toxicol.* – 1996. - V.15, №4. - P.312-319.

359. Siesjo B. Brain energy metabolism. - Chichester ets., 1978. - 607 p.
360. Siesjo B. Historical overview. Calcium, ischemia, and death of brain cells // *Ann NY Acad Sci.* - 1988. - V.522. - P.638-661.
361. Siesjö B., Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis // *J Cereb Blood Flow Metab.* - 1989. - V.9, №2. - P.127-140.
362. Siesjo B., Wieloch T. Cerebral metabolism in ischemia: neurochemical basis for therapy // *Br J Anaesth.* - 1985. - V.57. - P.47-62.
363. Silva A., Kogan J., Frankland P., Kida S. CREB and memory // *Annu Rev Neurosci.* - 1998. V.21. - P.127-148.
364. Simonova Z., Sterbova K., Brozek G., Komarek V., Sykova E. Postnatal hypobaric hypoxia in rats impairs water maze learning and the morphology of neurons and microglia in cortex and hippocampus // *Behav.Brain Res.* - 2003. - V.141, № 2. - P. 195-205.
365. Smith D., Toft D. Steroid receptors and their associated proteins // *Mol Endocrinol.* - 1993. - V.7. - P.4-11.
366. Sompol P., Ittarat W., Daosukho C., St Clair D. NF-kappaB-associated MnSOD induction protects against beta-amyloid-induced neuronal apoptosis // *J. Mol.Neurosci.* - 2006. - V.29. - P.279-288.
367. Song Y., Lee Y., Narasimhan P., Chan P. Reduced oxidative stress promotes NF-kappaB-mediated neuroprotective gene expression after transient focal cerebral ischemia:lymphocytotropic cytokines and antiapoptotic factors // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 2007. - V.27. - P.764-775.
368. Steiger H., Hangii D. Ischaemic preconditioning of the brain, mechanisms and applications // *Acta Neurochir, Wien.* - 2007. - V.149. - P.1-10.
369. Stenzel-Poore M., Stevens S., King J., Simon R. Preconditioning reprograms the response to ischemic injury and primes the emergence of unique endogenous neuroprotective phenotypes: a speculative synthesis // *Stroke.* - 2007. - V.38. - P.680-685.
370. St-Pierre J., Drori S., Uldry M., Silvaggi J., Rhee J., Jäger S., Handschin C., Zheng K., Lin J., Yang W., Simon D., Bachoo R., Spiegelman B. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators // *Cell.* - 2006. - V.127. - P.397-408.
371. Stroev S., Gluschenko T., Tjulkova E., Rybnikova E., Samoilov M., Pelto-Huikko M. The effect of preconditioning on the Cu, Zn superoxide dismutase expression and enzyme activity in rat brain at the early period after severe hypobaric hypoxia // *Neurosci Res.* - 2005. - V.53, №1. - P.39-47.
372. Stroev S., Gluschenko T., Tjulkova E., Spyrou G., Rybnikova E., Samoilov M., Pelto-Huikko M. Preconditioning enhances the expression of mitochondrial antioxidant thioredoxin-2 in the forebrain of rats exposed to severe hypobaric hypoxia // *J Neurosci Res.* - 2004a. - V.78, №4. - P.563-569.
373. Stroev S., Tjulkova E., Gluschenko T., Rybnikova E., Samoilov M., Pelto-Huikko M. The

- augmentation of brain thioredoxin-1 expression after severe hypobaric hypoxia by the preconditioning in rats // *Neurosci Lett.* – 2004b. – V.370, №2-3. – P.224-229.
374. Sugawara T., Noshita N., Lewén A., Gasche Y., Ferrand-Drake M., Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Chan P. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation // *J Neurosci.* – 2002. – V.22, №1. – P.209-217.
375. Sugiura S., Kitagawa K., Omura-Matsuoka E., Sasaki T., Tanaka S., Yagita Y., Matsushita K., Storm D., Hori M. CRE-mediated gene transcription in the peri-infarct area after focal cerebral ischemia in mice // *J. Neurosci. Res.* – 2004. – V.75. – P.401-407.
376. Sun P., Enslen H., Myung P., Maurer R. Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity // *Genes Dev.* – 1994. – V.8. – P.2527–2539.
377. Susin S., Zamzami N., Castedo M., Daugas E., Wang H., Geley S., Fassy F., Reed J., Kroemer G. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis // *J Exp Med.* – 1997. – V.186, №1. – P.25-37.
378. Suzuki A., Fukushima H., Mukawa T., Toyoda H., Wu L., Zhao M., Xu H., Shang Y., Endoh K., Iwamoto T., Mamiya N., Okano E., Hasegawa S., Mercaldo V., Zhang Y., Maeda R., Ohta M., Josselyn S., Zhuo M., Kida S. Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory // *J Neurosci.* – 2011. – V.31. – P.8786-8802.
379. Swan J., Meldrum B. Protection by NMDA antagonists against selective cell loss following transient ischemia // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1990. – V.10. – P.343-351.
380. Sweatt J. The neuronal MAP kinase cascade: A biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory // *J Neurochem.* – 2001. – V.76. – P.1–10.
381. Taie S., Ono J., Iwanaga Y. Hypoxia-inducible factor-1 alpha has a key role in hypoxic preconditioning // *J. Clin. Neurosci.* – 2009. – V.16, №8. – P.1056-1060.
382. Takeda A., Onodera H., Sugimoto A., Kogure K., Obinata M., Shibahara S. Coordinated expression of messenger RNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia // *Neuroscience.* – 1993. – V.55. – P.23–31.
383. Tamatani M., Mitsuda N., Matsuzaki H., Okado H., Miyake S., Vitek M., Yamaguchi A., Tohyama M. A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of nuclear factor-kappaB and Bcl-2 // *J Neurochem.* – 2000. – V.75, №2. – P.683-693.
384. Tan Y., Zhang S., Hoffmann T., Bading H. Increasing levels of wild-type CREB up-regulates several activity-regulated inhibitor of death (AID) genes and promotes neuronal survival // *BMC Neurosci.* – 2012. – V.13. – P.48.
385. Tanaka H., Yokota H., Jover T., Cappuccio I., Calderone A., Simionescu M., Bennett M., Zukin R.

- Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation // *J Neurosci.* – 2004. – V.24. – P.2750–2759.
386. Tanaka K., Nagata E., Suzuki S., Dembo T., Nogawa S., Fukuuchi Y. Immunohistochemical analysis of cyclic AMP response element binding protein phosphorylation in focal cerebral ischemia in rats // *Brain Res.* - 1999. – V.818. – P.520–526.
387. Tanaka K., Nogawa S., Ito D., Suzuki S., Dembo T., Kosakai A., Fukuuchi Y. Activated phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein is associated with preservation of striatal neurons after focal cerebral ischemia in the rat // *Neuroscience.* – 2000a. – V.100. – P.345–354.
388. Tao X., Finkbeiner S., Arnold D., Shaywitz A., Greenberg M. Ca^{2+} influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism // *Neuron.* 1998. – V.20. – P.709–726.
389. Tasaki K., Ruetzler C., Ohtsuki T., Martin D., Nawashiro H., Hallenbeck J. Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats // *Brain Res.* - 1997. - V.748. - P.267–270.
390. Taylor C. Receptor regulation of calcium entry // *Trends Pharmacol Sci.* - 1987. – V.8. – P.79–80.
391. Terasaki Y., Sasaki T., Yagita Y., Okazaki S., Sugiyama Y., Oyama N., Omura-Matsuoka E., Sakoda S., Kitagawa K. Activation of NR2A receptors induces ischemic tolerance through CREB signaling // *J Cereb Blood Flow Metab.* - 2010. V.30. – P.1441–1449.
392. Thayer S., Murphy S., Miller R. Widespread distribution of dihydropyridine-sensitive calcium channels in the central nervous system // *Mol Pharmacol.* - 1986. – V.30. – P.505–509.
393. Thiels E., Norman E., Barrionuevo G., Klann E. Transient and persistent increases in protein phosphatase activity during long-term depression in the adult hippocampus in vivo // *Neuroscience.* – 1998. – V.86. – P.1023–1029.
394. Tirard M., Almeida O. F., Hutzler P., Melchior F., Michaelidis T. Sumoylation and proteasomal activity determine the transactivation properties of the mineralocorticoid receptor // *Mol Cell Endocrinol.* - 2007. – V.268. – P.20–29.
395. Tronche F., Kellendonk C., Kretz O., Gass P., Anlag K., Orban P., Bock R., Klein R., Schutz G. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety // *Nat Genet.* - 1999. – V.23. – P.99–103.
396. Tucker K., Fadool D. Neurotrophin modulation of voltage-gated potassium channels in rat through TrkB receptors is time and sensory experience dependent // *J. Physiol.* – 2002. – V.542. – P.413–429.
397. Van Eekelen J., Jiang W., De Kloet E., Bohn M. Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus // *J Neurosci Res.* – 1998. – V.21. – P.88–94.
398. van Rijen P., Verheul H., van Echteld C., Balazs R., Lewis P., Nasim M., Tulleken C. Effects of dextromethorphan on rat brain during ischemia and reperfusion assessed by magnetic resonance

- spectroscopy // *Stroke*. – 1991. – V.22, №3. – P.343-350.
399. Vermeulen L., DeWilde G., Van Damme P., Vanden Berghe W., Haegeman G. Transcriptional activation of the NF- κ B p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) // *EMBO J.* - 2003. - V.22. - P.1313–1324.
 400. Viosca J., Lopez de Armentia M., Jancic D., Barco A. Enhanced CREB-dependent gene expression increases the excitability of neurons in the basal amygdala and primes the consolidation of contextual and cued fear memory // *Learn. Mem.* – 2009. – V.16. – P.193–197.
 401. Walton M., Dragunow I. Is CREB a key to neuronal survival? // *Trends Neurosci.* – 2000. – V.23, №2. – P.48-53.
 402. Walton M., Sirimanne E., Williams C., Gluckman P., Dragunow M. The role of the cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) in hypoxic-ischemic brain damage and repair // *Mol. Brain Res.* - 1996. – V.43. – P.21-29.
 403. Walton M., Woodgate A., Muravlev A., Xu R., During M., Dragunow M. CREB phosphorylation promotes nerve cell survival // *J. Neurochem.* – 1999. – V.73. – P.1836–1842.
 404. Wand G. The anxious amygdala: CREB signaling and predisposition to anxiety and alcoholism // *J. Clin. Invest.* - 2005. – V.115. – P.2697–2699.
 405. Wang L., Traystman R., Murphy S. Inhalational anesthetics as preconditioning agents in ischemic brain // *Curr Opin Pharmacol.* - 2008. - V.8. - P.104-110.
 406. Wattenberg B., Lithgow T. Targeting of C-terminal (tail)-anchored proteins: understanding how cytoplasmic activities are anchored to intracellular membranes // *Traffic*. - 2001. – V.2. – P.66–71.
 407. West A., Griffith E., Greenberg M. Regulation of transcription factors by neuronal activity // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2002. – V.3. – P.921–931.
 408. White J., Lin H., Davis F., Davis P., Tsan M. Differential induction of tumor necrosis factor alpha and manganese superoxide dismutase by endotoxin in human monocytes: role of protein tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and nuclear factor kappaB // *J. Cell Physiol.* - 2000. – V.182. – P.381-389.
 409. Wingender E. Classification of eukaryotic transcription factors // *Mol Biol (Mosk)*. - 1997. – V.31, №4. – P.584-600.
 410. Wingender E., Dietze P., Karas H., Knüppel R. TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites // *Nucleic Acids Res.* -1996. – V.24, №1. - P.238-241.
 411. Woolley C., Gould E., Sakai R., Spencer R., McEwen B. Effects of aldosterone or RU28362 treatment on adrenalectomy-induced cell death in the dentate gyrus of the adult rat // *Brain Res.* - 1991. – V.554. – P.312–315.
 412. Wu C., Fujihara H., Yao J., Qi S., Li H., Shimoji K., Baba H. Different expression patterns of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax proteins after sublethal forebrain ischemia in C57Black/Crj6 mouse striatum // *Stroke*. -

2003. - V.34, №7. - P.1803-1808.

413. Wu X., McMurray C. Calmodulin kinase II attenuation of gene transcription by preventing cAMP response element-binding protein (CREB) dimerization and binding of the CREB-binding protein // *J. Biol. Chem.* - 2001. – V.276. – P.1735–1741.
414. Xiong L., Zhu Z., Dong H., Hu W., Hou L., Chen S. Hyperbaric oxygen preconditioning induces neuroprotection against ischemia in transient not permanent middle cerebral artery occlusion rat model // *Chin Med J (Engl)*. - 2000. - V.113. - P.836-839.
415. Xu D., Crocker S., Doucet J., St-Jean M., Tamai K., Hakim A., Ikeda J., Liston P., Thompson C., Korneluk R., MacKenzie A., Robertson G. Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischemic damage in the rat hippocampus // *Nat. Med.* - 1997. - V.3. - P.997–1004.
416. Xuan Y., Tang X., Banerjee S., Takano H., Li R., Han H., Qiu Y., Li J., Bolli R. Nuclear factor-kappaB plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits // *Circ. Res.* - 1999. – V.84. – P.1095-1109.
417. Yano S., Morioka M., Fukunaga K., Kawano T., Hara T., Kai Y., Hamada J., Miyamoto E., Ushio Y. Activation of Akt/protein kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2001. – V.21. – P.351–360.
418. Ying S., Futter M., Rosenblum K., Webber M., Hunt S., Bliss T., Bramham C. Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: Requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis // *J Neurosci.* – 2002. – V.22. – P.1532–1540.
419. Yu S., Wang H., Poitras M., Coombs C., Bowers W., Federoff H., Poirier G., Dawson T., Dawson V. Mediation of poly(ADPribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor // *Science.* – 2002. – V.297. – P.259–263.
420. Yunoki M., Nishio S., Ukita N., Anzivino M., Lee K. Characteristics of hypothermic preconditioning influencing the induction of delayed ischemic tolerance // *J Neurosurg.* - 2002. - V.97. - P.650-657.
421. Zhang S., Buchthal B., Lau D., Hayer S., Dick O., Schwaninger M., Veltkamp R., Zou M., Weiss U., Bading H. A signaling cascade of nuclear calcium-CREB-ATF3 activated by synaptic NMDA receptors defines a gene repression module that protects against extrasynaptic NMDA receptor-induced neuronal cell death and ischemic brain damage // *J Neurosci.* – 2011. – V.31. – P.4978-4990.
422. Zhang Q., Tian H., Fu X., Zhang G. Delayed activation and regulation of MKK7 in hippocampal CA1 region following global cerebral ischemia in rats // *Life Sci.* - 2003. - V.21, №74. - P.37-45.
423. Zhang Y., Park T., Gidday J. Hypoxic preconditioning protects human brain endothelium from ischemic apoptosis by Akt-dependent survivin activation // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2007. – V.292. – P.2573–2581.
424. Zheng W., Quirion R. Comparative signaling pathways of insulin-like growth factor-1 and brain-

derived neurotrophic factor in hippocampal neurons and the role of the PI3 kinase pathway in cell survival // J. Neurochem. – 2004. – V.89. – P.844–852.

425. Zhong H., May M., Jimi E., Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF- κ B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1 // Mol Cell. - 2002. - V.9. - P.625–636.
426. Zhou J., Cidlowski J. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses // Steroids. – 2005. – V.70, №5–7. – P.407–417.
427. Zilliacus J., Wright A., Carlstedt-Duke J., Gustafsson J. Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors // Mol Endocrinol. – 1995. – V.9. – P.389–400.