

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ
им. И.П. ПАВЛОВА РАН

На правах рукописи

**ТЮЛЬКОВА
ЕКАТЕРИНА ИОСИФОВНА**

**МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ
СОСТОЯНИЙ МОЗГА В ОТВЕТ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ
ГИПОКСИИ В ПРЕНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург 2015

Работа выполнена в лаборатории регуляции функций нейронов мозга Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П.Павлова Российской академии наук

Научный консультант: **Самойлов Михаил Олегович,**

доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Вётош Александр Николаевич, доктор биологических наук, профессор кафедры токсикологии, экстремальной и водолазной медицины ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

Журавин Игорь Александрович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией сравнительной физиологии и патологии ЦНС ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Лукьянова Людмила Дмитриевна, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, заведующая отделом общей патофизиологии, заведующая лабораторией биоэнергетики и проблем гипоксии ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАН, Москва

Ведущее учреждение: ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины", Санкт-Петербург

Защита состоится «___» _____ 2015 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций при Институте физиологии им. И.П.Павлова РАН (Д 002.020.01). 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института физиологии им. И.П.Павлова РАН.

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

доктор биологических наук

Н.Э. Ордян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Выяснение механизмов влияния неблагоприятных экзогенных и эндогенных факторов среды на организм – одна из центральных проблем современной биологии и медицины. Особенно опасно действие неблагоприятных факторов в раннем онтогенезе – в период пренатального и раннего постнатального развития. Структурные и функциональные изменения, возникающие вследствие воздействия на развивающийся организм различных повреждающих факторов, нередко бывают стойкими или носят необратимый характер. По наблюдениям клиницистов, особое место среди факторов риска нарушений развития в пренатальном онтогенезе занимает гипоксия, являющаяся одним из самых часто встречающихся осложнений при беременности и родах. Внутриутробная гипоксия и асфиксия новорожденного, во многом определяющие уровень мертворождаемости, неонатальной и младенческой смертности, является наиболее актуальной проблемой акушерства и перинатологии. Значимость данной проблемы обусловлена не только существенными перинатальными потерями, но и тем, что гипоксия может оказывать значительное влияние на физическое, эмоциональное и когнитивное развитие ребенка и являться причиной возникновения различных нарушений и патологических состояний, которые могут впоследствии привести к формированию инвалидности и снижению качества жизни в целом. В структуре заболеваемости новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, одно из важных мест занимает перинатальное поражение мозга, что связано с высокой распространенностью данной патологии и повышенной значимостью для последующего нервно-психического развития ребенка. По данным Комитета экспертов Всемирной Организации Здравоохранения у 10% детей регистрируются нервно-психические заболевания, 70-80% которых связаны с перинатальными поражениями мозга. От 46% до 60% случаев перинатальных поражений центральной нервной системы у детей имеют гипоксически-ишемическую природу.

Последствия пренатальной гипоксии являются необратимыми, могут прослеживаться в течение длительного времени или в отдаленные периоды после воздействия, способствуя возникновению многих заболеваний. В частности, увеличивается риск возникновения психических и нейродегенеративных заболеваний на более поздних этапах развития (Пальчик и Шабалов, 2001; Boksa, 2004). Гипоксия плода зависит от многих причин, в первую очередь от заболеваний матери, пороков развития плода и патологий плаценты. Особое место в структуре причин, вызывающих пренатальную гипоксию занимает действие на организм матери внешних неблагоприятных факторов (Arbeille et al., 1999; Nyakas et al., 1996). Диагностика и, в особенности, лечение гипоксии плода сопряжены со значи-

тельными трудностями, что, прежде всего, обусловлено недостаточным пониманием механизмов влияния гипоксии на развивающийся организм. Эта и многие другие проблемы, связанные с действием гипоксии в раннем онтогенезе, требуют на современном этапе особыго внимания.

За последние годы появилось немало обзоров, в которых детально анализируются нарушения нормальной деятельности мозга человека и животных, подвергавшихся действию гипоксии, после того как они достигают зрелого возраста. Установлено, что в условиях недостатка кислорода первым страдает энергетический обмен клеток мозга, что является причиной развития ацидоза, окислительного стресса, повышения активности возбуждающей глутаматной системы. Наряду с этим наблюдается так же активация эндогенных фосфолипаз и распад мембранных фосфолипидов, увеличение текучести мембран и их проницаемости, вследствие чего клетка теряет ионы K^+ и перегружается ионами Ca^{2+} , Na^+ (Самойлов, 1999; Lipton, 1999; Nyakas et al., 1996). В лаборатории регуляции функций нейронов мозга Института физиологии им. И.П. Павлова РАН с применением модели гипобарической гипоксии убедительно показано, что тяжелая гипоксия приводит к развитию патологических состояний центральной нервной системы взрослых животных, которые проявляются в изменении поведения и способности к обучению этих животных (Ватаева и др., 2004 а, б; Ватаева и др., 2005; Самойлов и др., 2001; Rybnikova et al., 2005). Эти нарушения обусловлены изменениями на молекулярно-клеточном уровне, в том числе, активности основных систем внутриклеточной регуляции – кальциевой, фосфоинозидной и циклического АМФ, а также модификации глутаматергической сигнальной трансдукции в структурах мозга наиболее чувствительных к кислородному голоданию – гиппокампе и неокортексе (Самойлов, 1999, Самойлов и др. 2001, Самойлов и др. 2000.). Тяжелая гипобарическая гипоксия значительно модифицирует экспрессию ранних генов, транскрипционных факторов, про- и антиапоптотических факторов, пептидных антиоксидантов, уровень перекисного окисления липидов, нейроэндокринную регуляцию в гиппокампе и неокортексе взрослых крыс (Самойлов и др., 2005, 2007; Самойлов и Рыбникова, 2012; Строев и Самойлов, 2004; Rybnikova et al., 2005, 2006, 2007, 2009, 2011). Однако прямой перенос этих данных на изменения указанных процессов при действии гипоксии на мозг в раннем онтогенезе не корректен.

Эффекты пренатальной гипоксии не всегда соотносятся со степенью ее тяжести. Первостепенное значение имеют сроки онтогенеза, в которые произошло воздействие. В течение пренатального и раннего постнатального онтогенеза выделяют несколько критических периодов, когда организм и, в особенности, мозг становятся особенно восприим-

чивыми к неблагоприятным воздействиям, а негативные последствия таких воздействий наиболее значимы (Кассиль и др., 2000; Отеллин, 2003; Golan and Huleihel, 2006; Rice and Barone, 2000). Нарушения, обусловленные действием повреждающих факторов в эти критические периоды раннего онтогенеза, могут приводить к возникновению не только грубых дефектов развития (врожденные аномалии – уродства), но и многочисленных функциональных расстройств в деятельности клеток, органов и систем всего организма. Если воздействия происходят в период раннего пренатального онтогенеза (активного органогенеза), то оно может приводить к увеличению частоты хромосомных аберраций в клетках тканей организма, а также появлению таких пороков развития, как аненцефалия, ацефалия, анофтальмия, заячья пасть, фокомелия, амелия, атрезия ротового отверстия. (Аршавский 1982; Дунаева и др., 2008; Светлов, 1996; Хожай, 2008; Rosenmund et al., 1995). В тоже время, появление функциональных нарушений связывают с неблагоприятными воздействиями на более поздних сроках пренатального онтогенеза (Аршавский 1982; Ватаева и др. 2004, 2005; Дубровская и Журавин, 2008; Журавин и др., 2003; Отеллин и др., 2011, 2012; Rosenmund et al., 1995; Vataeva et al., 2007, 2008).

Несмотря на то, что к настоящему времени накоплен достаточно большой массив данных по эффектам и механизмам гипоксических воздействий в раннем онтогенезе, концептуальное осмысление этих сведений, зачастую противоречивых, затруднено в связи с тем, что эти данные получены в разнообразных моделях ишемии и гипоксии, применяемых в различные периоды пре- и перинатального онтогенеза. В основном исследуются влияния ишемической и/или нормобарической гипоксии в течение всего периода беременности или тестируются отдельные (точечные) сроки, и, как уже отмечалось, полученные в этих работах данные не всегда согласуются. Требуется последовательное и комплексное изучение эффектов и механизмов пренатальной гипоксии в одной модели на всех уровнях, включая нарушения поведения, нейроэндокринную регуляцию и процессы на молекулярно-клеточном уровне, в том числе, состояние внутриклеточной сигнальной трансдукции, соотношение про- и антиоксидантных систем мозга. В качестве удобной экспериментальной модели для подобного рода исследований служит гипобарическая (высотная) гипоксия, создаваемая в барокамере, поскольку она является физиологически адекватным воздействием (встречается в естественных условиях при подъеме на высоту), легко контролируется и дозируется, что создает возможности для ее применения в различных режимах.

Гипоксия опосредует свое влияние на плод через организм матери и плаценту. При остром недостатке кислорода запускается целый каскад эффектов, включающих выброс

стрессовых гормонов в кровь матери и структурно-функциональные изменения в материнской и фетальной частях плаценты. В какой степени наблюдающиеся при повреждающих гипоксических/ишемических воздействиях во время беременности изменения обусловлены собственно гипоксическим фактором, а в какой - неспецифической стрессовой реакцией матери, до сих пор остается неясным. Для того, чтобы прояснить этот вопрос целесообразно сопоставить эффекты гипоксии и пренатального стресса, общепринятой моделью которого служит введение беременным самкам синтетического глюкокортикоида дексаметазона, который легко проходит через гистогематические барьеры (в том числе, через гемато-энцефалический и плацентарный) и таким образом позволяет моделировать воздействие на плод выброса глюкокортикоидных гормонов при стрессе у матери. Это препарат длительного действия, не поддающийся инактивирующему действию ферментных систем плаценты и оказывающий продолжительное воздействие на органы и ткани-мишени (Matthews et al., 2002). Изучение эффектов дексаметазона на пренатальное развитие актуально еще и по той причине, что этот глюкокортикоид интенсивно применяется в медицинской практике, в том числе у беременных женщин, в частности, при угрозе прерывания беременности (Matthews et al., 2002; Crowther and Harding; 2003). В то же время у специалистов нет единого мнения относительно безопасности применения глюкокортикоидных препаратов при беременности. В экспериментах на животных показано, что введение беременным самкам глюкокортикоидов стимулирует созревание сурфактанта и ускоряет созревание легких плода, что может рассматриваться в качестве адаптивной реакции, направленной на подготовку плода к преждевременным родам при попадании матери в условия стресса (Dammann and Matthews, 2001). Однако в целом ряде исследований было обнаружено, что глюкокортикоиды могут отрицательно влиять на рост и развитие плода животных, особенно неблагоприятное действие они оказывают на головной мозг и нервную систему (Dygallo et al., 1999; Wan S. et al, 2005).

Цели и задачи исследования. Целью настоящего исследования явилось изучение комплекса физиологических реакций и молекулярных механизмов, индуцируемых пренатальным воздействием тяжелой гипобарической гипоксии.

В основные задачи работы входило:

1. Изучение последствий воздействия гипобарической гипоксии в начале и конце третьей недели пренатального онтогенеза на соматическое и сенсомоторное развитие крыс в раннем постнатальном онтогенезе, на двигательное, эмоциональное, исследовательское поведение и способность к обучению взрослых крыс. Выявление сходств и

различий в эффектах действия тяжелой гипобарической гипоксии и введения дексаметазона в различные сроки пренатального онтогенеза крыс.

2. Выявление гормональных и внутриклеточных процессов, участвующих в механизмах формирования реакций мозга при воздействии тяжелой гипобарической гипоксии на различных этапах пренатального онтогенеза крысы, а именно: изучение особенности функционирования гипоталамо-гипофизарно адренокортикальной системы, активности внутриклеточных сигнальных систем (кальциевой и фосфоинозитидной), соотношения про- и антиоксидантных систем в мозге крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза. Проведение сравнительного анализа влияния введения дексаметазона в пренатальном онтогенезе в те же сроки на модификацию функционирования нейроэндокринной системы и активности фосфоинозитидной системы мозга взрослых крыс.

Методология исследования. В работе применен комплексный подход к изучению нарушений развития мозга вследствие перенесённых в пренатальном периоде развития повреждающих факторов. Использована батарея тестов для оценки изменений соматического и сенсомоторного развития. Применены различные физиологические методы для оценки нарушений на поведенческом уровне и способности к обучению. Наряду с этим использован ряд современных биохимических и иммуноцитохимических методов для выяснения молекулярно-клеточных механизмов, обуславливающих эти нарушения.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Тяжелая гипобарическая гипоксия в начале, но не в конце, третьей недели пренатального онтогенеза оказывает выраженное долговременное влияние на двигательное, эмоциональное, исследовательское поведение и способность к обучению у взрослых крыс. Введение дексаметазона также приводит к изменениям способности к обучению взрослых животных, но в отличие от гипоксического воздействия вызывает также изменения эмоционального поведения крыс, степень и направленность которых зависят от срока введения.

2. В формирование повреждающих эффектов гипобарической гипоксии в начале и конце третьей недели пренатального онтогенеза вовлекаются гормон-зависимые механизмы регуляции функций мозга. Изменения поведения и способности к обучению крыс, подвергшихся воздействию гипоксии или дексаметазона в течение 3-ей недели пренатального онтогенеза, коррелируют с устойчивыми модификациями экспрессии глюко- и минералокортикоидных рецепторов в гиппокампе и неокортике этих животных.

3. Тяжелая гипобарическая гипоксия, предъявляемая в начале третьей недели пренатального онтогенеза, приводит к длительной (в течение 3 месяцев) активации фос-

фоинозитидной системы внутриклеточной сигнализации. Гипоксия, предъявляемая крысам в начале третьей недели пренатального онтогенеза, вызывает модификацию активности кальциевой внутриклеточной регуляторной системы. Введение дексаметазона в пренатальном онтогенезе активирует фосфоинозитидную систему мозга крыс, вне зависимости в начале или конце третьей недели применяли воздействие.

4. Тяжелая гипобарическая гипоксия, предъявляемая в начале, но не в конце третьей недели пренатального онтогенеза, приводит к изменению соотношения про- и антиоксидантных систем в мозге крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза.

5. Длительные изменения функционирования гипофизарно-адренокортиkalной системы, активности внутриклеточных сигнальных систем (кальциевой и фосфоинозитидной), соотношения про- и антиоксидантных систем в мозге крыс приводят к развитию патологических состояний центральной нервной системы.

Научная новизна исследования. Установлено, что тяжелая гипобарическая гипоксия в пренатальном периоде развития приводят к устойчивым нарушениям двигательного, эмоционального, исследовательского поведения и способности к обучению, в основе которых лежат структурно-функциональные нарушения в центральной нервной системе, проявляющиеся на молекулярно-клеточном уровне. При этом впервые выявлены сходство и различия в эффектах действия тяжелой гипобарической гипоксии и введения синтетического глюкокортикоидного гормона дексаметазона, предъявляемых в различные сроки пренатального онтогенеза крыс.

Установлено, что отдаленные последствия влияния гипобарической гипоксии, проявляющиеся в нарушении способности к обучению, изменении двигательной активности у крыс и сопутствующих структурно-функциональные изменениях в центральной нервной системе более выражены, если ее воздействие приходится на начало третьей недели гестации, возрастной интервал, включающий период, когда происходит активный нейрогенез в различных областях развивающегося мозга, включая неокортекс и гиппокамп. Дексаметазон также вызывает изменения поведения и способности к обучению, но их направленность отличается от вызываемых гипоксией и носит различный характер в зависимости от сроков его введения - в первой или во второй половине последней недели пренатального периода развития.

Впервые проведен экспериментальный сравнительный анализ особенностей нарушения внутриклеточных молекулярных и гормональных механизмов мозга крыс (изменения активности ГГАС, характера иммунореактивности кортикостероидных рецепторов в гиппокампе и неокортексе, активности фосфоинозитидной и кальциевой системы внутри-

клеточной регуляции, соотношения про- и антиоксидантных систем мозга крыс), вызываемых воздействием тяжелой гипоксии в последнем триместре беременности или введением в те же сроки эндогенного гормона – дексаметазона. Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что отклонения в поведении взрослых животных, подвергавшихся действию гипоксии впренатальном периоде, не связаны с грубыми структурными повреждениями головного мозга. Они скорее обусловлены нарушениями процессов, протекающих на молекулярно-клеточном уровне в различных образованиях мозга крыс, чувствительных к действию гипоксии (гиппокампе и неокортике).

Теоретическая и практическая значимость работы. Работа посвящена исследованию одной из фундаментальных проблем нейробиологии, связанной с изучением патологических изменений деятельности мозга, вызванных воздействием тяжелой гипоксии впренатальном периоде развития. Совокупность полученных сведений о молекулярных процессах, лежащих в основе изменений поведения и способности к обучению крыс, вследствие перенесенной пренатальной гипоксии, вносит существенный вклад в развитие современных представлений о механизмах повреждения незрелого мозга. Сопоставление данных о влиянии гипоксии и введения дексаметазона в различные сроки пренатального онтогенеза обнаруживает как сходства, так и различия последствий этих воздействий у взрослых животных.

Полученные приоритетные данные вносят существенный вклад в понимание механизмов нарушения функций мозга, вызываемых тяжелой гипоксией впренатальном периоде.

Высокая практическая значимость работы определяется клинической необходимостью разработки новых способов диагностики пренатальных патологий и поиску эффективных путей повышения общей резистентности организма. Полученные результаты на молекулярно-клеточном уровне могут быть использованы при создании нового поколения эффективных фармакологических препаратов, оказывающих направленное действие на ключевые звенья повреждающих механизмов, связанных с гиперактивацией глутаматергической сигнальной трансдукции, опосредуемой кальциевой и фосфоинозитидной системами, а также с нарушениями нейроэндокринной регуляции.

Апробация результатов. Материалы исследования были представлены на: XIX Съезде Физиологического общества им. И.П.Павлова Екатеринбург. Октябрь 2004; На Российско-Польском симпозиуме в рамках Дней Российской науки в республике Польша. “Нейробиологические и нейрофизиологические исследования в медицине”, Варшава 9-14.10.2004; I-ой Конференции «Нейрохимия: Фундаментальные и прикладные аспекты»

Москва, 14-16.03.2005; IV Российской конференции «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция. Москва. 12-14 октября 2005; на международной конференции «Механизмы адаптивного поведения». СПб. 7-9 декабря 2005; 7 International Congress of The Polish Neuroscience Society - 7-10.09.2005; XX Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова, Москва, 4 – 8 июня 2007; Конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» Россия, Санкт-Петербург 10–12 сентября 2008 г; Пятой Российской конференции «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция». Москва. 9-11 октября 2008; 4th ESN Conference on Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders. July 11-14, 2009. Leipzig. Germany; XXI съезде физиологического общества им. И.П.Павлова. Калуга. 19-25 сентября 2010 г; Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 85-летию Института физиологии им. И.П.Павлова РАН «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды». (СПб, декабрь 2010); VI-ой Российской конференции с международным участием «ГИПОКСИЯ: механизмы, адаптация, коррекция». Москва, 11-13 октября 2011г.; 2-ой Международной научной конференции «Высокогорная гипоксия и геном». Россия, Кабардино-Балкария, Терскол, 14-17 августа 2012 г.; международной конференции «Фундаментальные науки и современная медицина». Беларусь, Минск, 25-26 октября 2012 г.; XXII Съезде физиологического общества им. И.П.Павлова (г. Волгоград. 16-20 сентября); Всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (24–26 июня 2014 г., Санкт-Петербург–Колтуши).; Международном симпозиуме «Биохимия – основа наук о жизни», Казань, 21-23.11.13; IV Съезде физиологов СНГ Сочи –Дагомыс, Россия, 8–12 октября 2014.; Всероссийской конференции с международным участием «Фундаментальные проблемы нейронаук: функциональная асимметрия, нейропластичность и нейродегенерация». Москва Научный центр неврологии РАМН 18–19 декабря 2014 года.

Личный вклад диссертанта. Все результаты, представленные на защиту, получены либо лично диссертантом, либо при его непосредственном участии. Ведущим направлением экспериментальной работы автора явилось изучение процессов на молекулярно-клеточном уровне - активности ГГАС, иммунореактивности кортикостероидных рецепторов в гиппокампе и неокортексе, активности фосфоинозитидной и кальциевой системы внутриклеточной регуляции, соотношения про- и антиоксидантных систем мозга крыс, модификации которых отражаются на изменениях характера поведения и способности к обучению животных. Автор выполнял постановку целей и задач исследований, разработку

экспериментальных моделей, проведение экспериментов, обработку и интерпретацию результатов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 106 научных работ, включая 33 статьи в рецензируемых журналах.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, трех глав результатов собственных исследований, выводов и библиографии. Диссертация изложена на 283 страницах печатного текста, иллюстрирована 64 рисунками и 11 таблицами. Список литературы включает 101 русских и 577 иностранных источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Опыты проведены на самцах и самках белых крыс линии Вистар в возрасте 3, 14-15 и 80-90 суток. Животные были рождены интактными самками и самками, подвергавшимися воздействию гипоксии или введению дексаметазона на 11-13-е, 14-16-е или 17-19-е сутки беременности. Крысят отлучали от кормившей их матери в возрасте 30 дней. После отлучения самцы и самки находились в разных клетках размером 60×30×20 по 6 животных в каждой. В течение всего периода проведения экспериментов крысы содержались при режиме свет/темнота 12:12ч, температуре 20-23°C и при постоянном доступе к воде и пище.

При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/EEC) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института Физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Для создания тяжелой гипоксии беременных самок помещали в барокамеру проточного типа при температуре от 20° до 25°C и ступенчато понижали давление до 180 мм рт. ст. (продолжительность воздействия – по 3 ч в течение 3-х суток). Смертность животных в барокамере составляла 15%. Синтетический гормон дексаметазон вводили внутрьбрюшинно в дозе 0,8 мг/кг беременным самкам однократно в течение трех суток. Результаты, полученные при введении дексаметазона в дозе 0,4 мг/кг, не показали достоверных отличий от контрольной группы животных. Контрольной группе животных в те же сроки пренатального развития вводили физиологический раствор.

Особенности соматического развития и формирования сенсомоторных и моторных реакций потомков крыс, подвергшихся во время беременности воздействию гипоксии или дексаметазона, изучали с использованием батареи развитых поведенческих тестов (Зарайская и др., 2000).

Для оценки поведенческих реакций и способности к обучению использовали стандартные методики: тесты «открытого поля» и «крестообразного лабиринта», лабиринт Морриса для оценки пространственного обучения и обучения по протоколу «рабочей памяти», обучение условной реакции пассивного избегания (УРПИ). Методика УРПИ относится к числу базисных тестов для оценки влияния различных неблагоприятных воздействий на формирование и воспроизведение памятного следа в норме и в условиях нарушения обучения. Одна из часто используемых форм УРПИ — обучение животных в светло-темной камере, в которой затемненный и освещенный отсеки соединены дверцей, а пол затемненного отека подключен к электростимулятору. Животное обучается не заходить в темную камеру, где оно получило болевое раздражение. В другой экспериментальной ситуации, так же широко применяемая в настоящее время в опытах на грызунах, выработка УРПИ проводится в камере с проволочным токопроводящим полом. Во время тестирования УРПИ фиксируют продолжительность реакции замирания.

Исследовали стресс-реактивность гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС) в условиях иммобилизации у взрослых самцов и самок крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии в различные сроки пренатального онтогенеза. Иммобилизационный стресс у животных вызывали путем помещения их в тесные пеналы. Содержание глюкокортикоидных гормонов (кортикостерон) в крови экспериментальных животных определяли радиоиммунологическим методом с использованием специфической антисыворотки («Sigma» USA) и меченого по тритио кортикостерона («NEM TM Life Science Products», Boston, USA). Измеряли содержание гормонов в крови в покое (базальный) и в ответ на иммобилизационный стресс: через 20 мин после помещения в пенал и через 1, 3 и 24 часа.

Для биохимических и гистохимических исследований животных ($n=8-10$ животных контрольной группы, $n=6-8$ животных в каждой опытной группе декапитировали, быстро извлекали мозг и фиксировали его согласно соответствующей методике.

При проведении гистохимических исследований ткань мозга крысы фиксировали в 4% параформальдегиде или молекулярном фиксаторе FineFix (Milestone, Italy) в течение 24 ч. После проведения стандартных гистологических процедур проводки и заливки в парафин изготавливали и монтировали на стекла срезы толщиной 7 мкм на уровне 2.80 мм от брегмы. Депарафинизированные срезы подвергали высокотемпературной демаскировке в цитратном буфере, после чего инкубировали с первичными поликлональными антителами: к рецепторам минералокортикоидов (1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA), рецепторам глюкокортикоидов (1:100, Calbiochem, Merck Chemicals, Germany или 1:50, Santa

Cruz Biotechnology, USA), к белку домена инозитол 1,4,5-трифосфат рецептора типа 1 (IP3R-1) (Sanna Cruz Biotechnology, USA); к антиоксидантам тиоредоксину-1, тиоредоксину-2, Mn-СОД человека и к бычьеи Cu, Zn-СОД (StressGen Biotechnologies Corp; разведение 1 : 2000).

Фосфоинозитиды экстрагировали из ткани гиппокампа ювенильных (14-суточных) и взрослых (90-суточных) крыс, разделяли на отдельные фракции методом бумажной хроматографии (Киселев, 1978). Содержание фосфоинозитидов оценивали по количеству в них фосфора (в мкг) на 1 мг белка. В настоящей работе представлены данные, касающиеся изменений содержания ТФИ (фосфатидилинозитол-4,5-дифосфатов), ДФИ (фосфатидилинозитол-4-фосфатов) и МФИ (фосфатидилинозитидов).

Исследования характера реагирования фосфоинозитидной системы на действие глутамата проводили на переживающих срезах обонятельной коры мозга крыс, перенесших тяжелую гипобарическую гипоксию на 14-16-е или 17-19-е сутки пренатального онтогенеза. Срезы мозга инкубировали в среде, содержащей меченный тритием мио-инозитол (фирмы “Amersham”). После насыщения тритием, срезы подвергали действию глутамата (10^{-5} M) в течение 30 с. Радиоактивность продуктов гидролиза фосфоинозитидов – инозитолфосфатов, полученных путем разделения на колонке (Dowex 1x8, 200-400 mesh, formate form), регистрировали в сцинтилляционном счетчике. Относительные изменения количества инозит фосфатов определяли по имп/мин/мг белка пробы.

Определения уровня, а также динамики содержания связанного внутриклеточного кальция (Ca-с) в мозге животных, перенесших пренатальную гипоксию, проводились на переживающих срезах пириформной коры мозга толщиной 400 мкм. Относительные изменения уровня Ca^{2+} , связанного с гидрофобными (липидными и белковыми) внутриклеточными доменами (Ca-с) определяли спектрофотометрически с помощью кальцийчувствительного флуоресцентного индикатора хлортетрациклина. Уровень флуоресценции в спектральном диапазоне с максимумом 522 нм определяли в нескольких микроучастках каждого среза диаметром 100 мкм с помощью оптоволоконного спектрометра AvaSpec-2048 (Avantes B. V. Eerbeek, Netherlands), установленного на контактном микроскопе ЛЮМАМ-К (ЛОМО, Санкт Петербург, Россия). Возбуждение флуоресценции производилось светодиодной лампой (L2523UVC, Kingbright, Honk-Kong, China) с пиковой длиной волны 400 нм. Длительность возбуждения флуоресценции при каждом замере не превышала 10 с. Последовательные измерения повторялись с интервалом 5 мин. Хлортетрацин присутствовал в проточном инкубационном растворе в концентрации 50 мкМ в течение всего эксперимента. Стимуляцию ImGluR производили парной аппликацией селек-

тивного агониста (S)-3,5-dihydroxyphenyl-glycine (DHPG), который вводили непосредственно в инкубационный раствор таким образом, чтобы в течение 2 мин его концентрация в среднем составляла 100 мкМ. Повторную аппликацию производили после 40 мин отмыва.

Для определения динамики изменений различных компонентов перекисного окисления липидов (ПОЛ) ткань гиппокампа и неокортекса гомогенизировали и использовали ряд методов, позволяющих оценить ключевые этапы свободно-радикального окисления липидов (Watson, 1998): спектрофотометрический метод определения содержания диеновых и триеновых конъюгатов, также рассчитывался индекс Клейна $I=E_{233}/E_{215}$; спектрофотометрический метод определения продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой; флюориметрический метод определения оснований Шиффа.

Липидную фракцию экстрагировали по методу Фольча. Полученные данные выражали в условных единицах оптической плотности/флюоресценции соотнесённых к 1 мг фосфолипидов, определённых методом Бартлетта, или к 1 мг белка, определенного по методу Лоури.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Соматическое и сенсомоторное развитие, и особенности обучения в раннем постнатальном периоде у крыс, перенесших воздействие тяжелой гипобарической гипоксии или дексаметазона в различные периоды пренатального онтогенеза.

Для оценки соматических, неврологических и нейро-сенсорных последствий гипоксии у крыс раннего возраста была применена процедура тестирования с использованием так называемой батареи тестов. Оценивались ближайшие и отдаленные последствия пренатальной гипоксии или введения дексаметазона.

В течение первых дней жизни не было обнаружено достоверных различий между показателями соматического и сенсомоторного развития потомков крыс, подвергавшихся воздействию тяжелой гипобарической гипоксии трижды в течение 3-х часов на 11-13-е, 14-16-е или 18-20-е сутки беременности. Это позволило усреднить полученные данные по всем трем экспериментальным группам. Показано, что масса тела экспериментальных крысят на 3-е сутки жизни в среднем была на 20-25% меньше, чем у контрольных животных. Различия в массе сохранялись длительное время. Пренатальные инъекции дексаметазона так же вызывали снижение массы тела крысят в раннем постнатальном периоде. Наиболее значительные изменения массы тела были выявлены у крыс, подвергавшихся воздействию дексаметазона на 14-16-е сутки гестации.

По сравнению с контролем у экспериментальных животных выделение ушных раковин, разделение пальцев, появление шерсти, резцов, сосков у самок и прозрение происходило с отставанием на 1-2 дня. Полученные данные показывают, что соматическое развитие крысят, матери которых подвергались воздействию тяжелой гипобарической гипоксии или дексаметазона в различные сроки пренатального онтогенеза, в значительной мере замедлено. Это согласуется с данными ряда исследователей (Thalhammer, 1953; Аршавский, 1982; Petry, Hales, 2000; Ватаева и др., 2005; Дубровская и др. 2008; Vataeva et al., 2008, 2009). Особенno важно отметить, что влияние пренатальной гипоксии на соматическое и моторное развитие крысят в первые дни жизни, не зависело от сроков ее предъявления.

Анализ динамики развития сенсомоторных характеристик не выявил столь однозначных результатов. Так, характер проявления сгибания (флексии) пальцев передних конечностей и экстензии задних конечностей, формирующихся в первые дни жизни, не отличался от наблюдаемого у контрольных животных. Было показано также, что возрастная динамика выполнения переворачивания на горизонтальной поверхности, выявленная у животных экспериментальной и контрольной групп, практически совпадала. Несколько иные результаты были получены при исследовании поведения крысят в тестах «избегания наклонной плоскости (негативный геотропизм)» и «избегания края (обрыва) плоскости». В тесте «избегания наклонной плоскости (негативный геотропизм)» крысят выявлены достоверные отличия в поведении крысят в течение первой недели постнатального развития. Причем если в начале первой недели жизни различия между контрольными и экспериментальными животными в наибольшей степени выражены при более интенсивной стимуляции (наклон плоскости – 40°), то в конце этой недели – при менее интенсивной (наклон плоскости – 20-30°). Выявить достоверные различия в поведении контрольных и экспериментальных 9-суточных крысят в teste «избегания наклонной плоскости (негативный геотропизм)» не удалось. В teste «избегания края (обрыва) плоскости» различия в поведении контрольных и экспериментальных групп обнаруживались у 7- и 9-суточных крыс (но не у 3-суточных). Таким образом, в teste «избегания края (обрыва) плоскости» признаки дефектов развития проявлялись существенно дольше (более 9 дней), чем в teste «избегания наклонной плоскости (негативный геотропизм)».

Изменения в развитии сенсомоторных реакций были обнаружены так же и у крыс, подвергавшихся воздействию дексаметазона в пренатальном периоде развития. Так, на 7-е сутки крысы экспериментальных групп значительно медленнее выполняют данные тесты.

На 9-е сутки не было выявлено достоверных различий в выполнении тестов избегания наклона и избегания обрыва между экспериментальными и контрольными крысами.

Исследования последних лет представили большое количество доказательств о возможности выработки условных рефлексов на запаховые раздражители у незрело рождающихся млекопитающих уже в первые часы и дни жизни (Кассиль В.Г., Гулина Л.К. 1987, McCollum J.F., Woo C. C., Leon M. 1997). Представляло интерес выяснить, меняется ли в течение первых дней жизни способность к выработке и сохранению этих рефлексов под влиянием воздействия тяжелой гипоксии в пренатальном периоде. Были проведены опыты, в которых крысятам (интактными и подвергавшимся воздействию пренатальной гипоксии) в возрасте 7-12 суток предъявлялся обонятельный раздражитель (запах мяты). Присутствие в жилой клетке запаха мяты в течение второй недели жизни привело к изменению у 13-суточных интактных (не подвергавшихся воздействию пренатальной гипоксии) крысят исходно индифферентной реакции на него – на положительную. В этой группе время нахождения в отсеке с запахом мяты составляло в среднем 64.9%, что достоверно отличалось от контроля при $p < 0.001$. Крысята, подвергавшиеся воздействию гипоксии на 14-16-е сутки и 17-19-е сутки гестации, несмотря на присутствие в клетке мяты в течение второй недели жизни, проявляли индифферентную реакцию на предъявляемый им запах мяты во время тестирования. Важно также отметить, что воздействие тяжелой пренатальной гипоксии было связано с нарушениями способности к обучению в течение второй недели жизни в равной мере, как у самцов, так и у самок.

Анализ результатов, полученных при изучении особенностей соматического и сенсомоторного развития крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии или дексаметазона в различные сроки гестации, выявил:

- 1) отставание в соматическом развитии в постнатальном периоде в группе животных, перенесших воздействие гипоксии или дексаметазона в пренатальном периоде;
- 2) животные всех экспериментальных групп характеризовались относительным снижением массы тела по отношению к контролю, однако наиболее значительное отставание в приросте массы тела было обнаружено у животных, испытавших воздействие дексаметазона на 14-16-е и 17-19-е сутки гестации;
- 3) воздействие гипоксии или дексаметазона в пренатальном периоде развития вызывает задержку двигательной координации и сенсомоторного развития крыс, которое может быть выявлено не сразу после рождения, а только в начале второй недели жизни;
- 5) пренатальная гипоксия на 14-16-е гестации вызывает у крыс снижение способности к обучению уже в раннем постнатальном периоде.

Влияние тяжелой гипоксии или дексаметазона впренатальном периоде развития на поведенческие характеристики и способность к обучению взрослых крыс.

Тяжелая гипоксия, перенесенная самками в различные сроки беременности, приводила к изменениям способности их 1.5-месячного потомства (самок) к обучению на примере выработки и воспроизведения условно рефлекторной реакции пассивного избегания (УРПИ). В этом тесте между самцами различных групп достоверных различий выявлено не было – в контрольной группе и группе самцов, подвергшихся воздействию гипоксии на 11-13-е, 14-16-е и 17-19-е сутки гестации, время пребывания в темной камере в среднем снизилось на 30-35%. При выработке УРПИ у самок, в отличие от самцов, были выявлены межгрупповые различия. При тестировании УРПИ самки, подвергшиеся гипоксии на 14-16-е сутки гестации, обнаружили лучшие показатели обучения, чем контрольные крысы и животные других экспериментальных групп (после воздействия током время пребывания в темной камере у них снизилось в среднем на 71%, а у контрольных - на 43% ($p < 0.01$)). Сопоставление данных, полученных на самцах и самках, выявило также, что самки после воздействия гипоксии на 14-16-е сутки пренатального развития по показателям обучения достоверно превосходили самцов, подвергавшихся указанному воздействию в те же сроки ($p < 0.01$). Напротив, у самок, подвергавшихся гипоксии на 11-13-е и 17-19-е сутки пренатального онтогенеза, эти показатели были достоверно хуже, чем у контрольных. Более того, самки, подвергавшиеся воздействию гипоксии на 17-19-е сутки гестации, практически не обнаруживали признаков обучения при тестировании их на следующий день после воздействия током.

В тесте «открытого поля» были обнаружены изменения поведения взрослого потомства крыс (90-суточные животные), подвергавшихся действию тяжелой гипоксии в период пренатального онтогенеза. Наиболее выраженные изменения в поведении были выявлены у самцов, перенесших гипоксию на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза. Для них был характерен повышенный уровень активности в тесте «открытого поля». Последствием воздействия гипоксии на 14-16-е сутки в пренатальном периоде является увеличение числа «переходов» между рукавами в тесте приподнятого лабиринта, что также отражает повышенную двигательную активность, но не было выявлено изменений уровня тревожности экспериментальных животных.

Так же как и в случае воздействия гипоксии введение дексаметазона на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза приводило к достоверному повышению двигательной активности взрослых крыс в тесте «открытого поля» (на 90%, $p < 0.001$). Однако пренатальное введение дексаметазона в более поздний период (на 17-19-е сутки развития) приводи-

ло в последствии к снижению двигательной активности крыс (на 42%, $p<0,001$). Отличия от контроля сохранялись в течение всех дней тестирования. У крыс, матери которых получали инъекции дексаметазона на 14-16-е сутки беременности, время пребывания в открытых рукавах лабиринта увеличилось почти в 3 раза по сравнению с контролем. То есть, введение дексаметазона беременным самкам в указанные сроки вызывает снижение уровня тревожности у их взрослых потомков.

При тестировании крыс в лабиринте Морриса при температуре воды 23-24°C были получены следующие результаты. Во всех группах время, затрачиваемое животными на поиск и локализацию платформы, от опыта к опыту заметно сокращается (рис. 1).

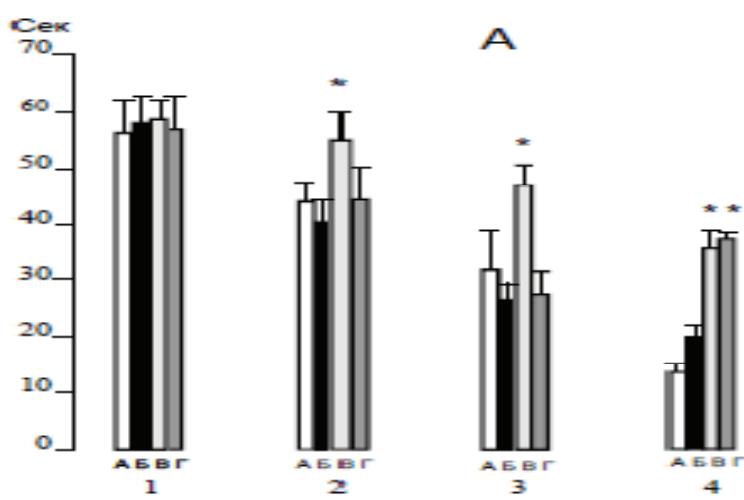


Рис. 1. Динамика обучения в водном лабиринте Морриса самцов крыс в эксперименте 1. а, б, в, г – соответственно контрольные и подвергавшиеся воздействию гипоксии на 11-13-е, 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального периода развития животные; 1-4 – дни тестирования. По оси абсцисс – время, в течение которого животное обнаруживала платформу (латентный период) (* – достоверность $p<0,05$)

У самцов, подвергавшихся внутриутробной гипоксии на 11-13-е сутки периода пренатального развития, динамика этого показателя на протяжении всех опытных дней практически не отличается от контроля (рис.1). Напротив, у самцов, испытавших действие гипоксии на 14-16-е сутки в пренатальном периоде развития, снижение латентного периода достижения платформы происходило значительно медленнее, чем у контроля. Животные этой группы по этому показателю на 2-й, 3-й и 4-й дни тестирования достоверно отличаются от контрольных крыс. Самцы, подвергавшиеся воздействию гипоксии на 17-19-е сутки пренатального развития, характеризовались повышенным по отношению к контролю латентным периодом лишь на 4-й, последний день тестирования. У самок при тестировании их при температуре воды 23-24°C достоверных различий в величине латентных периодов, определенных для животных контрольной и трех экспериментальных групп, выявлено не было.

При тестировании крыс в более жестких условиях (температура воды 16-17°C) у самцов, испытавших воздействие гипоксии на 14-16-е сутки пренатального развития, величина латентного периода на 2-й, 3-й и 4-й дни тестирования была достоверно ниже, чем

у контроля. У самцов, подвергавшихся воздействию гипоксии на 17-19-е суткипренатального онтогенеза, сниженный по отношению к контролю латентный период был выявлен лишь на 2-й день тестирования. В этой серии экспериментов, также как и в первой, достоверных различий в уровне латентного периода у контрольных самок и самок, подвергавшихся воздействию гипоксии, выявлено не было

Таким образом, в жестких условиях (в наших опытах при температуре воды 16-17°C),пренатальное гипоксическое воздействие проявляется в улучшении показателей обучения, а в комфортных (при температуре воды 23-24°C) – ухудшении. Выявляемые нарушения наиболее выражены у самцов крыс, испытавших воздействие гипоксии на 14-16-е суткипренатального периода развития. Важным обстоятельством является также и то, что направленность выявляемых изменений зависит от условий тестирования.

Введение дексаметазона самкам на 14-16-е суткибеременности приводило к нарушениям способности к обучению их взрослых потомков – самцов в водном лабиринте Морриса. Инъекции дексаметазона самкам на 17-19-е суткипрактически не влияли на способность к обучению их потомства в данном тесте.

Похожие результаты были получены при тестировании крыс, пережившихпренатальную гипоксию, в водном лабиринте Морриса при изучении их «рабочей памяти». Анализ динамики формирования пространственной дифференцировки в водном лабиринте Морриса у самцов контрольной и экспериментальных групп выявил достоверные различия по величине латентного периода избегания между первой и второй пробами у контрольных самцов, и самцов, подвергавшихся воздействиюпренатальной гипоксии на 17-19-е суткигестации. В группе животных, подвергшихся воздействию гипоксии на 14-16-е суткипренатального развития, достоверных различий между временем достижения платформы в первой и второй пробе выявить не удалось. Полученные данные свидетельствуют о дефиците рабочей памяти у крыс данной опытной группы. Введение дексаметазона не влияло на рабочую память крыс при тестировании в водном лабиринте Морриса.

Таким образом, наиболее значимые нарушения пространственного обучения и рабочей памяти проявляются у самцов крыс, подвергавшихся воздействию гипобарической гипоксии на 14-16-е суткипренатального онтогенеза.

При исследовании последствий воздействия гипоксии или дексаметазона впренатальном периоде развития на процесс обучения условно рефлекторной реакции пассивного избегания были проведены две серии экспериментов. В первой серии у крыс вырабатывался обстановочный условный оборонительный рефлекс на воздействие тока. Во второй серии ток включали одновременно со звуком. Пренатальная гипоксия не вызывала нару-

шений при выработке обстановочного оборонительного условного рефлекса и воспроизведении пассивных оборонительных реакций, тем самым подтверждая данные о том, что гипоксия в пренатальном онтогенезе не меняет уровень тревожности крыс.

Введение дексаметазона самкам на 17-19-е сутки беременности вызывает у их потомков достоверное увеличение времени замирания по сравнению с контролем при выработке обстановочного оборонительного условного рефлекса и оборонительного условного рефлекса на звук. В группе крыс, рожденных самками, получавшими инъекции дексаметазона на 14-16-е сутки беременности, обнаруживалась противоположная тенденция. При выработке оборонительного условного рефлекса на звук у животных этой группы наблюдалось достоверное снижение времени замирания.

Данные, полученные в этой серии экспериментов, хорошо соотносятся с результатами тестирования животных в тесте приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ). Самцы крыс, испытавшие действие дексаметазона на 17-19-е сутки в пренатальном периоде, демонстрировавшие нарушение угашения обстановочного оборонительного условного рефлекса и оборонительного условного рефлекса на звук, и пролонгацию следа памяти о страхе, проявляли также повышенный уровень тревожности в тесте ПКЛ. Противоположная тенденция проявилась в поведении крыс, подвергшихся воздействию дексаметазона на 14-16-е сутки, которые демонстрировали пониженный уровень тревожности в тесте ПКЛ и нарушение угашения оборонительного условного рефлекса на звук. Нарушений в формировании обстановочного оборонительного условного рефлекса в этой группе выявлено не было.

Таким образом, показано, что существует определенная связь между уровнем тревожности и показателями формирования следа памяти у крыс, подвергшихся воздействию дексаметазона в пренатальном периоде. Важно отметить, что, несмотря на множество работ, вопрос о связях между тревожностью и угашением до конца еще не изучен (Holmes, 2003; Strekalova et al., 2005; Mineur et al., 2006; Jacobson, Cryan, 2007).

Таким образом, пренатальная гипоксия, в отличие от дексаметазона, не влияла на эмоциональное поведение взрослых крыс.

Влияние воздействия тяжелой гипоксии или дексаметазона в различные сроки пренатального онтогенеза, на систему нейроэндокринной регуляции взрослых крыс.

Очевидно, пренатальное гипоксическое воздействие модифицирует базисные адаптивные процессы организма, среди которых важное место принадлежит гипоталамо-гипофизарно-адренокортической системе (ГГАС). ГГАС является основной эндокринной системой, регулирующей гомеостаз и обеспечивающей мобилизацию защитных сил организма.

низма при действии экстремальных факторов, необходимую для формирования адаптивных реакций. Нарушения функции ГГАС и ее регуляции по механизму глюкокортикоидной отрицательной обратной связи вызывает развитие дезадаптивных состояний, приводящих к тяжелым функциональным расстройствам вплоть до гибели организма. На первом этапе работы мы исследовали параметры функции ГГАС у потомков крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии на 14-16- или 17-19-е сутки беременности. Были проведены опыты с применением теста на быструю стрессореактивность ГГАС. Динамику функциональной активности и стрессореактивность ГГАС у крыс исследовали по уровню содержания в плазме крови основного глюкокортикоидного гормона – кортикостерона.

Показано, что пренатальная гипоксия модифицировала реактивность ГГАС на иммобилизационный стресс у самок, но не у самцов. Так, у самок, потомков крыс, испытавших действие гипоксии на 14-16-е сутки беременности, иммобилизационный стресс вызывал постепенное повышение уровня кортикостерона в крови, который достигал максимальных значений на 60-й минуте, после начала иммобилизации. Сходные изменения уровня кортикостерона в первые 60 мин действия иммобилизационного стресса были выявлены и в контрольной группе. В контрольной группе наблюдалось снижение уровня кортикостерона к 24-часовому сроку. У крыс, перенесших гипоксию на 14-16- сутки через 24 часа после начала иммобилизации уровень кортикостерона был достоверно ниже по сравнению с таковым у контроля. В группе самок, являющихся потомками крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии на 17-19-сутки беременности, при иммобилизации наблюдалась резкая активация ГГАС, со значительным подъемом уровня кортикостерона уже к 20 мин. В дальнейшем, в этой группе наблюдалась снижение уровня кортикостерона, но через 24 часа он оставался выше, чем у контрольных животных. В этих условиях крайне важно, что вместе с выраженным стимулирующим эффектом у этих крыс не происходит торможения ГГАС. Очевидно, пренатальная гипоксия на 17-19-е сутки гестации модифицирует работу ГГАС, способствуя ее переходу в новое функциональное состояние.

На следующем этапе исследований был изучен характер вовлечения экстрагипоталамических кортикостероидных рецепторов в механизмы повреждения мозга, индуцируемые пренатальным гипоксическим воздействием. Воздействия в пренатальном периоде могут быть причиной стойкого повышения уровня глюкокортикоидов у плода, что может приводить к нарушениям развития мозга. Физиологическое действие гормонов стресса проявляется через их взаимодействие с рецептором. Поэтому при изучении механизмов длительного модифицирующего влияния стрессорных воздействий на развитие мозга первостепенное значение имеет оценка количества функционально активных рецепторов в

определенных структурах мозга. Согласно современным представлениям, большое значение в гормон-опосредованных адаптивных процессах, а также регуляции гибели/выживания нейронов мозга при окислительном стрессе отводится глюокортикоидным (ГР) и минералокортикоидным (МР) рецепторам, функционирующими в качестве транскрипционных факторов (Meaney, Szyf et al. 2007; Grace et al., 2011; Almeida et al., 2000; De Kloet E.R. et al, 1998; Rogalska J. 2010). Их координированная активность необходима для обеспечения нормального функционирования ГГАС, вовлекаемой в регуляцию стресс-ответов, поведения, обучения и памяти. Причем, в этих процессах существенное значение имеет характер изменения соотношения (баланса) ГР/МР.

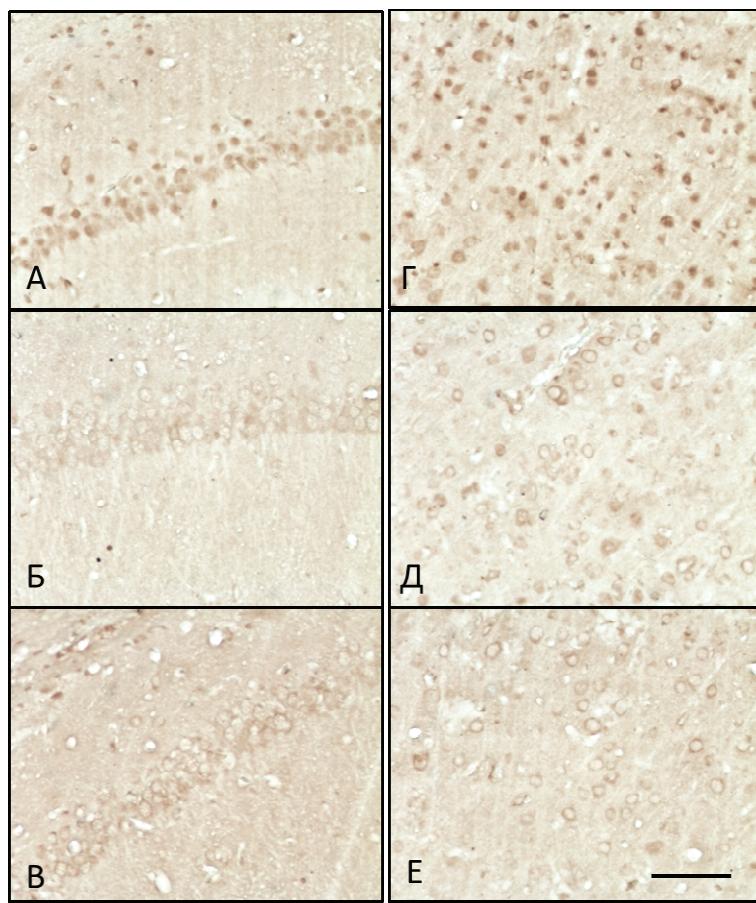


Рис. 2. Репрезентативные микрофотографии изменения иммунореактивности глюокортикоидных рецепторов в области CA1 гиппокампа (A, B, V) и неокортексе (5-й слой) (Г, Д, Е) взрослых контрольных крыс и крыс, подвергавшихся гипоксии на 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального онтогенеза. Маркер, 100 мкм.

А, Г – контроль;
 Б, Д – гипоксия на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза;
 В, Е – гипоксия на 17-19-е сутки пренатального онтогенеза.

В экспериментах с использованием иммуногистохимического анализа мы провели изучение количества иммунопозитивных нейронов к глюко- и минералокортикоидным рецепторам в области CA1 и зубчатой извилине гиппокампа, а также во 2-м и 5-м слоях неокортекса взрослых крыс самцов всех экспериментальных групп. Тяжелая гипоксия, предъявляемая животным на последней неделе пренатального развития, не приводит к значительным изменениям общего числа клеток, содержащих ГР, что согласуется с отсутствием значимых изменений кривой стрессореактивности ГГАС в данной группе крыс самцов. Незначительные, но достоверные изменения ГР-иммунореактивности наблюдаются только в пятом слое неокортекса - уменьшение экспрессии глюокортикоидных рецепторов на 21,8% и 23,2% (соответственно, гипоксия на 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального развития) (Рис. 2). Значительные изменения выявле-

ны при анализе количества интенсивно имmunореактивных клеток к ГР – гипоксия на 14-16 сутки пренатального развития приводила в дальнейшем к снижению интенсивности ГР-имmunореактивности на 55-65 % в области CA1 гиппокампа и 2-м и 5-м слоях неокортика. Гипоксия на 17-19 сутки беременности приводила к значительным изменениям количества интенсивно имmunореактивных клеток к ГР только в области CA1 гиппокампа и 5-м слое неокортика (снижение на 50,9% и 62,3% соответственно).

	воздействие	сроки	Общее число имmunопозитивных клеток				Число интенсивно имmunореактивных клеток			
			CA1	DG	Neo2	Neo5	CA1	DG	Neo2	Neo5
ГР	Гипоксия	14-16	N	N	N			N		
		17-19	N	N	N			N		
	Дексаметазон	14-16	N	N	N	N		N		
		17-19	N	N						
МР	Гипоксия	14-16		N	N		N		N	
		17-19	N	N	N	N	N	N		
	Дексаметазон	14-16	N	N		N	N		N	
		17-19	N	N		N	N			

Таблица 1. Изменения уровней глюко- (ГР) и минералокортикоидных (МР) рецепторов в области CA1 и зубчатой извилине гиппокампа, во 2-и и 5-м слоях неокортика взрослых крыс подвергавшихся влиянию тяжелой гипобарической гипоксии или введению дексаметазона на 14-16-е или 17-19-е сутки пренатального онтогенеза. N – нет достоверных отличий от контроля, стрелками показаны достоверные различия.

Общее число имmunопозитивных клеток к МР под действием пренатальной гипоксии также изменялось незначительно, достоверные изменения обнаружены только в области CA1 гиппокампа взрослых крыс. Изменения количества интенсивно имmunопозитивных клеток обнаружены, главным образом, в областях CA1 и неокортике (табл. 1).

В работе изучали также характер вовлечения экстрагипotalамических кортикостероидных рецепторов в механизмы повреждения мозга, индуцируемые введением синтетического гормона дексаметазона самкам в различные периоды пренатального онтогенеза. Введение синтетического гормона дексаметазона в конце 3-ей недели беременности приводит к достоверному изменению общего числа ГР и МР имmunопозитивных клеток к глюко- и минералокортикоидным рецепторам в неокортике взрослых крыс. В гиппокампе эти изменения менее выражены. Введение дексаметазона на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза приводило к увеличению имmunореактивности к МР в области CA1 гиппокампа и неокортике взрослых крыс. Тенденция к уменьшению интенсивно ГР-имmunореактивных клеток, сопровождается повышением имmunореактивности клеток к МР. По-видимому, нарушения экспрессии кортикостероидных рецепторов после гипоксии

в пренатальном онтогенезе отражают изменения их активности в качестве транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию генов-мишеней в том числе транскрипционных факторов HIF-1 α , нейрогормонов кортиколиберина и вазопрессина, антиоксидантов (Kodama et al., 2003). Причем, эти изменения разнонаправленны в различных регионах мозга. Нарушается и соотношение ГР/МР. Различия в отношении ГР/МР обнаружены во всех исследованных областях мозга, но их локализация и направленность зависят от типа и сроков воздействия. Наибольшие изменения наблюдаются в области CA1 гиппокампа и во 5-м слое неокортекса. При анализе отношения ГР/МР показано, что в области CA1 гиппокампа и 5-м слое неокортекса в мозге взрослых крыс это отношение сдвигается в сторону увеличения доли МР после воздействия как тяжелой гипоксии, так и дексаметазона, сохраняя таким образом контроль экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-xL, нейротрофических факторов. Эффективность обучения и память также зависят от сбалансированной работы МР и ГР, контролирующих нормальное функционирование ГГАС (Berger et al., 2006; de Kloet et al., 1998). Изменения экспрессии ГР/МР, вследствие перенесенной пренатальной гипоксии, обнаруженные в нашей работе, так же сопровождаются ухудшением способности к пространственному обучению в лабиринте Морриса и рабочей памяти.

Таким образом, тяжелая гипобарическая гипоксия на последней неделе пренатального онтогенеза приводят к длительным (в течение исследованного периода жизни) изменениям поведенческих характеристик, нарушениям обучения и памяти, которые сопровождаются перестройками активности одной из центральных нейроэндокринных систем - ГГАС. Пренатальная гипоксия или введение дексаметазона модифицируют работу глюкокортикоидных рецепторов, однако степень, локализация и направленность этих изменений отличаются в зависимости от сроков и типа воздействия.

Состояние фосфоинозитидной системы неокортекса и гиппокампа крыс, подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии в пренатальном периоде.

В опосредовании эффектов гипоксии на мозг важная роль принадлежит внутриклеточным регуляторным системам (Самойлов, 1999, Самойлов и др. 2001, Chen J., et al. 1997). Фосфоинозитидной и кальциевой регуляторным системам принадлежит одно из ключевых мест, как непосредственным участникам процессов, определяющих пролиферацию и дифференцировку клеток мозга, программируемую гибель, нейропередачу и др. В связи с обнаруженными нами и другими авторами нарушениями развития и способности к обучению важно было особое внимание уделить состоянию фосфоинозитидной системы в неокортексе и гиппокампе крыс, переживших пренатальную гипоксию.

Одной из центральных задач нашей работы явилось исследование изменений активности полифосфоинозитидной внутриклеточной регуляторной системы. Было обнаружено, что уровень содержания трифосфоинозитидов (фосфатидилинозиол-4,5-дифосфаты, ТФИ) в неокортике у контрольных 15-суточных крысят в значительно выше, чем у взрослых (0.224 ± 0.021 и 0.134 ± 0.007 мкгР/мг белка ткани мозга, соответственно). Уровень содержания ТФИ в гиппокампе 15-суточных крыс в два раза выше, чем в неокортике, у взрослых крыс такой разницы не выявлено. Тяжелая гипоксия, предъявляемая на 14-16-е сутки гестации, приводит к повышению уровня содержания ТФИ и ДФИ в гиппокампе и неокортике 14-суточных крыс (Рис. 3). Содержание МФИ в мозге экспериментальных животных не отличалось от контрольного уровня. При этом изменения содержания полифосфоинозитидов (ТФИ и ДФИ) в гиппокампе были более выражены, чем в неокортике.

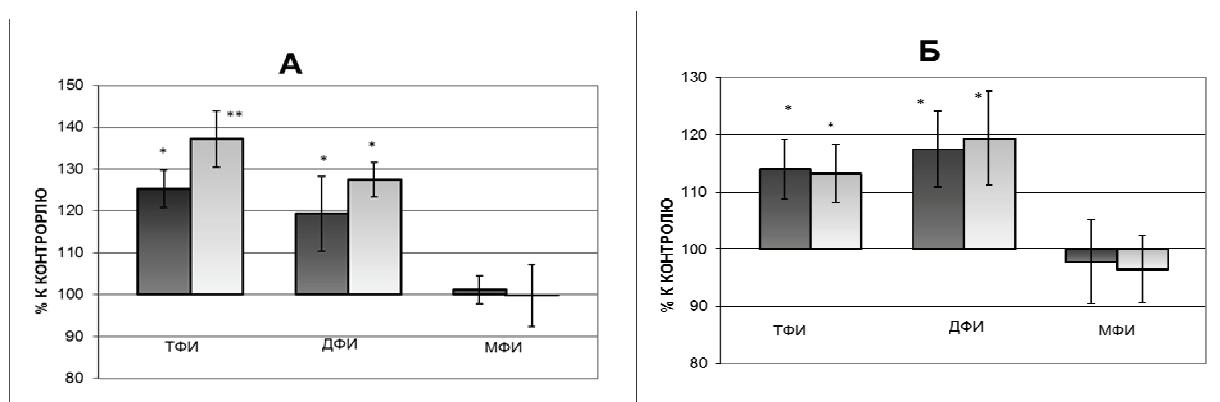


Рис. 3. Изменения содержания компонентов фосфоинозитидов (в % к контрольному уровню) в неокортике (темные столбики) и гиппокампе (светлые столбики) 14-суточных крыс, переживших тяжелую гипоксию на 14-16-е сутки (А) и 17-19-е сутки гестации (Б). (* достоверные отличия от контроля - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$)

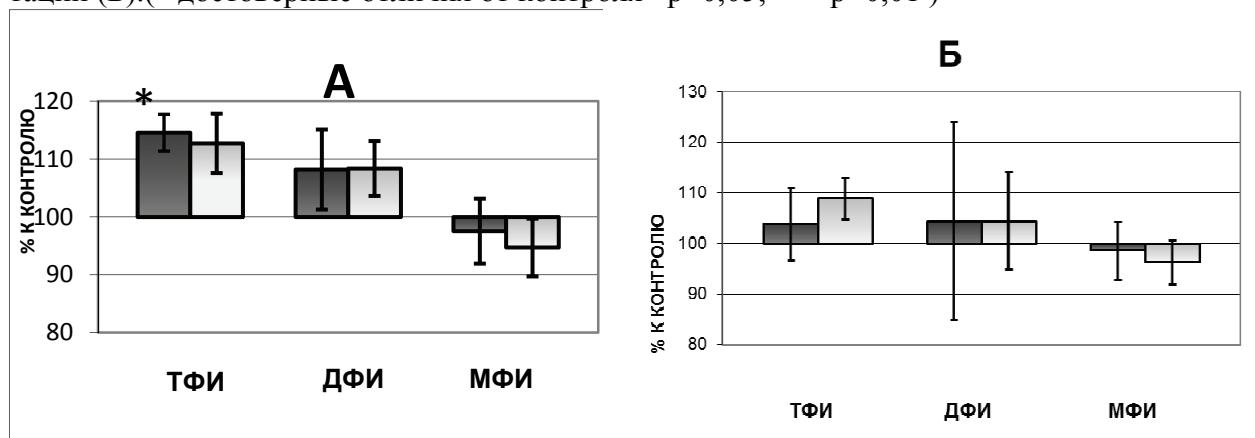


Рис. 4. Изменения содержания фосфатидилсерина (ТФТ), фосфатидилинозитол-4-фосфатов (ДФИ) и фосфатидилинозитолов (МФИ) в неокортике (темные столбики) и гиппокампе (светлые столбики) 90-суточных крыс, перенесших гипоксию на 14-16-е (А) и 17-19-е (Б) сутки гестации. (*достоверные отличия от контроля - $p < 0.05$).

У взрослых (90-суточных) животных, перенесших пренатальную гипоксию на 14-16-е сутки гестации, уровень содержания ПФИ хотя и в меньшей степени, но оставался выше контрольных значений в исследуемых образованиях мозга (Рис. 4). При этом не наблюдалось различий между неокортексом и гиппокампом.

Воздействие тяжелой гипобарической гипоксии в третьем триместре беременности вызывает длительные изменения в уровне содержания полифосфоинозитидов (но не монофосфоинозитидов) в гиппокампе и неокортексе потомков. Последствия действия гипоксии по-разному проявляются в зависимости от срока гестации. Когда действие гипоксии приходится на начало третьей недели гестации, наблюдаются значительные изменения в содержании полифосфоинозитидов в гиппокампе 14-ти и 90-суточных потомков. Действие гипоксии в конце третьей недели также вызывает изменения в содержании полифосфоинозитидов в гиппокампе и неокортексе только ювенильных крыс.

Для сравнения эффекта гипобарической гипоксии и действия глюкокортикоидных гормонов были поставлены эксперименты по сравнительному изучению последствий влияния пренатальной гипоксии и введения в те же сроки синтетического гормона – дексаметазона. Введение дексаметазона в дозе 0,8 мг/кг на 14-16-е сутки гестации вызывает длительные изменения содержания трифосфоинозитидов в гиппокампе и неокортексе (на 38,8 и 32,6% соответственно, $p < 0,05$) взрослых крыс. Уровень содержания ТФИ в гиппокампе и неокортексе взрослых крыс после пренатального введения дексаметазона на 17-19-е сутки гестации также выше контрольного уровня, но в меньшей степени (на 24,1 ($p < 0,05$) и 13,8 % соответственно). Таким образом, введение дексаметазона в период пренатального онтогенеза значительно повышает уровень содержания ключевого компонента фосфоинозитидной системы – фосфатидилинозитола-4,5-дифосфатов. Причем это повышение превосходит изменения содержания ТФИ после пренатальной гипоксии.

Известно, что у неонатальных и ювенильных крыс отмечается повышенный уровень метаболизма фосфоинозитидов мозга по сравнению с взрослыми животными (Mundy WR. et al., 1995). Показано также, что глутаматергическая сигнальная трансдукция опосредуется через гидролиз фосфоинозитидов только в неонатальном периоде (Balduini W. et al., 1991, Costa LG. 1994, Mistry R. Et al., 1996). В позднем постнатальном периоде у взрослых животных связь внутриклеточной глутаматергической сигнальной системы с гидролизом фосфоинозитидов в норме не выявляется. Вместе с тем, при предъявлении различных видов адаптивных воздействий у них проявляется фосфоинозитидный ответ при активации глутаматергической сигнальной трансдукции (Balduini W. et al., 1991, Costa LG. 1994, Mistry R. et al., 1996, Rhodes PG and Cai Z. 1996). Таким образом, наличие фос-

фоинозитидного ответа на аппликацию глутамата может служить показателем функциональной зрелости фосфоинозитидной регуляторной системы и способности мозга к адаптации к повреждающим воздействиям.

Исследования характера реагирования фосфоинозитидной системы на действие глутамата проводили на переживающих тангенциальных срезах обонятельной коры мозга крыс. Аппликация глутамата (50 мкМ) на переживающие срезы обонятельной коры мозга 14-суточных крысят контрольной группы вызывает значительный фосфоинозитидный ответ в отличие от срезов взрослых животных (Рис. 5).

Тяжелая гипоксия, предъявляемая на 14-16-е сутки гестации, приводит к значительному увеличению амплитуды фосфоинозитидного ответа на действие глутамата в срезах мозга 14-суточных крысят. При этом фосфоинозитидный ответ на действие глутамата наблюдался и у взрослых животных, перенесших тяжелую гипоксию на 14-16-е сутки гестации. В то же время после воздействия гипоксии на 17-19-е сутки гестации в коре крысят в возрасте 14 суток постнатальной жизни фосфоинозитидный ответ на глутамат

ниже,

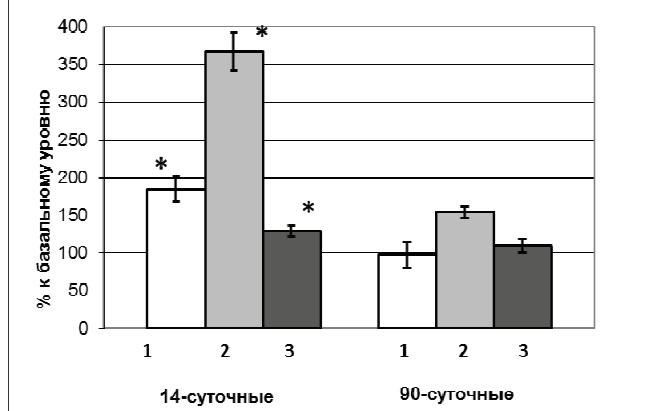


Рис. 5. Изменение уровня инозитолтрифосфатов (в процентах к базальному уровню – без аппликации глутамата) в переживающих срезах мозга 14-ти и 90-суточных контрольных (1) крыс и подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии на 14- 16-е (2) и 17-19-е (3) сутки гестации в ответ на аппликацию глутамата (50 мкМ). * - достоверные отличия от контроля ($p < 0.05$)

чем в контрольной группе (уровень инозитолфосфатов незначительно превышает базальный), а у взрослых крыс он не отличается от контроля (рис. 5).

Таким образом, гипоксия, перенесенная на 14-16-е сутки пренатального развития, приводит к выраженной длительной модификации активности внутриклеточной сигнальной трансдукции, опосредуемой фосфоинозитидной системой. Ранее сходная сенситизация ПФИ системы была выявлена нами в экспериментах с предъявлением гипоксического прекондиционирования, повышающего толерантность зрелого мозга к последующему повреждающему гипоксическому воздействию. Оптимальная активация внутриклеточных регуляторных систем (в том числе кальциевой и фосфоинозитидной) является первым звеном адаптивных реакций нейронов мозга, которая с одной стороны вызывает кратковременные нейропротективные эффекты, связанные с поддержанием клеточного гомео-

стаза в условиях повреждающих воздействий, а с другой – запускает геном-зависимые реакции, обеспечивающие долговременную толерантность мозга к повреждающим воздействиям. (Самойлов и др. 2001, Тюлькова и др., 1998). Однако, длительная активация системы ПФИ (в течение всей жизни) может иметь патологический характер. Согласно современным представлениям нарушения метаболизма ПФИ могут приводить к различным нейродегенеративным заболеваниям, в том числе синдрому Дауна, болезни Альцгеймера (Berridge, 2013; McCrea and De Camilli, 2009; Hakim et al., 2012; Pirruccello, De Camilli P 2012; Voronov et al., 2008), причем увеличение внутриклеточного уровня ПФИ, ингибирующего токсическое действие амилоидного пептида А β 42, может быть использовано для лечения этих болезней (Berman et al., 2008). Дезрегуляция фосфоинозитидной системы проявляется в нарушениях способности к обучению. Так обучение пространственным навыкам в лабиринте Морриса наиболее выраженные изменения выявлены при обучении самцов крыс, матери которых подвергались действию гипоксии именно на 14-16-е сутки беременности. Отмеченные различия в характере обучения определяются условиями опыта. В “жестких” стрессовых условиях, (при температуре воды в лабиринте 16-17°C), воздействие гипоксии в период гестации приводит к улучшению показателей обучения относительно контроля, а в более благоприятных условиях (при температуре воды 23-24°C) – ухудшению.

Таким образом, гипоксия, перенесенная на 14-16 сутки пренатального развития, приводит к выраженной длительной модификации активности внутриклеточной сигнальной трансдукции, опосредуемой фосфоинозитидной системой, которая, очевидно, играет определенную роль в динамике формирования поведения и способности к обучению, а также изменению толерантности нейронов мозга к последующим неблагоприятным воздействиям среды у взрослых животных.

Влияние воздействия тяжелой гипоксии в пренатальном периоде развития на активность глутаматергической сигнальной трансдукции в коре мозга взрослых крыс.

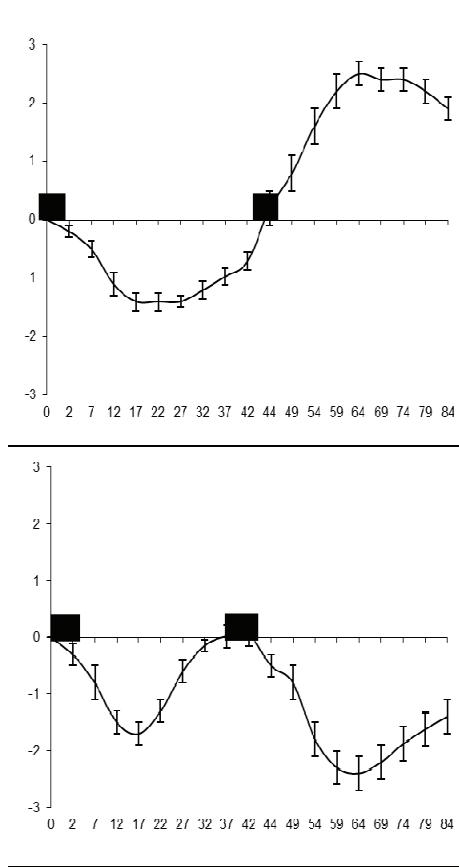
Пренатальная гипоксия, перенесенная крысами в последний триместр беременности, приводит к выраженным изменениям активности внутриклеточной сигнальной трансдукции, опосредуемой фосфоинозитидной системой. Как известно, глутамат вызывает гидролиз ПФИ в клетках мозга в результате активации метаботропных глутаматных рецепторов I группы (mGluR), конститутивная активность которых формируется в пренатальном периоде (Balduini W, et al, 1991, Costa LG. 1994, Rhodes PG, Cai Z. 1996). Можно предположить, что эти рецепторы вовлечены в формирование и/или постнатальное под-

держение нарушений, вызываемых пренатальной гипоксией. Было проведено изучение последствий влияния пренатальной гипоксии на функциональное состояние полифосфоинозитидной и кальциевой регуляторных систем крыс двух возрастных групп, путем оценки кальциевой сигнализации, опосредуемой возбуждением ImGluR в переживающих срезах обонятельной коры мозга. Для стимуляции метаботропных глутаматных рецепторов первой группы (ImGluRs) применяли парную аппликацию неселективного агониста S(3-5)-дигидрокси-фенилглицина (DHPG, Sigma, USA) в конечной концентрации 100 мкМ в течении 2 мин. Так как наиболее значимые изменения активности фосфоинозитидной системы обнаружены у крыс, перенесших гипоксию на 14-16-е сутки гестации, исследования активации метаботропных глутаматных рецепторов проведено на крысах именно этой группы.

Известно, что специфическая стимуляция метаботропных глутаматных рецепторов 1 и 5 группы (ImGluR (1, 5) инициирует различные сигнальные пути, в том числе два основных: фосфолипазаC-зависимое инозитолтрифосфат-опосредованное высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума и фосфолипазаC-зависимая диацилглицерол/протеинкиназаC-опосредованная потенциация Ca^{2+} -проводящей функции NMDA рецепторного канального комплекса. Результирующий эффект стимуляции ImGluRs на Ca^{2+} обмен определяется сложным сочетанием действия этих и других механизмов, а форма кальциевого ответа на действие селективного агониста ImGluR (1, 5) - DHPG должна зависеть как от стадии онтогенетического развития животного, так и от патогенного воздействия тяжелой гипобарической гипоксии, пережитой ими пренатально.

В наших исследованиях было проведено изучение кальциевых ответов на стимуляцию ImGluR (1, 5) селективным агонистом DHPG в срезах обонятельной коры у 14-суточных и взрослых крыс, а также ближайших и отдаленных последствий влияния пренатальной гипобарической гипоксии, предъявляемой на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза, на изменения сигнальной функции метаботропных глутаматных рецепторов I группы, проявляющиеся в модификации Ca^{2+} -ответов на их стимуляцию.

Обнаружено, что в срезах мозга контрольных 14-суточных и 90-суточных крыс парная аппликация DHPG вызывает различные смещения уровня связанного кальция (Ca -с-ответы). В срезах 14-суточных крыс первая аппликация агониста вызывала небольшое, но достоверное стойкое снижение уровня Ca -с, а повторная – его повышение, пре-восходящее исходное значение (Рис.6, 1). В срезах 90-суточных животных оба кальциевого-ответа были негативными (Рис. 6, 2).



1

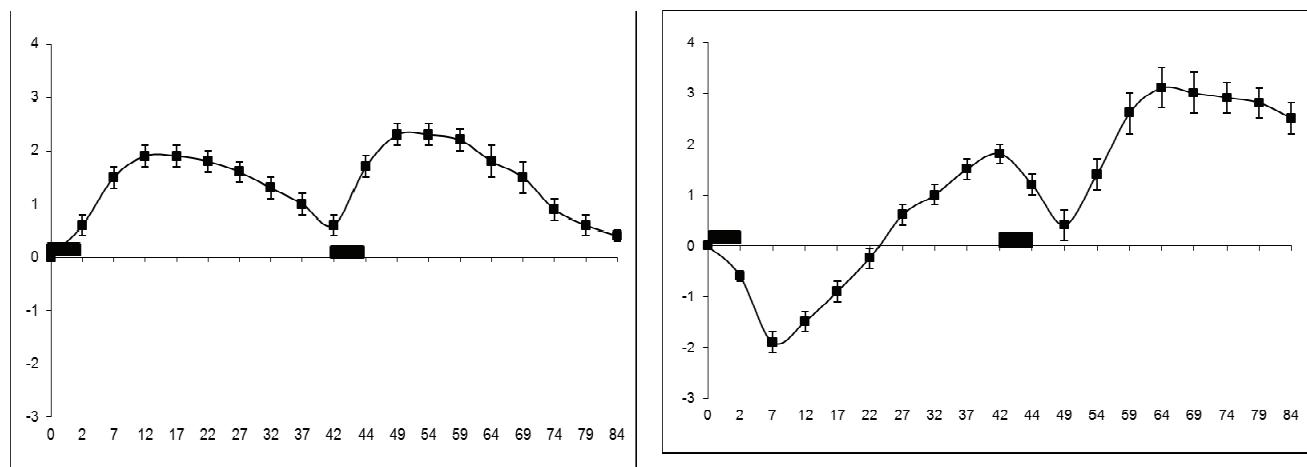
Рис. 6. Кальциевые ответы на двукратную аппликацию DHPG (2 мин, 100 мкМ) в срезах контрольных 14-суточных (1) и 90-суточных (2) крыс. Представлена динамика средних значений для каждого измерения (с 5-мин интервалом) +/- стандартная ошибка среднего, по оси абсцисс – изменения связанного кальция (Ca-c) в %, n=9.

Черные прямоугольники указывают периоды аппликации агониста DHPG.

2

У двух таких же возрастных групп животных, подвергнутых пренатальной тяжелой гипоксии на 14-16-е сутки гестации, кальциевые ответы различались между собой и отличались от соответствующих реакций срезов контрольных животных. У экспериментальных 14-суточных крысят в отличие от их контрольных сверстников оба ответа были позитивными

(Рис. 7, 1), а с возрастом, в начале каждого из них проявлялся кратковременный негативный компонент (Рис. 7, 2). Кальциевые ответы на DHPG представлены очевидно противоположно направленными сдвигами (снижение и повышение уровня Ca-c).



1

2

Рис. 7. Кальциевые ответы на двукратную аппликацию DHPG (2 мин, 100 мкМ) в срезах контрольных 14-суточных (1) и 90-суточных (2) крыс, подвергавшихся действию пренатальной гипоксии на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза. Представлена динамика средних значений для каждого измерения (с 5-мин интервалом) +/- стандартная ошибка среднего, по оси абсцисс – изменения связанного кальция (Ca-c) в %, n=9.

Черные прямоугольники указывают периоды аппликации агониста DHPG. (снижение и повышение уровня Ca-c).

Последствия пренатальной гипоксии проявляются в преобладании тенденции связывания кальция с гидрофобными компонентами (белками, фосфолипидами мембран), однако с возрастом и у контрольных и экспериментальных животных сильнее проявляется тенденция к усилению входа экстраклеточного Ca^{2+} с последующим его связыванием буферными системами.

Таким образом, рассматривая Ca^{2+} - ответы на стимуляцию ImGluRs как результат интерференцией двух основных конститутивных сигнальных путей этих рецепторов, можно предположить, что в мозге животных, переживших пренатальную гипоксию, сигнальный баланс сдвинут в сторону облегчения механизмов входа Ca^{2+} в клетки. Такую модификацию можно расценивать как своеобразный «фактор риска», способный усугубить развитие Ca^{2+} - опосредованных эксайтотоксических состояний, свойственных ряду экстремальных ситуаций, таких, например, как гипоксия/ишемия и посттравматический стресс.

Влияние гипобарической гипоксии, перенесенных самками крыс в различные сроки беременности, на активность IP3 рецепторного комплекса в гиппокампе их потомков.

Модификация активности кальциевой и фосфоинозитидной регуляторных систем в ответ на воздействие тяжелой гипобарической гипоксии в пренатальном периоде развития должна отражаться на состоянии инозитол-3-фосфатного рецепторного комплекса. Мы провели сравнительное изучение иммунореактивности к IP3R1 нейронов в области CA1 гиппокампа взрослых и ювенильных крыс, подвергавшихся действию гипоксии в пренатальном периоде. Поскольку большинство исследований функциональной роли IP3R- зависимого внутриклеточного освобождения Ca^{2+} выполнено на пирамидальных нейронах гиппокампа взрослых животных и лишь незначительное число работ проведено на крысятках моложе трех недель (Hertle D.N. et al., 2007; Nakamura T et al., 1999; 2002), мы провели сравнительный анализ распределения IP3R-1 в гиппокампе мозга ювенильных (14-суточных) и взрослых (90-суточных) крыс. В наших экспериментах наибольшая IP3R-1 иммунореактивность была обнаружена в области CA1 гиппокампа молодых и зрелых животных, что хорошо согласуется с литературными данными (Dent MA et al., 1996; Hertle D.N. et al., 2007; Nicolay N.H. et al., 2007). Было отмечено ярко выраженное различие в количестве интенсивно- и слабо иммунореактивных нейронов к IP3R-1 у животных этих двух возрастных групп. У 14-суточных крыс в области CA1 только 30% нейронов интенсивно иммунореактивны к IP3R-1, в то время как в области CA1 гиппокампа взрослых животных количество таких нейронов составляло около 80 %. Кроме того, было выявле-

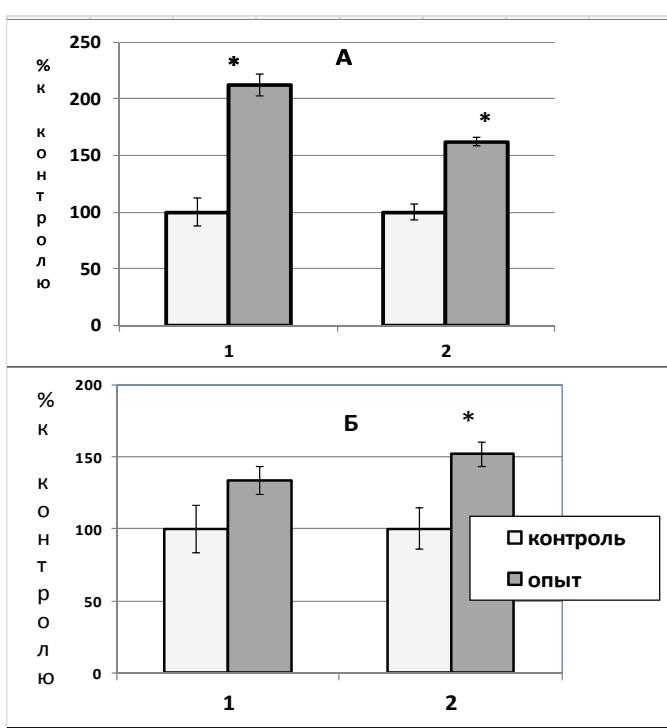
но, что нейроны ювенильных животных имеют наибольшую иммунореактивность в соме и проксимальных отделах аксонов с уменьшением ее в дистальном направлении вдоль аксона. В противоположность этому, аксоны нейронов взрослых животных были иммунореактивны относительно однородно вдоль своей длины. На ранних этапах развития мозга IP3 рецепторов мало, но их роль велика из-за высокой чувствительности фосфоинозитидной системы (Balduini et al., 2001). Эти данные согласуются с результатами оценки Ca^{2+} сигнализации у молодых и взрослых животных.

Пренатальное гипоксическое воздействие, оказываемое на 14-16-е и 17-19-е сутки эмбрионального развития, не вызывает изменения общего числа иммунопозитивных клеток в гиппокампе у всех групп экспериментальных животных. У 14-суточных крыс наблюдается повышенная экспрессия IP3R-1 после воздействия пренатальной гипоксии на 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального онтогенеза (на 112,2% и 61,9 % соответственно). (рис. 8). У взрослых 90-суточных животных также наблюдается повышенное число интенсивно иммунореактивных к IP3R1 нейронов в области CA1 гиппокампа (на 33,3% гипоксия на 14-16-е сутки и на 51,9% гипоксия на 17-19-е сутки пренатального развития).

Повышение экспрессия IP3R1 приводит к увеличению выхода Ca^{2+} из внутриклеточного депо и активации Ca -зависимых процессов, в частности контроля процессов апоптоза, регуляции внутриклеточного pH , запуска экспрессии генов (Choe and Ehrlich, 2006; Kiviluoto et al., 2013). Полученная нами информация об ап-регуляции экспрессии IP3R1 пренатальной гипоксией согласуется с изменениями Ca^{2+} сигнализации, опосредуемой возбуждением ImGluR в переживающих срезах мозга у тех же групп крыс. Хотя контролируемое повышение внутриклеточного кальция необходимо для Ca -сигнализации,

длительное поддержание высокого уровня внутриклеточного Ca^{2+} может приводить к некрозу и апоптозу нейронов (Ruiz A et al., 2009), возникновению психических заболеваний, в том числе, болезни Альцгеймера, биполярным расстройствам и шизофрении (Berridge, 2013; 2014).

Рис. 8. Изменения количества интенсивно иммунореактивных клеток к IP3R-1 в гиппокампе 14-суточных (А) и 90-суточных (Б) крыс, подвергавшихся действию пренатальной гипоксии на 14-16-е (1) и 17-19-е (2) сутки гестации по



сравнению с контролем (* $p<0,05$)

Среди внутриклеточных механизмов, участвующих в высвобождении кальция, IP3R1 привлекает особое внимание, так как он вовлекается в большинство сигнальных путей (Muallem S. et al., 1989; Kasri N.N. et al., 2004; Thrower E.C et al., 2001; Patterson R.L et al., 2004; Foskett J.K. 2010). IP3 рецепторный комплекс, несомненно, считается одним из основных в Ca^{2+} - сигнализации, он играет важную роль в регуляции таких процессов, как экспрессия генов, секреция, оплодотворение, пролиферация, дифференциация клеток, развитие, инициация сигналов и клеточная смерть. Дезрегуляция работы IP3R1 может приводить к патологическим нарушениям кальциевой сигнализации: ее инициации, изменению амплитуды и частоты Ca^{2+} - сигнала, его продолжительности (Decuypere J.-P et al., 2011 a, b). Длительная активация IP3 рецепторного комплекса 1 в области CA1 гиппокампа (в течение всего исследованного нами срока) существенно изменяет работу внутриклеточной кальциевой сигнальной системы, что может также приводить к нарушениям памяти и способности к обучению и, в последствии, к развитию нейрональных расстройств, связанных с изменением функциональной активности нейронов, в том числе к болезни Альцгеймера и шизофрении (Choe and Ehrlich, 2006; Foskett, 2010; Decuypere et al., 2011).

Пренатальное введение дексаметазона на 14-16-е и 17-19-е сутки эмбрионального развития так же, как и гипоксия, не вызывает изменения общего числа иммунопозитивных к IP3R-1 клеток в гиппокампе у всех групп экспериментальных животных. У взрослых 90-суточных животных обнаружено повышенное число интенсивно иммунореактивных к IP3R1 нейронов в области CA1 гиппокампа (на 18% при введении дексаметазона на 14-16-е сутки и на 41,8 % на 17-19-е сутки гестации), причем, для группы с предъявлением гипоксии на 17-19-е сутки, это различие являлось достоверным по сравнению с контролем.

Таким образом, тяжелая гипобарическая гипоксия, предъявляемая крысам в начале последней недели беременности, приводят к длительным изменениям активности внутриклеточных регуляторных систем (кальциевой и фосфоинозитидной) в гиппокампе и неокортексе потомков, что очевидно находит свое отражение в наблюдаемых нами нарушениях поведения, памяти и способности к обучению. Введение дексаметазона так же активирует фосфоинозитидную систему, причем не зависимо от того, в начале или конце третьей недели переменности применялось воздействие.

Изменения соотношения про- и антиоксидантных систем в гиппокампе и неокортексе крыс под влиянием перенесенной в пренатальном периоде развития тяжелой гипобарической гипоксии.

Особенностью метаболизма головного мозга являются интенсивные аэробные окислительные процессы. В ЦНС существует сбалансированное равновесие про- и антиоксидантных систем, позволяющее свободным радикалам и различным продуктам окисления участвовать в качестве сигнальных и регуляторных молекул при функционировании структур головного мозга, а также вовлекаться в процессы обучения и памяти. Помимо этого окислительная модификация биомолекул мембран является одним из наиболее быстрых путей изменения их физико-химических параметров, компенсирующих изменения гомеостаза при экстремальных изменениях внешней среды. Для формирования целостной картины нарушений, возникающих вследствие пережитой в раннем онтогенезе тяжелой гипоксии интересно было оценить соотношение про- антиоксидантных систем мозга.

Особую роль в повреждении нейронов мозга при гипоксии играет окислительный стресс, связанный с гиперпродукцией активных форм кислорода (Warner et al., 2004; Maiti et al., 2006). Как следствие, в условиях гипоксии активируется протеолиз, развивается внутриклеточный ацидоз, что, в свою очередь, вызывает повреждения цитомембран, сопровождающееся инициацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) и накоплением в жидких средах его продуктов: малонового диальдегида - МДА, диеновых и триеновых конъюгатов, гидроперекисей липидов, диенокетонов. Цепное радикальное окисление липидов существенно модифицирует фосфолипидный состав клеточных мембран, вызывая значительные нарушения в процессах, протекающих на них (ферментативные, рецепторные процессы и т.д.). Однако, при определенных условиях, оно способно инициировать эволюционно сложившиеся и генетически детерминированные мобилизующие механизмы приспособительных реакций нервных клеток, направленные на повышение их устойчивости к повреждающему действию неблагоприятных факторов среды (Lu et al., 2002; Emerit et al., 2004). Исследование показателей продуктов ПОЛ, например МДА, может являться способом раннего обнаружения метаболических нарушений в структурах мозга новорожденного ребенка при их гипоксическом повреждении, т. е. уровня, характер повреждения которого не может быть обнаружен традиционными методами диагностики (Поздняков, 2000). Особое значение при этом приобретает баланс про- и антиоксидантных систем, наилучшим образом находящий своё отражение в интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые могут служить маркером изменений в функциональном состоянии клеток ткани, а так же состояния пластичности их мембран.

Об активности процессов перекисного окисления судили по содержанию в тканях мозга диеновых и триеновых конъюгантов, продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБКАП) и оснований Шиффа. Степень окисленности мембран оценивали по

коэффициенту Клейна. Определяли уровень ПОЛ в коре и гиппокампе у крыс следующих групп: 1) у интактных 14-суточных и взрослых самцов крыс; 2) у 14-суточных самцов крыс, подвергавшихся воздействию тяжелой гипоксии на 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального развития.

Полученные при сравнении уровней ПОЛ в неокортике и гиппокампе у 14-суточных и 90-суточных крыс данные свидетельствуют о том, что в раннем постнатальном онтогенезе для мозга крыс характерен повышенный уровень всех исследованных компонентов ПОЛ.

У 14-суточных крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии на 14-16-е сутки пренатального развития, уровень вторичных продуктов ПОЛ в гиппокампе и неокортике незначительно отличался от контрольного. Однако у взрослых животных мы обнаружили повышение уровня всех исследованных компонентов системы ПОЛ, что особенно ярко выражено в гиппокампе (Рис. 9). Причем выявленные изменения в гиппокампе и неокортике носили разнонаправленный характер. Так в неокортике наблюдалось существенное повышение уровня триеновых конъюгатов и продуктов ТБКАП (на 79,7 и 61,6 %, соответственно $p < 0,05$) на фоне пониженного уровня диеновых конъюгатов (на 32,5% $p < 0,05$) и оснований Шиффа (на 41%). Степень окисленности мембран, оцениваемая по коэффициенту Клейна, также была снижена на 35% ($p < 0,05$). В отличие от неокортика, в гиппокампе крыс, перенесших тяжелую гипобарическую гипоксию на 14-16-е сутки гестации уровень всех компонентов ПОЛ был достоверно выше контрольных значений.

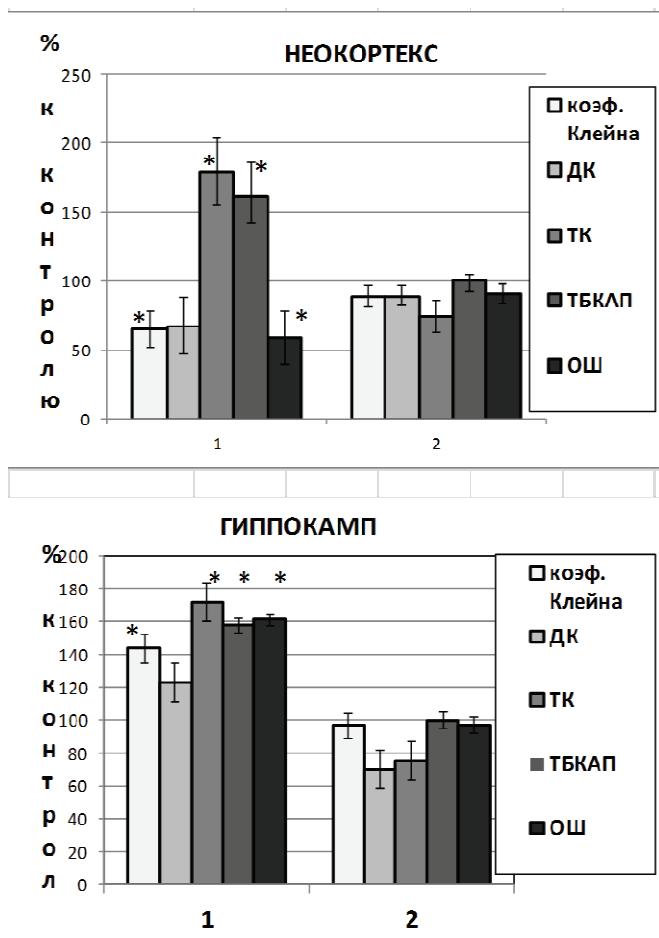


Рис. 9. Динамика изменения содержания продуктов ПОЛ в неокортике и гиппокампе 90-суточных крыс, подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии на 14-16-е (1) и 17-19-е (2) сутки гестации (коэффициент Клейна, диеновые конъюгантаны, триеновые конъюгантаны, активные продукты тиобарбитуровой кислоты, основания Шиффа). Уровень содержания ПОЛ контрольных 90-суточных крыс принимали за 100 %. (*-статистически достоверные отличия между контрольными и опытными животными $p < 0,05$)

Гипоксия, предъявляемая крысам на 17-19-е сутки в отличие от воздействия на 14-16-е сутки, не вызывает таких серьезных нарушений регуляции процессов ПОЛ мозге как у 14-суточных, так и взрослых животных.

Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о существенных различиях окислительных процессов протекающих в неокортексе и гиппокампе 14- и 90-суточных крыс переживших гипоксию на 14-16-е или 17-19-е сутки гестации. Наиболее выраженные нарушения уровня ПОЛ мы обнаружили в гиппокампе взрослых крыс перенесших тяжелую гипоксию на 14-16 сутки гестации. Такие длительные изменения уровня вторичных и третичных компонентов ПОЛ являются отражением структурно-функциональных повреждений мембран, которые сопровождаются нарушениями ферментативных и рецепторных реакций, что, несомненно, в дальнейшем может привести к изменению пластичности ответа клеточных мембран (Kishida and Klann 2007). Несовпадение и даже разнонаправленность в характере вызываемых пренатальной гипоксией изменений в уровне ПОЛ в неокортексе и гиппокампе, скорее всего, отображают качественные различия в липидном составе данных структур мозга, а также различия в динамике формирования их в ходе эмбриогенеза по отношению к срокам перенесенного воздействия. В механизмах развития гипоксической толерантности активные формы кислорода и другие свободные радикалы, индуцирующие специфические или неспецифические регуляторные процессы, приводящие, помимо всего прочего, и к изменениям экспрессии антиоксидантных белков (Строев и Самойлов 2007; Liu et al., 2005). С применением иммуногистохимического метода было показано, что гипоксия, перенесённая на 14-16-е (но не на 17-19-е) сутки пренатального онтогенеза, оказывает существенное влияние на состояние тиоредоксиновой антиоксидантной системы уже в первые сутки жизни, а последствия этого воздействия сохраняются и во взрослом состоянии. При этом характер этого влияния носит достаточно сложный характер и может различаться в зависимости от срока постнатального онтогенеза и области гиппокампа. В целом при всех индивидуальных особенностях конкретных гиппокампальных областей и при наличии связанных с этими особенностями исключений можно отметить общую тенденцию снижения у перенесших пренатальную гипоксию крыс (по сравнению с контрольными животными того же возраста) экспрессии Trx-1 на 3-и сутки жизни, затем её заметного повышения к 14-м суткам после рождения. Во взрослом состоянии вновь наблюдается снижение уровня экспрессии Trx-1 в нейронах ниже контрольного уровня. Эта тенденция прослеживается только в областях Аммонова рога (CA1, CA2, CA3), но не в зубчатой извилине (DG), где наблюдается иная динамика (рис. 10).

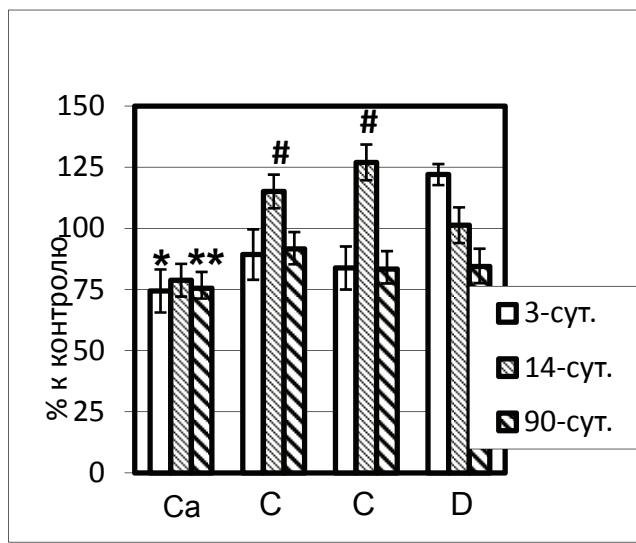


Рис. 10. Изменения общего числа Trx-1-иммунореактивных клеток (Nt) в различных образованиях гиппокампа (CA1, CA2, CA3, аммоновом роге –DG) у 3-, 14- и 90-суточных крыс, перенесших тяжелую гипобарическую гипоксию на 14-16 сутки гестации, в процентах к контролю. Статистическая достоверность: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем; # - $p < 0.05$ 14-суточные по сравнению с 3- и 90 - суточными.

Различия в реакциях определенных областей гиппокампа на пренатальную гипоксию

могут быть связаны с гетерогенностью созревания этих структур в онтогенезе и, соответственно, смещением временного «окна чувствительности» к пренатальной гипоксии.

Показано также, что гипоксия, перенесённая в пренатальный период, модифицирует также в разной степени экспрессию тиоредоксина-2, Cu, Zn-супероксиддисмутазы и Mn-супероксиддисмутазы в нейронах гиппокампа крыс, достигших взрослого возраста (80-90-е сутки постнатального онтогенеза).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленные исследования отечественных и зарубежных авторов показали, что у крыс критическим периодом в развитии головного мозга является последняя неделя беременности. В течение этого периода происходит активный нейрогенез в различных структурах мозга, обнаруживается миграция клеток к месту новой коры, обособление основных корковых областей, начало дифференцировки корковых слоев. Этот период (период позднего пренатального онтогенеза) является так же критическим для формирования центральных нейроэндокринных механизмов и различных форм адаптивного поведения (Науменко и др. 1990; Угрюмов, 1999). Воздействие неблагоприятных факторов и стресса на беременных крыс в течение последней трети гестационного периода вызывают целый комплекс функциональных и структурных изменений в центральной нервной системе плода, которые часто носят необратимый характер. В настоящей работе исследованы механизмы пролонгированного действия неблагоприятных факторов в позднем пренатальном онтогенезе на формирование мозга и поведения у крыс. Установлены возрастные границы критических периодов, определяющих характер морфофункциональных и поведенческих нарушениями, связанных с действием различных неблагоприятных факторов. Гетерогенность (определенная асинхронность) созревания различных структур мозга в этот период приводит к тому, что действие повреждающих факторов проявляется по-разному в

зависимости от сроковпренатального онтогенеза. Существенное значение имеет фактор времени предъявления воздействия - в начале или в конце последней неделипренатального онтогенеза. Так наиболее значимые изменения в поведении и способности к обучению, вызываемые действием гипобарической гипоксии, обнаруживаются в случаях, когда гипоксию предъявляли на 14-16-е суткипренатального онтогенеза.

Обнаружено, что гипоксия и дексаметазон неоднозначно воздействуют на функции мозга плода крысы, но их последствия прослеживаются в течение длительного периода, вплоть до взрослого состояния. Так гипоксия на 14-16-е сутки гестации в отличие от введения дексаметазона приводила к нарушениям рабочей памяти, но не затрагивала эмоциональную сферу, а дексаметазон вызывал разнонаправленные в зависимости от срока введения изменения уровня тревожности, формирования и угашения обстановочного оборонительного рефлекса. Таким образом, «окна уязвимости» для дексаметазона и тяжелой гипобарической гипоксии в ряде случаев не совпадают.

Обнаруженные в работе нарушения поведения и способности к обучению взрослых животных сопровождаются изменениями деятельности мозга на молекулярно-клеточном уровне. Убедительно показано, что тяжелая гипобарическая гипоксия или введение дексаметазона крыса на 14-16-е и 17-19-е суткипренатального онтогенеза, приводят к модификациям гормональной системы мозга, которые обнаруживаются у взрослых животных. Общее число имmunопозитивных клеток к глюко- и минералокортикоидным рецепторам (ГР и МР) в исследованных областях мозга взрослых животных близко к норме. С этим согласуется и отсутствие значимых изменений кривой стрессореактивности ГГАС у крыс самцов после пренатального воздействия тяжелой гипоксии. Показано снижение только количества имmunопозитивных клеток к ГР в неокортексе после воздействия гипоксии на 14-16-е и 17-19-е сутки гестации и введения дексаметазона на 17-19-е сутки пренатального онтогенеза, что свидетельствует о блокаде экспрессии ГР вследствие этих воздействий на поздних сроках пренатального онтогенеза.

Вместе с тем, обнаружено, что как при гипоксии, так и при введении дексаметазона существенно изменяется количество интенсивно имmunореактивных клеток, что свидетельствует о выраженной модификации экспрессии глюко- и минералокортикоидных рецепторов. Отсутствие изменений количества имmunопозитивных клеток к ГР и МР в зубчатой извилине, участвующей в реализации активности ГГАС по принципу отрицательной обратной связи, согласуется с отсутствием значимых нарушений стрессореактивности ГГАС у крыс самцов после пренатального воздействия тяжелой гипоксии. Обнаруженный нами дисбаланс содержания ГР и МР в гиппокампе и неокортексе, как следствие прена-

тальных воздействий повреждающих факторов, может приводить к гибели нейронов и нарушениям поведенческих реакций.

В наших исследованиях впервые установлено изменение активности основных внутриклеточных регуляторных систем (кальциевой и фосфоинозитидной), а также обнаружена модификация работы глутаматергической сигнальной трансдукции в неокортексе и гиппокампе крыс, подвергавшихся тяжелой гипобарической гипоксии в период пренатального развития. Причем наиболее значимые изменения вызывала гипоксия на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза. Введение дексаметазона в те же сроки пренатального развития, так же как и гипоксия приводило к активации фосфоинозитидной системы, причем в большей степени и не зависело от срока введения. Как известно, длительная активация фосфоинозитидной системы приводит к изменениям функциональной активности мозга, которая с возрастом может привести к развитию патологических состояний, в том числе способствовать развитию психоневрологических заболеваний.

Гипоксия, перенесённая на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза, оказывает существенное влияние на состояние антиоксидантной (тиоредоксиновой) системы в гиппокампе уже в первые сутки жизни, а последствия этого воздействия сохраняются и во взрослом состоянии, снижая уровень антиоксидантной защиты у этих животных. Повышение интенсивности процессов перекисного окисления липидов в гиппокампе взрослых крыс, подвергавшихся гипоксии на 14-16-е сутки гестации, согласуется со сниженным у этих животных уровнем эндогенной антиоксидантной защиты. Выраженные длительные изменения уровня перекисного окисления липидов приводят к деструкции клеточных мембран, что в последствии может способствовать развитию постстрессовых и нейродегенеративных патологий.

Таким образом, проведенные нами исследования влияния пренатальной гипоксии и дексаметазона на структуры переднего мозга вносят существенный вклад в современное состояние этой проблемы. Наиболее уязвимым периодом для формирования патологических состояний мозга при действии гипоксии является первая половина третьей недели пренатального периода развития. Нарушения поведения, способности к обучению связаны с определенной трансформацией биохимических процессов, протекающих в клетках мозга. Патологические воздействия в зависимости от сроков затрагивают не только структурные перестройки определенных образований мозга, но также и базисные молекулярно-клеточные механизмы, приводящие впоследствии к существенным изменениям функционирования мозга в целом. В основе развития такого рода патологии лежат модификации внутриклеточной сигнальной трансдукции, про- и антиоксидантных систем, нейрогормо-

нальных функций, индуцирующих нарушения активации транскрипционных факторов, мишенями которых являются про-адаптивные гены.

Полученные данные могут иметь важное значение для клинической практики, способствуя выявлению механизмов нарушения формирования когнитивных расстройств, связанных с гипоксией и другими неблагоприятными воздействиями в раннем онтогенезе. Следует отметить, что представленные обширные сведения о механизмах повреждения мозга после перенесенных повреждающих воздействий в период пренатального онтогенеза создают теоретическую основу для перспективного поиска медикаментозных и немедикаментозных способов коррекции возникающих в более поздние периоды жизни неврологических и психических болезней.

ВЫВОДЫ

1. Тяжелая гипобарическая гипоксия в пренатальном периоде развития приводит к устойчивым нарушениям соматического и сенсомоторного развития, двигательного, эмоционального, исследовательского поведения и способности к обучению у крыс, в основе которых лежат нарушения деятельности центральной нервной системы. Выявлены сходства и различия в эффектах действия тяжелой гипобарической гипоксии и дексаметазона в различные сроки пренатального онтогенеза крыс.
2. Выявлено участие гормональных и внутриклеточных процессов в механизмах формирования реакций мозга при воздействии гипоксии на различных этапах пренатального онтогенеза крысы. Последствия пренатальной гипоксии, проявляющиеся в определенных изменениях функциональной активности кальциевой и фосфоинозитидной регуляторных систем, обнаруживаются уже на самых ранних стадиях постнатального развития и сохраняются во взрослом состоянии.
3. Гипоксия, также как и введение дексаметазона, в пренатальном периоде онтогенеза вызывают задержку в соматическом и сенсомоторном развитии крыс в раннем постнатальном периоде вне зависимости от сроков предъявления повреждающего воздействия. Отставание в увеличении массы тела обнаруживаются сразу после рождения, а нарушения в сенсомоторной сфере только в начале второй недели жизни.
4. Гипоксия в пренатальном онтогенезе индуцирует длительно сохраняющиеся нарушения поведения и способности к обучению. У крыс, подвергавшихся воздействию гипобарической гипоксии на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза, наблюдается повышение уровня двигательной активности, выявлены нарушения формирования долговременной и рабочей памяти в водном лабиринте Морриса.

5. У крыс, подвергавшихся воздействию дексаметазона впренатальном периоде, в отличие от животных, испытавших действие гипоксии, наблюдаются отклонения в эмоциональном реагировании и способности к обучению в стрессовых ситуациях. В частности, введение дексаметазона на 14-16-е сутки впренатальном периоде развития приводит к сснижению, а введение дексаметазона на 17-19-е сутки – к повышению уровня тревожности в приподнятом крестообразном лабиринте у самцов крыс. Введение дексаметазона на 17-19-е сутки пренатального периода развития вызывает увеличение времени угашения обстановочного условного рефлекса у самцов крыс, в тоже время введение дексаметазона на 14-16-е сутки приводит к нарушению его формирования.

6. Механизмы регуляции гипоталамо-гипофизарно адренокортикальной системы вовлекаются в ответ организма на предъявляемую в период пренатального онтогенеза тяжелую гипобарическую гипоксию, что проявляется: повышением стрессореактивности гипоталамо-гипофизарно адренокортикальной системы и нарушении ее регуляции по принципу отрицательной обратной связи у самок (но не у самцов) крыс, переживших пренатальную гипоксию на 17-19-е сутки гестации; длительными модификациями экспрессии глюко- и минералокортикоидных рецепторов в гиппокампе и неокортексе в ответ на гипоксию. Введение дексаметазона на последней неделе пренатального онтогенеза также приводит к модификации активности глюко- и минералокортикоидных рецепторов, но степень и направленность обнаруженных нарушений отличается от вызываемых гипоксией.

7. Гипоксия впренатальном периоде индуцирует длительные изменения активности фосфоинозитидной внутриклеточной регуляторной системы мозга крыс, что проявляется повышением уровня содержания ключевого компонента фосфоинозитидной системы – фосфатидилинозитола-4,5-дифосфатов в гиппокампе и неокортексе 14-суточных крыс. Причем у крыс, подвергавшихся гипоксии на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза, эти изменения сохранялись и у взрослых крыс. Гипоксия вызывает значительное увеличение амплитуды фосфоинозитидного ответа на действие глутамата в срезах мозга 14-суточных крысят. При этом фосфоинозитидный ответ на действие глутамата обнаруживается и у взрослых животных, перенесших тяжелую гипоксию на 14-16-е сутки (но не на 17-19-е) гестации. Наряду с этим отмечается активация экспрессии инозитолтрифосфатного рецепторного комплекса в гиппокампе крыс. Введение дексаметазона на 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального онтогенеза также значительно повышает уровень содержания полифосфоинозитидов в гиппокампе и неокортексе взрослых крыс и экспрессию инозитолтрифосфатного рецепторного комплекса в гиппокампе.

8. Гипоксия, предъявляемая крысам на 14-16е сутки пренатального онтогенеза, вызывает отсроченные изменения активности глутаматергической сигнальной трансдукции, опосредуемой метаботропными глутаматными рецепторами, а также уровнем содержания внутриклеточного кальция, как у ювенильных, так и у взрослых животных.

9. Гипоксия, предъявляемая на 14-16-е сутки (но не на 17-19-е) пренатального онтогенеза, индуцирует выраженную длительную активацию процессов перекисного окисления липидов в гиппокампе и неокортексе крыс и снижение экспрессии пептидных антиоксидантов.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Семенов Д.Г., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Внутриклеточные механизмы глутамат- и холинергической сигнальной трансдукции, вовлекаемые в адаптивные реакции коры головного мозга// Физиол. ж. им. Сеченова. – 1995. - Т.81(8). - с. 51-55.
2. Тюлькова Е. И., Семенов Д. Г., Самойлов М. О. Участие кальциевой и фосфоинозидной систем внутриклеточной регуляции в адаптации нейронов срезов обонятельной коры мозга к гипоксии *in vitro* // Бюл. эксп. биол. и мед. -1998.- Т. 125, № 3. - С. 259-262.
3. Самойлов М.О., Семенов Д.Г., Тюлькова Е.И., Лазаревич Е.В. Участие внутриклеточных регуляторных систем в адаптивных эффектах краткосрочной аноксии *in vitro*//Физиол. Ж. им. И.М. Сеченова. - 1999, - т. 85(1). - С. 137-145.
4. 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 гипоксического прекондиционирования нейронов мозга// Физиол. Ж. им. И.М.Сеченова. - 2001. - Т. 87(6), - с. 714-729.
5. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Отелин 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. // ДАН. - 2001. – т. 381(1). - с. 1-3
6. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Влияние тяжелой гипоксии на эмоциональное поведение крыс: корректирующий эффект прекондиционирования// ДАН. - 2004. - т.395. - с. 109-111.
7. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Влияние прекондиционирования на нарушения выработки и воспроизведения условной реакции пассивного избегания, вызываемые тяжелой гипобарической гипоксией у крыс// Журнал ВНД им. И.П.Павлова. - 2004. – т. 54(6). – с. 795-801
8. S.A. Stroev, T.S. Gluschenko, E.I. Tjulkova, G Spyrou, E.A. Rybnikova, M.O.. Samoilov, . Pelto-Huikko. Preconditioning enhances the expression of mitochondrial antioxidant thioredoxin

in-2 in the forebrain of rats exposed to severe hypobaric hypoxia// Journal of Neuroscience Research , - 2004. - v.78. - p. 563-569

9. Stroev S.A., Tjulkova E.I., Gluschenko T.S., Rybnikova E.A., Samoilov M.O., Pelto-Huikko M. The augmentation of brain thioredoxin-1 expression after severe hypobaric hypoxia by the preconditioning in rats// Neuroscience Letters, - 2004, - v.370
10. Rybnikova E.A., Vataeva L., Tyulkova E., Gluschenko T., Otellin V., Pelto-Huikko M., Samoilov M.O. Mild hypoxia preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and n of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia// Behav. Brain Res.- 2005. – v/ 160(1) – p. 107-114
11. Ватаева Е.И., Тюлькова Е.И. Хожай Л.И., Отеллин В.А., Самойлов М.О. Обучение в водном лабиринте Морриса самок и самцов крыс, подвергавшихся действию гипоксии в различные сроки пренатального периода развития//Журн. эволюционной биохимии и физиологии. - 2005. - Т. 41(6). - С. 532-535
12. Stroev SA, Gluschenko TS, Tjulkova EI, Rybnikova EA, Samoilov M.O. 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).
13. Строев С.А., Тюлькова Е. И., Глущенко Т. С., Тугой И.А., Самойлов М. О. и Пелто-Хьюкко М. Влияние гипоксического прекондиционирования на экспрессию Mn-супероксиддисмутазы в гиппокампе крыс//Нейрохимия. - 2007. - 24(3). - с.229-234
14. Строев С.А., Тюлькова Е.И., Глущенко Т.С., Тугой И.А., Самойлов М.О., Пельто-Хьюкко М. Влияние умеренной гипобарической гипоксии на уровень экспрессии тиоредоксина-1 в гиппокампе крыс//Морфология. - 2008. - т. 133(1), - с. 20-24
15. Кислин М.С., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Динамика перекисного окисления липидов в гиппокампе и неокортике крыс после тяжелой гипобарической гипоксии//Нейрохимия.- 2009. - т. 26(3), - с. 213-219
16. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на активность фосфоинозитидной системы мозга крыс//Журнал эволюционной биохимии и физиологии. - 2010. - т.46, № 5,- с.406-409.
17. Кислин М.С., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Динамика перекисного окисления липидов мембран гиппокампа у не- и прекондиционированных крыс после тяжелой гипобарической гипоксии//Нейрохимия. 2010. т. 27, № 2, с. 144-149.
18. Е.И. Тюлькова, Л.А. Ватаева, М.О. Самойлов, В.А. Отеллин Механизмы формирования реакций мозга на действие гипобарической гипоксии в различные сроки пренаталь-

ного периода развития крыс//Журнал акушерства и женских болезней. - 2010. - т. 59, вып. 4, - с.99-110.

19. Кислин М.С., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Динамика перекисного окисления липидов мембран клеток и митохондриальной фракции неокортекса у не- и прекондиционированных крыс после тяжелой гипобарической гипоксии// Журнал эволюционной биохимии и физиологии. - 2011. - т.47(2). - с.157-164.
20. Тюлькова Е.И., Семенов Д.Г., Ватаева Л.А., Беляков А.В., Самойлов М.О Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на активность глутаматергической сигнальной трансдукции мозга крыс//Бюлл. эксп. биол. и мед. - 2011. - т. 151(3) - с. 224-227.
21. Строев С.А., Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О., Пельто-Хуйкко М.Т. Влияние пренатальной гипоксии на экспрессию тиоредоксина-1 в гиппокампе крыс на разных сроках постнатального онтогенеза//Нейрохимия. - 2011. - т. 28(3). - с. 226-231.
22. Stroev SA, Tjulkova EI, Samoilov MO, Pelto-Huikko MT. One- and three-time mild hypoxia modifies expression of mitochondrial thioredoxin-2 in hippocampus of rat//Acta Neurobiol Exp.- 2011. - v. 71,- p. 1-12.
23. Строев С.А., Тюлькова Е.И., Пелто-Хьюкко М.Т., Самойлов М.О. Трехкратная умеренная гипобарическая гипоксия снижает экспрессию Cu, Zn-супероксиддисмутазы в некоторых областях гиппокампа крыс//Бюлл. эксп. биол. и мед. - 2011.- т. 151(3).- с. 273-275.
24. Кислин М.С., Строев С.А., Глущенко Т.С., Тюлькова Е.И., Пелто-Хьюкко М. Т., Самойлов М. О. Гипоксическое прекондиционирование модифицирует активность про- и антиоксидантных систем гиппокампа крыс//Биомедицинская химия. – 2012. - № 6. - С. 332-336.
25. С. А. Строев, Е. И. Тюлькова, М. О. Самойлов, М. Т. Пелто-Хьюкко Сравнение эффектов однократной и трехкратной умеренной гипобарической гипоксии на экспрессию Cu, Zn-супероксиддисмутазы в гиппокампе крыс//Нейрохимия. – 2012 – т. 29(3), с. 1-6
26. Тюлькова Е.И., Кислин М.С., Ватаева Л.А. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на уровень перекисного окисления липидов в неокортексе и гиппокампе крыс//Нейрохимия. -2015. -Т. 32, № 1.- С. 64-70.
27. Тюлькова Е.И. Ватаева Л.А., Ветровой О.В., Романовский Д.Ю. пренатальная гипоксия модифицирует рабочую память и активности полифосфоинозитидной системы гиппокампа крысю// Журн. эволюц. биохим. и физиол. им. И.М.Сеченова. -2015. - Т. 51(2). - С. 115-121.
28. Строев С.А., Тюлькова Е.И. Ватаева Л.А., Миеттинен М. «Вызванная пренатальной гипоксией модификация экспрессии тиоредоксинов и супероксиддисмутаз в гиппокампе

крыс сохраняется по достижении ими взрослого состояния»//Нейрохимия. 2015. – Т. 32(3). - С. 1-9.

Публикации в сборниках научных трудов и материалах конференций:

29. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И. Особенности развития мозга и поведение крыс после действия гипоксии в различные периоды пренатального онтогенеза// Росс.физиолог.журнал. им.И.М.Сеченова, -2004, - т.90, №8, - с.168. Тезисы XIX съезда Физиологического общества, октябрь 2004, Екатеринбург.
30. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на активность фосфоинозитидной системы головного мозга крыс// Материалы конфер. «Нейрохимия:фундаментальные и прикладные аспекты». г. Москва. - 2005. - С. 67.
31. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А. Влияние гипобарической гипоксии в различные сроки пренатального онтогенеза на активность фосфоинозитидной системы головного мозга крыс// Материалы IV Российской конф. «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция». Москва. – 2005. - с.110
32. Vataeva L.A., Tjulkova E. Effect of time of prenatal mild or severe hypoxia on development of rat brain//7 International Congress of The Polish Neuroscience Society - 7-10.09.2005. - p.338
33. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Семенов Д.Г., Самойлов М.О., Отеллин В.А. Влияние тяжелой гипоксии в раннем и позднем пренатальном периоде развития на формирование адаптивных механизмов в постнатальном периоде. Тезисы докл. XX Съезда физиологического общества им. И.П.Павлова М., - 2007. - с. 173
34. Тюлькова Е.И., Семенов Д.Г., Ватаева Л.А., Самойлов М.О. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на активность внутриклеточных регуляторных систем мозга крыс// Материалы Пятой Российской конференции «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция». Москва. Патогенез. 2008. №3. - с. 89.
35. Тюлькова Е.И., Семенов Д.Г., Ватаева Л.А., Беляков А.В. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на активность внутриклеточных регуляторных систем мозга крыс// Сборник трудов Российско-Польского рабочего симпозиума, посвященного 50-летию сотрудничества Польской и Российской Академий наук. - 2009. - с.97-101
36. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на развитие соматических и сенсомоторных характеристик и способности крыс к обучению// Сборник трудов Российско-Польского рабочего симпозиума, посвященного 50-летию сотрудничества Польской и Российской Академий наук. - 2009. - с. 120-123
37. Stroev S.A., Tjulkova E.I., Vataeva L.A., Samoilov M.O. and Pelto-Huikko M. 3-time pre-natal (14–16 days) hypoxia modifies the expression of thioredoxin-1 in neurons of CA1, CA2 and CA3 hippocampal areas of rats in postnatal ontogenesis. // Abstract of report in 4th ESN

Conference on Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders. July 11-14, 2009. Leipzig, Germany. // Journal of Neurochemistry (J. Neurochem.). - 2009. - V. 110 (Suppl. 1), - P.25 (Abstr. № 67).

38. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И. Механизмы формирования адаптивных и патологических реакций мозга при действии гипобарической гипоксии в различные сроки пренатального периода//Тезисы докладов XXI-го съезда физиологического общества им. И.П.Павлова. Калуга. - 2010. - с. 108.
39. Stroev S.A., Tjulkova E.I., Vataeva L.A., Kislin M.S., Samoilov M.O., Pelto-Huikko M.T. The effect of prenatal hypoxia on expression of Trx-1 and lipid peroxidation products in rat hippocampus at different periods of postnatal ontogenesis.//Materials of III Symposium «The effect of chronic hypoxia on diseases at high altitude». Le Paz. Bolivia 13-23 October, - 2010.<http://zuniv.net/symposium3/sprog.html>)
40. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Кислин М.С., Строев С.А. Модификация баланса про- и антиоксидантных систем в мозге крыс, перенесших гипоксию в пренатальном онтогенезе. //Патогенез. 2011. т.9 №3. Материалы Шестой Российской конференции «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция». Москва. - 2011. - с. 68.
41. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А. Пренатальная гипоксия модифицирует активность фосфоинозитидной системы мозга крыс и их способность к обучению.//Сборник материалов Международной конференции «Фундаментальные науки и современная медицина». Минск, - 2012 . с. 319-322
42. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А. Пренатальная гипобарическая гипоксия вызывает изменения активности фосфоинозитидной системы мозга крыс и дефицит рабочей памяти//Фізіологічний журнал НАН України, 2012 т. 58, № 4, с.84. (Тезисы докладов 2-ой международной научной конференции «Высокогорная гипоксия и геном». Терскол, Кабардино-Балкарія, Россия. - 2012г.)
43. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Глущенко Т.С., Пивина С.Г. Влияние пренатальной гипоксии на функцию гипофизарно-адренокортиkalной системы и рабочую память у крыс.// Фізіологічний журнал НАН України. 2013. Т. 59. №6. С.117-124
44. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А. «Формирование патологических реакций мозга при действии экстремальных факторов среды в различные сроки пренатального периода» //Тезисы докладов XXII Съезда физиологического общества им. И.П.Павлова (г. Волгоград. 16-20 сентября), с. 533-534.
45. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А. Механизмы формирования реакций мозга на действие повреждающей гипоксии в различные сроки пренатального онтогенеза// Научные труды IV СЪЕЗДА ФИЗИОЛОГОВ СНГ Сочи –Дагомыс. Россия. - 2014. - С.61-62

Подписано в печать 09.07.2015
Тираж 100

Формат 60x84 $1/16$ Цифровая Печ. л. 2.0
Заказ № 12/07 печать

Типография «Фалкон Принт»
(197101, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Пушкарская, д. 54, офис 2,
Сайт: falconprint.ru)

