

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

На правах рукописи

Т Ю Л Ь К О В А
ЕКАТЕРИНА ИОСИФОВНА

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

Специальность 03.03.01 – физиология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант
Профессор, д.м.н. М.О. Самойлов

Санкт-Петербург
2015

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Современные представления о базисных молекулярно-клеточных механизмах повреждения и толерантности мозга взрослых животных к действию гипобарической гипоксии.....	16
1.1.1. Роль внутриклеточных сигнальных каскадов в формировании патологических и адаптивных реакций нейронов мозга	16
1.1.1.1. Фосфоинозитидная система мозга.....	19
1.1.1.2. Внутриклеточная Ca-система мозга.....	31
1.1.2. Участие системы перекисного окисления липидов в реакциях нейронов мозга на гипоксическое воздействие	41
1.1.3. Участие антиоксидантной системы в реакциях нейронов мозга на гипоксическое воздействие	45
1.1.4. Гормон-зависимые механизмы развития адаптации и патологии в реакциях мозга на гипоксическое воздействие	50
1.1.4.1. Классические теории адаптации. Понятие о стрессе	51
1.1.4.2. ГГАС – основная гормональная системы адаптации организма.....	52
1.1.5. Влияние тяжелой гипоксии/ишемии на поведение животных и способность к обучению.....	58
1.2. Современные представления о действии повреждающих факторов в раннем онтогенезе на развивающийся мозг.	59
1.2.1. Влияние гипоксии на развивающийся мозг	59
1.2.2. Энергетический метаболизм в мозге на ранних стадиях онтогенеза	66
1.2.3. Нейротоксичность глутамата и регуляция NMDA рецепторов в раннем онтогенезе.....	71
1.2.4. Системы внутриклеточной регуляции в незрелом мозге	72
1.2.5. Оксидативный стресс и гипоксия-ишемия в незрелом мозге	74
1.2.6. Апоптотические процессы в незрелом мозге	75
1.2.7. Кортикостероидные рецепторы в развивающемся мозге	80
1.2.8. Влияние гипоксии на поведение животных и способность к обучению на ранних стадиях онтогенеза.....	80
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	85
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	111
3.1. Соматическое и сенсомоторное развитие, особенности раннего постнатального обучения у крыс, перенесших воздействие тяжелой гипобарической гипоксии или дексаметазона в различные периоды пренатального онтогенеза.	111

3.1.1. Влияние гипоксической экспозиции и введения дексаметазона на общие показатели протекания беременности крыс.	111
3.1.2. Соматическое созревание у самцов и самок крыс линии Вистар после действия пренатальной гипоксии или дексаметазона.....	112
3.1.3. Развитие сенсомоторных реакций у самцов и самок крыс линии Вистар в раннем постнатальном периоде после действия пренатальной гипоксии или дексаметазона.	114
3.2. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками в различные сроки беременности, на выработку рефлексов на запаховые раздражители у их потомков в раннем постнатальном онтогенезе.	118
3.3. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками в различные сроки беременности, на способность их взрослых потомков к выработке и воспроизведению условно рефлекторной реакции пассивного избегания во взрослом возрасте	119
3.4.1. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на уровень двигательной активности в тесте «открытого поля их взрослых потомков.	120
3.4.2. Влияние введения дексаметазона в различные сроки пренатального онтогенеза на уровень двигательной активности в тесте «открытого поля» взрослых Крыс	121
3.5.1. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на поведение их взрослых потомков в приподнятом крестообразном лабиринте.	122
3.5.2. Влияние введения дексаметазона в пренатальном онтогенезе, на поведение взрослых крыс в приподнятом крестообразном лабиринте.	123
3.6.1. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками в различные сроки беременности, на поведение их взрослых потомков в лабиринте Морриса	125
3.6.2. Влияние введения дексаметазона самкам крыс в различные сроки беременности, на поведение их взрослых потомков в лабиринте Морриса	129
3.7.1. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на поведение их потомков в лабиринте Морриса (тестирование по протоколу «рабочей памяти»).....	130
3.7.2. Влияние введения дексаметазона самкам крыс в различные сроки беременности, на поведение их взрослого потомства в лабиринте Морриса (тестирование по протоколу «рабочей памяти»).	131

3.8. Влияние воздействия тяжелой гипоксии или введения дексаметазона в различные сроки пренатального онтогенеза на формирование и динамику угашения обстановочного оборонительного рефлекса и оборонительного условного рефлекса на звук у взрослых самцов крыс.	132
3.9. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на функцию гипоталамо-гипофизарно-адреналокортикальной системы...	134
3.9.1. Характеристика стрессореактивности гипофизарно-адреналовой системы у взрослых крыс, перенесших воздействие тяжелой гипоксии в разные сроки пренатального периода.....	134
3.9.2.1. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на иммунореактивность глюко- и минералокортикоидных рецепторов в неокортексе и гиппокампе крыс их взрослых потомков.	136
3.9.2.2. Влияние введения дексаметазона самкам крыс в различные сроки беременности, на иммунореактивность глюко- и минералокортикоидных рецепторов в неокортексе и гиппокампе крыс их взрослых потомков.	140
3.10. Состояние фосфоинозитидной системы мозга крыс, подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии в пренатальном периоде.....	146
3.10.1. Содержание фосфатидилинозитол-4,5-дифосфатов, фосфатидилинозитол-4-фосфатов и фосфатидилинозитолов в неокортексе и гиппокампе 14-ти и 90-суточных крыс.....	147
3.10.2.1 Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на уровень содержания фосфоинозитидов в мозге их потомков..	148
3.10.2.2 Влияние введения дексаметазона самкам крыс в различные сроки беременности на уровень содержания фосфоинозитидов в мозге их взрослых потомков.....	151
3.10.3. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на фосфоинозитидный ответ на аппликацию глутамата на переживающие срезы мозга их взрослых потомков.....	152
3.10.4. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на активность глутаматергической сигнальной трансдукции мозга их потомков.....	155
3.10.5. Влияние гипобарической гипоксии на активность инозитолтрифосфатного рецепторного комплекса.....	158
3.10.5.1. Иммуногистохимическое детектирование инозитол-3-фосфатного рецептора в CA1 области гиппокампа 14-и и 90-суточных крыс.....	158

3.10.5.2. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на иммунореактивность к IP3R-1 в области CA1 гиппокампа их потомков.....	160
3.10.5.3. Влияние введения дексаметазона самкам крыс в различные сроки беременности, на иммунореактивность к IP3R-1 в области CA1 гиппокампа их взрослых потомков.....	163
3.11. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на уровень перекисного окисления липидов в неокортексе и гиппокампе крыс.....	164
3.12. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на уровень пептидных антиоксидантов в гиппокампе крыс.....	171
3.12.1. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на уровень пептидного антиоксиданта тиоредоксина-1 в гиппокампе крыс в различные периоды постнатального онтогенеза.....	171
3.12.2. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на уровень тиоредоксина-2, Cu, Zn-супероксиддисмутазы и Mn-супероксиддисмутазы в нейронах гиппокампа крыс, достигших взрослого возраста.....	174
3.13. Влияние пренатальной гипоксии или дексаметазона на уровень апоптоза в перинатальном периоде.....	179
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	182
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	225
6. ВЫВОДЫ.....	228
7. ЛИТЕРАТУРА	230

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ – адренокортикотропный гормон

ВРС – внутриклеточные регуляторные системы

ГГАС – гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальная система

ГДФ – гуанозин дифосфат

ГР – глюкокортикоидные гормоны

ДАГ – диацил глицерол

ДФИ – дифосфоинозитиды/ фосфатидилинозитол,-4-фосфаты

МДА – малоновый диальдегид

МР –минералокортикоидные рецепторы

МФИ – монофосфоинозитиды/ фосфатилиинозитолы

ООС – отрицательная обратная связь

ПВЯ – паровентрикулярное ядро

ПКС – протеинкиназа С

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПФИ – полифосфоинозитиды (ДФИ+ТФИ)

ТБКАП - продукты, реагирующие с 2-тиобарбитуровой кислотой

ТФ – транскрипционный фактор

ТФИ - трифосфоинозитиды/ фосфатидилинозитол,-4,5-дифосфаты

УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания

ФИ - фосфоинозитиды

ФЛС – фосфолипаза С

цАМФ – циклический аденозин монофосфат

цГМФ – циклический гуанозин монофосфат

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

AMPA – AMPA активируемые глутаматные рецепторы

CREB – cAMP response element binding protein/цАМФ-респонс элемент связывающий белок

Cu,Zn-SOD – Cu,Zn-супероксиддисмутаза

HIF – hypoxia inducible factor/гипоксия индуцибельный фактор

ImGluRs – метаботропные глутаматные рецепторы первой группы

IP3 – инозитол -3-фосфат

IP3R – инзитолтрифосфатный рецепторный комплекс

Mn-SOD – Mn-супероксиддисмутаза

NMDA – N-метил-D-аспартат (агонист глутаматэргических NMDA-чувствительных рецепторов)

PKA – протеинкиназа А

RyR – рианодинновый рецепторный комплекс

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 неблагоприятных факторов, нередко бывают стойкими или носят необратимый характер. Негативное влияние на развитие ребенка в этот период могут оказать вредные привычки и заболевания матери, нарушения плодно плацентарного потока, а также неблагоприятные воздействия окружающей среды. По наблюдениям клиницистов, особое место среди факторов риска нарушений развития плода занимает гипоксия. Гипоксия плода является одним из самых часто встречающихся осложнений при беременности и родах. Внутриутробная гипоксия плода и асфиксия новорожденного, во многом определяющие уровень мертворождаемости, неонатальной и младенческой смертности, является одной из наиболее актуальных проблем акушерства и перинатологии. Значимость данной проблемы обусловлена не только существенными перинатальными потерями, но и тем, что гипоксия может оказывать крайне неблагоприятное 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.

Устойчивость плода к гипоксии зависит от степени его зрелости, уровня и характера метаболизма и многих других факторов. При пониженной резистентности плода к гипоксии увеличивается вероятность формирования отклонений в его развитии. В течение пренатального онтогенеза есть несколько критических периодов, когда восприимчивость плода к воздействию всякого рода неблагоприятным воздействиям, включая гипоксию, повышена. 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 гипоксию плода 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 значительными 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 особого 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. Его нарушения в зрелом мозге приводят к развитию ацидоза, окислительного стресса, повышению 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, фосфоинозитидной 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. При этом следует учитывать, что по сравнению со взрослым организмом плод в матке находится в условиях гипоксии. При этом полагают, что мозг плода не страдает от недостатка кислорода потому, что его потребности гораздо ниже, чем у взрослого, а гемоглобин крови плода обладает более высоким сродством к кислороду (Аршавский, 1982). Более того, высказывается предположение, что внутриутробная гипоксия является необходимым условием для развития ребенка (Аршавский, 1982).

Эффекты пренатальной гипоксии не всегда соотносятся со степенью ее тяжести. Первостепенное значение имеют сроки онтогенеза, в которые произошла экспозиция гипоксии. В течение пренатального и раннего постнатального онтогенеза выделяют несколько критических периодов, когда организм и, в особенности, мозг становится особенно восприимчив 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 aberrаций в клетках тканей организма, а также появлению таких пороков развития, как анэнцефалия, ацефалия, анофтольмия, 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 крыс. В качестве удобной экспериментальной модели для подобного рода исследований служит гипобарическая (высотная) гипоксия, создаваемую 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 (Dygalo et al., 1999; Wan S. et al, 2005). Предполагается, что глюкокортикоиды обладают разносторонним действием на головной мозг, многие стороны которого до конца не выяснены.

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-адренкортикальной системы, активности внутриклеточных сигнальных систем (кальциевой и фосфоинозитидной), соотношения про- и антиоксидантных систем в мозге крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза. Проведение сравнительного изучения влияния введения дексаметазона в пренатальном онтогенезе в те же сроки на модификацию функционирования нейроэндокринной системы и активности фосфоинозитидной системы мозга взрослых крыс.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ

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.

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, подвергавшихся воздействию гипоксии или дексаметазона в течение 3-ей недели пренатального онтогенеза коррелируют с длительными модификациями экспрессии глюко- и минералокортикоидных рецепторов в гиппокампе и неокортексе этих животных.

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

Впервые в примененном комплексном исследовании установлено, что тяжелая гипобарическая гипоксия в пренатальном периоде развития приводят к устойчивым нарушениям двигательного, эмоционального, исследовательского поведения и способности к обучению у крыс, 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 в различные сроки пренатального онтогенеза крыс.

Установлено, что отдаленные последствия влияния гипобарической гипоксии, проявляющиеся в нарушениях способности к обучению, изменении двигательной активности у крыс более выражены, если их воздействие приходится на возрастной интервал, включающий период позднего органогенеза и период гистогенеза. 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 внутриклеточной 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 в пренатальном 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 неокортексе).

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.

Работа посвящена исследованию одной из фундаментальных проблем нейробиологии, связанной с изучением патологических изменений деятельности мозга, вызванных воздействием тяжелой гипоксии в пренатальном 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 мозга. Сопоставление данных о влиянии гипоксии и введения дексаметазона в различные сроки пренатального онтогенеза дает представление о сходстве и различиях последствий этих воздействий у взрослых животных.

Полученные приоритетные данные вносят существенный вклад в понимание механизмов нарушения функций мозга, вызываемых тяжелой гипоксией в пренатальном 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 РАБОТЫ

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, Терск, 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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о базисных молекулярно-клеточных механизмах повреждения и толерантности мозга взрослых животных к действию гипобарической гипоксии

1.1.1. Роль внутриклеточных сигнальных каскадов в формировании патологических и адаптивных реакций нейронов мозга

При недостаточном обеспечении кислородом развивается гипоксия тканей организма. Гипоксия в выраженной степени лежит в основе многих патологических процессов в организме. Кроме того, “гипоксический риск” очень высок в ряде профессий, экстремальных состояниях в спорте и в клинической практике. Из всех функциональных систем организма к действию гипоксии наиболее чувствительны центральная нервная система, системы дыхания и кровообращения.

Исследования механизмов гипоксии проводились уже в конце 19 века. Изучение гипоксии связано с именами И.М.Сеченова, П.М.Альбицкого, Л.А.Орбели, Н.Н.Сиротинина, Н.А.Агаджаняна и других ученых. Именно наши ученые явились родоначальниками таких направлений, как проблемы гипоксии в реаниматологии и при критических состояниях (Неговский и др., 1979; Рябов, 1994), адаптация к гипоксии (Владимиров и др. 1945; Сиротинин, 1939). В конце 20 века начались исследования в области изучения механизмов гипоксии и адаптации к ней, проводившихся на молекулярном уровне (Меерсон, 1993; Самойлов, 1999; Lukyanova L., 1997).

Основным фактором, обуславливающим интерес к изучению метаболических изменений в ткани мозга при гипоксических воздействиях является высокая чувствительность центральной нервной системы к недостатку кислорода. Из всех систем организма именно ЦНС является наиболее узким звеном, которое определяет предел устойчивости всего организма в гипоксических условиях. В зависимости от интенсивности и продолжительности гипоксии метаболизм нервной системы становится дестабилизированным, что может приводить к патологическим изменениям или к гибели нейронов. В ЦНС наиболее чувствительными к гипоксии являются структуры с интенсивным кровоснабжением. При полной ишемии в коре головного мозга, гиппокампе и в мозжечке уже через 2-3 минуты возникают очаги некроза, а в продолговатом мозге даже через 10-15 минут погибают лишь единичные клетки (Lipton, 1999). Вместе с тем показано, что у людей, умерших от гипоксической комы, и лабораторных животных при гипобарической оксигенации (25мм.рт.ст. 15 минут) очаги некроза в головном мозге не обнаружены в отличие от случаев клинической или экспериментальной ишемии мозга.

Гипоксия, возникающая в результате недостатка кислорода во вдыхаемом воздухе, или при различных патологиях, таких как ишемия, асфиксия, апноэ (временная остановка дыхания) во время сна, церебро-васкулярные расстройства, инфаркт, некоторые нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, достигнув определенной степени, неизбежно вызывает структурные и функциональные нарушения в различных отделах мозга, и может приводить у человека и животных к выраженным изменениям поведения, затрагивая, прежде всего, процессы, опосредующие обучение и память.

Сто лет тому назад, на рубеже XIX и XX веков, в работах И.М. Сеченова и И.П. Павлова был заложен новый, диалектический по своему характеру, подход к изучению живого организма. Суть этого подхода состоит в осознании нераздельности и единства системы, состоящей из организма и окружающей его среды. И.П. Павлов (Павлов, 1952) отмечал, что «животный организм как система существует среди окружающей природы только благодаря непрерывному уравниванию этой системы с внешней средой, т. е. благодаря определенным реакциям живой системы на падающие на нее извне раздражения, что у более высших животных осуществляется при помощи нервной системы в виде рефлексов». В 1935 году Бауэр сформулировал принцип устойчивого неравновесия биосистем со средой (цит. по: Самойлов, 1999). Соотнесение принципов Павлова и Бауэра приводит к представлению о живой системе, как о системе, способной активно поддерживать неравновесность своего состояния относительно среды и уравнивать внешние воздействия, чреватые нарушением постоянства этого неравновесного состояния.

Развивая учение И.П. Павлова, П.К. Анохин (Анохин, 1968) отмечал, что, хотя у высших организмов действие внешних факторов и опосредовано, как правило, нервной системой и рефлекторной деятельностью, но конечным этапом формирования сигнальной связи является, так же как и у низших, протоплазма клеток. Эволюция изменила лишь «средство доставки» информации, но ее конечная обработка осуществляется на одних и тех же путях и даже, видимо, одним и тем же молекулярным способом. Таким образом, происходит предсказанный Павловым еще в конце XIX века переход от «органной» физиологии к «физиологии живой молекулы» (Павлов, 1952).

Острая тяжелая гипобарическая гипоксия является мощным стрессовым воздействием, которое индуцирует изменения функционального состояния нейронов мозга и целый ряд молекулярно-клеточных нарушений. Среди этих нарушений, прежде всего, следует отметить вовлечение в них процессов сигнальной трансдукции, основными звеньями которой являются восприятие сигналов и их передача в нервных сетях. В соответствии с современными представлениями, центральная роль в этих процессах

принадлежит внутриклеточным регуляторным системам (ВРС), опосредующим гормональные, нейромедиаторные и иные воздействия и управляющим метаболизмом, пролиферацией, ростом, дифференцировкой и гибелью клеток.

К ключевым ВРС относятся *кальциевая, фосфоинозитидная, циклоаденозин- и циклогуанозинмонофосфатные системы*. При этом каждая ВРС работает в тесной взаимной связи и взаимной регуляции с остальными. ВРС являются сложноорганизованными системами и могут включать не только вторичные посредники с их предшественниками, но также специфические протеинкиназы, Ca^{2+} -связывающие белки, протеазы, нуклеазы, ферменты синтеза и распада компонентов внутриклеточной регуляторной системы, ионные каналы, внутриклеточные буферные системы и другие компоненты (Самойлов, 1999).

Экстраклеточные лиганды, называемые *первичными посредниками, или мессенджерами*, взаимодействуют с клеточными рецепторами – молекулами белковой природы, которые инициируют образование химических соединений, запускающих внутриклеточные процессы сигнальной трансдукции. Такие промежуточные соединения несут в себе информацию о первичном регуляторном сигнале и являются вторичными его переносчиками, поэтому они получили название *вторичных посредников, или мессенджеров* (second messenger). Вторичные мессенджеры — это компоненты системы передачи сигнала в клетке, малые сигнальные молекулы; они быстро образуются и далее активируют эффекторные белки, которые опосредуют ответ клетки. К наиболее распространенным вторичным посредникам относятся цАМФ и цГМФ (Sutherland, 1957; Rall E.A., 1957, Hardmann, 1962), ионы кальция, инозиттрифосфат (Berridge, 1984), оксид азота и др. Концентрация вторичных посредников в цитозоле может быть повышена различными путями: активацией ферментов, которые их синтезируют, как, например, в случае активации циклаз, образующих циклические формы нуклеотидов (цАМФ, цГМФ), либо путем открытия ионных каналов, позволяющих потоку ионов, в частности, кальция войти в клетку. Эти малые молекулы могут далее связывать и активировать эффекторные молекулы — протеинкиназы, протеазы и другие белки.

Острая тяжелая гипобарическая гипоксия индуцирует изменения функционального состояния нейронов мозга и целый ряд молекулярно-клеточных нарушений, среди которых, согласно современным представлениям, прежде всего следует отметить эффекты, вызванные значительным повышением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} (Bickler, Hansen, 1994; Bano, Nicotera; 2007), обусловленное гиперактивацией NMDA-рецепторов (Arundine, Tymianski; 2004; Choi, Rothman, 1990; Forder, Tymianski, 2009).

Полагают, что резкое увеличение содержания внутриклеточного кальция играет одну из ключевых ролей в запуске каскада молекулярно-клеточных механизмов, в том числе с участием фосфоинозитидной (Lahiri, 2003) и прооксидантной систем (Abramov, 2007).

1.1.1.1. Фосфоинозитидная система мозга

Фосфоинозитидная регуляторная система.

Фосфоинозитиды (ФИ) – семейство минорных мембранных фосфолипидов, которые играют важную роль во многих сигнальных путях в клетке. Фосфоинозитидная сигнальная трансдукция принимает участие в процессах роста клеток, пролиферации, апоптоза, изменениях цитоскелета и др. Особую роль эти процессы играют в нервных клетках. Пионерские работы Лоуэлл и Мейбл Хокиных в 50-х годах прошлого века впервые предположили участие ФИ в сигнализации в биологии и биохимии после того как ими была открыта возможность последовательного фосфорилирования фосфатидилинозитидов (монофосфоинозитидов, МФИ) до фосфатидилинозитол-4-фосфатов (дифосфоинозитиды, ДФИ) и фосфатидилинозитол_4,5-дифосфатов (трифосфоинозитиды, ТФИ) (Hokin, Hokin.1953). Дальнейшие исследования показали участие ДФИ и ТФИ в механизмах внутриклеточной агонист-зависимой сигнальной трансдукции в клетке. В последние 20 лет появилось много фундаментальных работ, посвященных фосфоинозитидному циклу в клетке (Bunce, 2006; Neck, 2007, Doughman, 2003; Czech, 2000). На сегодняшний день трудно найти физиологический процесс, который бы не опосредовался фосфоинозитид-зависимой сигнальной трансдукцией.

Факт, что фосфоинозитиды являются минорной составляющей клеточных мембран (МФИ составляют около 10% общих липидов мембран, а ТФИ - менее 1%), говорит о том, что эти липиды не осуществляют структурной функции, а выполняют в основном регуляторные функции, такие как сигнальная трансдукция. В настоящее время установлено, что ФИ инициируют сигнализацию путем взаимодействия с большим количеством белков (в частности, с G-белками). Такие липид-белковые взаимодействия могут приводить к изменению свойств и функций белков, перераспределению их в клетке (в основном из цитоплазмы к плазматической мембране), к их конформационным изменениям, которые могут приводить к изменению их активности. В свою очередь липид-белковые взаимодействия модифицируют сами липиды – фосфорилирование и дефосфорилирование, гидролиз. Следствием данных изменений является активация внутриклеточных сигнальных каскадов, участвующих в процессах пролиферации, дифференциации, миграции и роста клеток, инициации некроза и апоптоза, секреции и

аутофагии и т.д. (Choi et al., 2013; Choe, Ehrlich 2006; Ivanova et al., 2014; Kiviluoto et al. 2013; Ruiz et al., 2009; Chang et al., 2014).

Фосфоинозитиды способны играть роль вторичных посредников при передаче гормонального сигнала благодаря диэстерному распаду. При этом имеет место следующая последовательность событий: взаимодействие гормона с рецептором приводит к активации сопряженного с рецептором гуаниннуклеотидсвязывающего белка (G-белка), представляющего собой гетеротример. Эта активация состоит в замене связанной с α -субъединицей G-белка молекулы ГДФ на молекулу ГТФ. При этом белок претерпевает конформационные изменения и распадается на две субъединицы — α , находящуюся в цитозоле и $\beta\gamma$, связанную с мембраной. Разделившиеся в результате диссоциации субъединицы активируют фосфолипазу C (ФЛС) (Ткачук, 1998).

К настоящему времени известно более десяти белков (не считая продуктов альтернативного сплайсинга), относящихся к семейству ФЛС. Все они ответственны за гидролиз ТФИ до инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3) и 1,2-диацилглицерина (ДАГ) (Nishizuka, 1992; Rhee, 1991; Rhee, Bae, 1997; Rhee et al., 1989) (Рис. 1). В ряде работ семейство ФЛС разделяют на три крупные подсемейства — β , γ и δ (Медведева, 1999; Berridge, 1993; Rhee, Bae, 1997). Передача сигналов от многих рецепторов, сопряженных с G-белками, происходит с помощью инозитол-1,4,5-трифосфата и 1,2-диацилглицерина. Эти вещества образуются при диэстерном гидролизе мембранного липида — фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата. Диэстерный гидролиз полифосфоинозитидов осуществляется Ca^{2+} -зависимой ФЛС (Kemp et al., 1961) или фосфатидилинозитидфосфодиэстеразой (КФ:3.1.4.11), которая обнаружена как в цитозоле, так и на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны. В результате этой реакции образуются водорастворимые IP3 и ДАГ (Рис. 1). Последний может в дальнейшем участвовать в синтетических реакциях.

Инозитол-1,4,5-трифосфат вызывает высвобождение кальция из внутриклеточных структур, а 1,2-диацилглицерин активирует протеинкиназу C (Рис. 2). Инозитол-1,4,5-трифосфат и 1,2-диацилглицерин участвуют в регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки и опосредуют действие многих гормонов и нейромедиаторов.

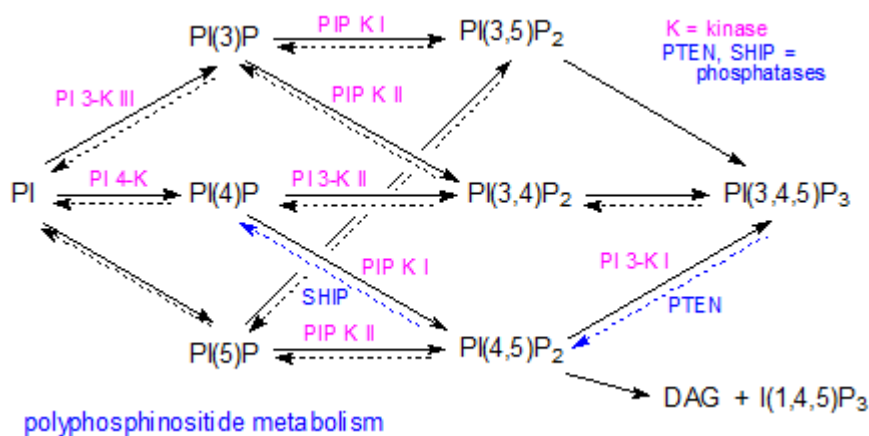


Рис. 1. Пути метаболизма полифосфоинозитидов. (Michell, R.H., 2008).

Фосфатидилинозитол (PI) синтезируются на эндоплазматическом ретикулеуме, откуда транспортируются к другим мембранам. Фосфорилирование по 4-му положению кольца с образованием фосфатидилинозитол-4фосфата (ДФИ (PI4P) происходит преимущественно в аппарате Гольджи и на плазматической мембране. В аппарате Гольджи ДФИ играет важную роль в транспорте везикул, покрывающих протеины и другие факторы. На плазматической мембране ДФИ в основном играет роль предшественника фосфатидилинозитол (4,5) дифосфатов - ТФИ (PI(4,5)P₂), локализованными преимущественно на плазмалемме, где они и осуществляют свои функции вторичных посредников (Рис. 2).

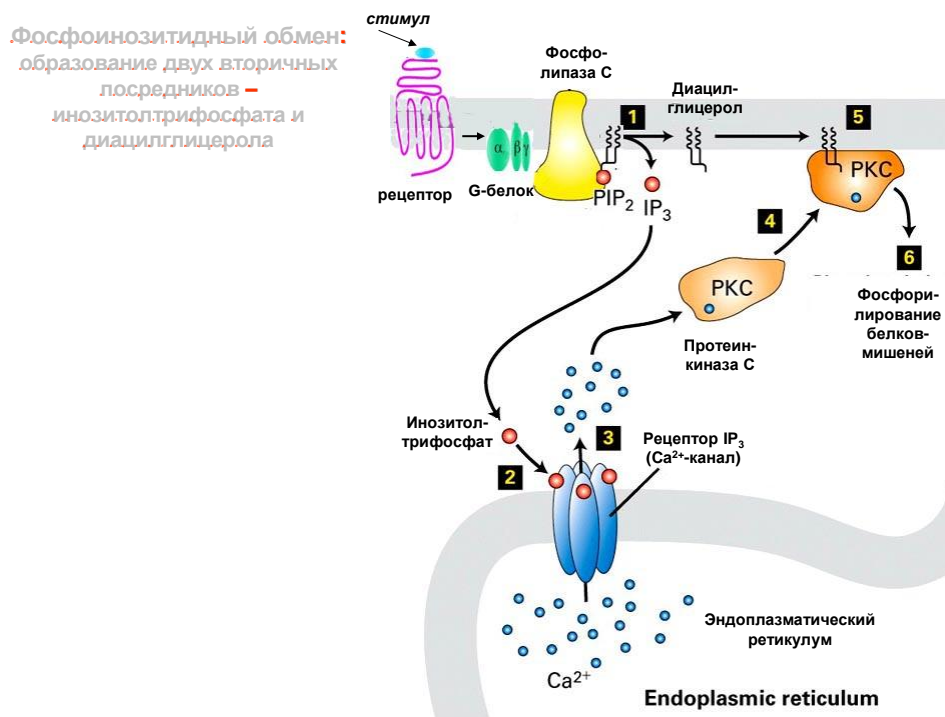


Рис. 2. Фсфоинозитидная система внутриклеточной регуляции.

Если в системе цАМФ трансмембранный перенос информации происходит с образованием одного вторичного посредника, то в фосфоинозитидной системе идет раздвоение пути передачи сигнала, так как в результате образуются два различных вторичных посредника: диацилглицерин и инозитолтрифосфат. Они действуют в клетке согласованно и активируют соответствующие пулы протеинкиназ.

Инозитолтрифосфат стимулирует высвобождение кальция из эндоплазматического ретикулума, при этом активируется семейство Са-КМ-зависимых протеинкиназ (Рис. 2). Его концентрация, необходимая для достижения максимальной скорости высвобождения Ca^{2+} из депо эндоплазматического ретикулума, в нервной ткани существенно ниже (0,2 мкМ) по сравнению с другими тканями (0,8-1,0 мкМ). Таким образом, чувствительность эндоплазматического ретикулума к инозитолтрифосфату в клетках нервной системы может быть наиболее высокой.

Инозитолтрифосфат, очевидно, не единственный из инозитолфосфатов, выступающих в роли вторичного посредника. Образующийся в результате фосфорилирования инозитолтрифосфата инозитолтетрафосфат также участвует в регуляции поступления внеклеточного Ca^{2+} в цитоплазму. Вход Ca^{2+} в клетку в этом случае происходит не через рецептор-зависимые Са-каналы, а каким-то иным, пока неизвестным способом.

ПФИ являются основным, хотя и не единственным (арахидонат может высвобождаться и из других ФЛ, например из фосфатидилхолина), источником выделения свободной арахидоновой кислоты. Гидролиз фосфолипидов, содержащих *арахидоновую кислоту*, приводит к ее высвобождению для синтеза простагландинов. Этот процесс является важным звеном в регуляции различных физиологических функций. Показано, что при гормональных стимуляциях распадаются преимущественно молекулы ТФИ, содержащие арахидоновую кислоту. Существует два возможных пути для освобождения арахидоновой кислоты из ФИ. Первый включает катализируемое фосфодиэстеразой образование 1,2-диацилглицерина и высвобождение на следующем этапе арахидоновой кислоты под влиянием моно- и диглицеридлипазы. Другой путь — деацилирование ФИ фосфолипазой А2 с образованием лизофосфатидилинозита и свободной жирной кислоты (Кучеренко, Блум, 1986).

Диацилглицерин служит источником арахидоновой кислоты (эстерифицирует второй гидроксил глицерина в структуре диацилглицерина), активирующей гуанилатциклазу. Этот путь регуляции имеет особое значение для реализации эффектов холинергической импульсации и функции мускаринчувствительных холинорецепторов и Н1-рецепторов гистамина, для которых роль цГМФ как вторичного посредника

общепризнана. Следовательно, в системах вторичных посредников — цГМФ и фосфоинозитидной — существует функциональная взаимосвязь через стадию образования арахидоната, обеспечивающая интегральный характер трансинаптической регуляции биохимических процессов в клетке.

Гиперпродукция ретроградных посредников – арахидоновой кислоты и окиси азота играют важную роль в развитии патологических (постгипоксических) нарушений (Kaplan et al., 1987; Szatkowski, Attwell, 1994; Bazan et al., 1995; Katsuki et al., 1995; Panahian et al., 1996). Токсическое действие арахидоновой кислоты связано с вовлечением её метаболитов в генерацию супероксид-аниона (Katsuki et al., 1995). Из арахидоновой кислоты образуются простагландины и тромбоксан. Кроме того, под действием соответствующей киназы диацилглицерин превращается в фосфатидную кислоту. Предполагается, что фосфатидная кислота обладает Са-ионофорными свойствами. Так, фосфатидная кислота накапливается в мембранах клеток при действии Са-агонистов. Образовавшаяся из диацилглицерина фосфатидная кислота индуцирует поступление в клетку внешнего кальция и накопление его в примембранном слое цитоплазмы. Результатом локального повышения концентрации Ca^{2+} является инаktivация электровозбудимых Са-каналов. Таким образом, система метаболизма фосфатидилинозитидов может регулировать внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} как посредством увеличения потока Ca^{2+} через плазматическую мембрану, так и за счет выхода Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

Наконец, диацилглицерин активирует также протеинкиназу, связанную с плазмалеммой, — фосфолипид-зависимый, Са-активируемый фермент — протеинкиназу С. Протеинкиназа С представляет собой большое семейство изоферментов, разделяющееся на три группы: ферменты, регулируемые ионами Ca^{2+} и диацилглицерином; ферменты, регулируемые только диацилглицерином; ферменты, не связанные ни с Ca^{2+} , ни с диацилглицерином. Только первая из этих групп, наиболее изученная, регулируется фосфоинозитидной внутриклеточной регуляторной системой (Ткачук, 1998).

Протеинкиназы, как и сопряженные с ними G-белки, имеют различную преимущественную локализацию в клетках нервной ткани. Так, аденилатциклаза и протеинкиназа С присутствуют в высоких концентрациях в мозжечке, но С-киназа (так же, как и G-киназа) локализована в клетках Пуркинье, в то время как аденилатциклаза — в гранулярных клетках. Таким образом, разные типы клеток мозга адаптированы к сигналам, активирующим синтез различных вторичных посредников: цАМФ, цГМФ, инозитолтрифосфата и диацилглицерина. В мозжечке рецепторов фосфоинозитидной системы примерно в 500 раз больше, чем в периферической нервной ткани.

Протеинкиназа С обнаружена в разных тканях млекопитающих и лишена строгой тканевой и видовой специфичности. Однако в мозге ее концентрация является наибольшей. Субклеточное распределение протеинкиназы С неодинаково в разных тканях и органах: фермент преимущественно локализован в цитозоле клеток сердца и в мембранной фракции клеток мозга.

Наибольший активирующий эффект на протеинкиназу С (ПКС) оказывают диацилглицерин и в меньшей мере фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин и фосфатидная кислота. Диацилглицерин увеличивает сродство ПКС к фосфолипидам. При этом ПКС становится чувствительной к физиологическим концентрациям Ca^{2+} в клетке. Диацилглицерин быстро образуется в ответ на сигнал-рецепторное взаимодействие и быстро разрушается (время существования до 1 мин), что в конечном итоге и определяет его свойства как вторичного посредника. Известно, что сродство С-киназы к плазматическим мембранам увеличивается во время активации. Для транслокации киназы необходим Ca^{2+} . Индуцированное инозитолтрифосфатом увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} может активировать С-киназу при встраивании ее в мембраны. Протеинкиназа С подвергается аутофосфорилированию в присутствии Ca^{2+} и фосфолипидов. Физиологическое значение этого процесса состоит, вероятно, в повышении активности киназы. Активированная и локализованная на наружной мембране С-киназа обуславливает активацию транскрипционных факторов Fos и Jun, фосфорилирование белковых компонентов ионных каналов, изменяя тем самым их проницаемость (Чернышева, 1995). Кроме того ПКС, как и Ca^{2+} , способна непосредственно воздействовать на ДНК. Оказывая влияние на фосфорилирование белков ионных каналов и рецепторов, а также регуляторных пептидов, протеинкиназа С играет одну из ключевых ролей в модификации ионной проницаемости, возбудимости нейронов и синаптической передачи, т.е. в базальных механизмах нейрональной пластичности.

Фосфорилирующая способность С-киназы может быть сохранена достаточно долго после прекращения действия вторичных посредников (Ca^{2+} , инозитолтрифосфата и диацилглицерина), что наводит на мысль об участии этого процесса в долговременном хранении информации в нейронах мозга - органа с наибольшей активностью протеинкиназы С.

В развитии постгипоксических нарушений протеинкиназам принадлежит особая роль. Протеинкиназа С быстро транслоцируется в плазмолемму и в течение длительного времени находится в активном состоянии (Lin et al., 1991; Domanska-Janik, Zablocka, 1993). В случае ее ингибирования блокируется постишемическое повреждение нейронов гиппокампа (Cardell, Wieloch, 1993). Аналогичный результат обнаруживался и при ее

ингибировании после длительной аноксии нейронов первичной культуры гиппокампа (Maiese et al., 1993).

Все представители семейства полифосфоинозитидов, различающиеся по количеству и положению фосфатных групп в инозитольном кольце, локализуются в различных компартментах клетки, осуществляя (контролируя) специфические внутриклеточные взаимодействия (Рис. 3). Во многих случаях они выступают как ко-рецепторы совместно с мембранными белками для связывания цитозольных протеинов, участвуют в трансмембранном транспорте протеинов. Уровень различных ПФИ в значительной степени регулируется пространственным и временным взаимодействием киназ и фосфатаз, которые фосфорилируют или дефосфорилируют ФИ в определенных положениях инозитольного кольца. Различная локализация каждого из этих ферментов на специфических мембранах определяет распределение отдельных представителей семейства ПФИ, несмотря на постоянный мембранный поток из одного компартмента клетки в другой.

Недавно показано, что ТФИ и другие ФИ, расположенные на «цитозольной» стороне мембранного бислоя играют особую роль. Их фосфорилированные «головки» связаны с различной степенью сродства и специфичности со многими белковыми модулями, что позволяет им участвовать в процессах синтеза и регуляции их активности на внутренней стороне мембраны. Т.о. они контролируют широкий спектр внутриклеточных процессов, включая образование и активацию сигнальных путей, укрепление мембранных комплексов, динамику актина и микротрубочек, транспорт ионов и метаболитов через мембрану. (di Paolo, De Camilli, 2006; Czech, 2003; Martin 1998; Roth, 2004). Одновременно с высвобождением кальциевых ионов инозиттрифосфат стимулирует вход Ca^{2+} в ядро клеток (Petersen, 1996). Фосфорилирование IP3 приводит к образованию IP4, который в качестве кальциевого ионофора участвует в перераспределении Ca^{2+} между внутриклеточными компартментами, а также способствует пополнению истощающихся запасов Ca^{2+} в ЭПР (Nahorski, Potter, 1989; Berridge, 1993).

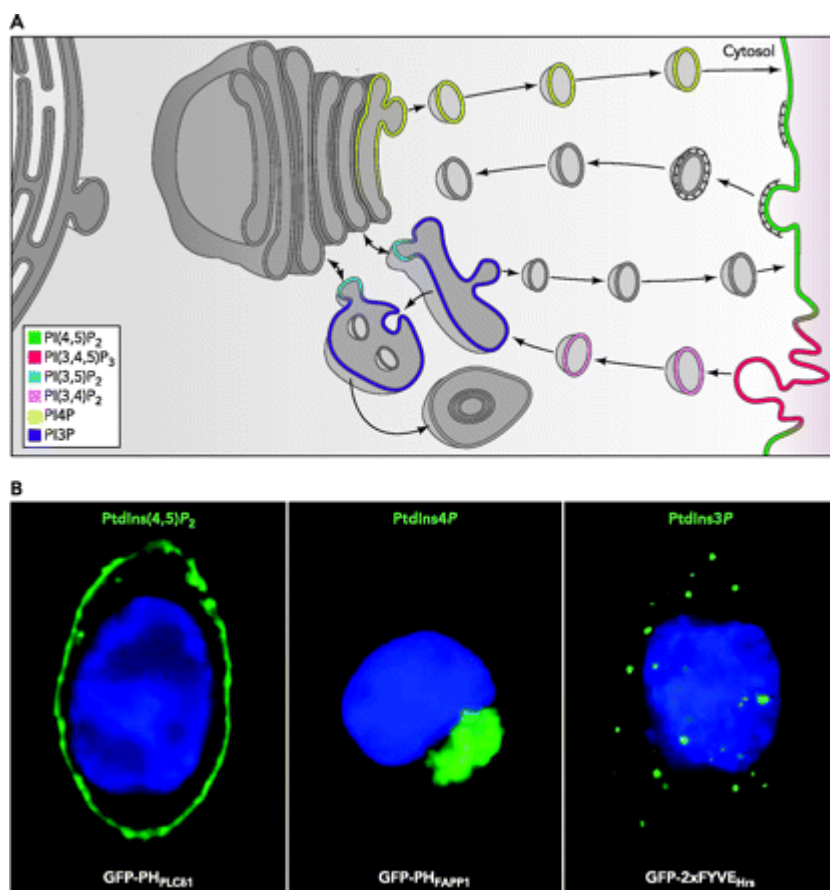


Рис. 3. Внутриклеточная локализация отдельных представителей семейства полифосфоитнозитидов. (McCrea HJ and De Camilli P. Mutation in phosphoinositide metabolizing enzymes and human disease//Physiology 24: 8-16. 2009)

В конце 60-х годов было показано присутствие ФИ в ядре. (Rose HG, 1965) Группой Манзоли была выдвинута гипотеза, что ПФИ в ядре участвуют не только, как липидные компоненты, но и участвуют в ядерных процессах (Manzoli et al., 1982). В последние годы появилось много работ доказывающих присутствие ТФИ на ядерной мембране, где они выступают как вторичные посредники (расположенные на ядерной оболочке) и как регуляторы экспрессии генов (при локализации во внутриядерном пространстве) (Barlow et al., 2010; Akhtar and Gasser, 2007; Bunce, 2006; Faenza et al., 2008; Martelli et al., 2011; Tamiya-Koizumi, 2002; Ye and Ahn, 2008; York, 2006) (Рис. 4). На сегодняшний день показано, что ядерные фосфоинозитиды и производные инозитол фосфатов вовлекаются в широкий спектр функций, включая дифференцировку, пролиферацию, апоптоз, реакции на стресс и экспрессию генов (Cocco, 2001, Gonzales, 2006, Irvine, 2003). Показано, что производные инозитолтрифосфата участвует в модуляции ядерных функций путем регулирования модификации гистонов (Burton et al., 2013).

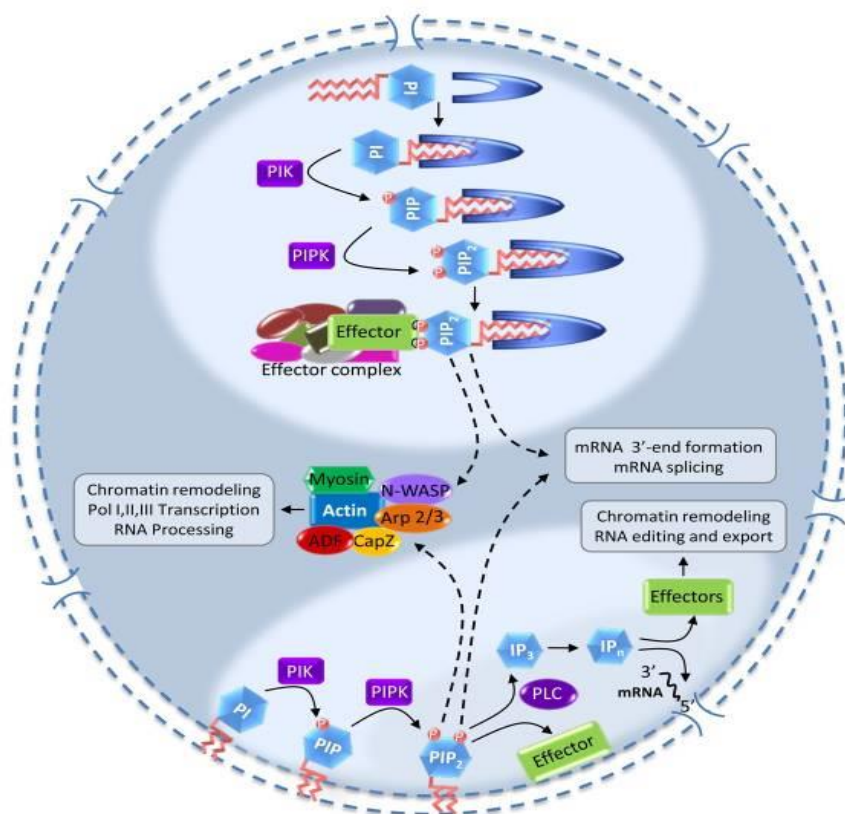


Рис. 4. Различная компартиментализация ФИ- сигнализации в ядре клетки. Определены 2 цикла: - один, связанный с ядерной оболочкой, - другой в субъядерном пространстве. В обоих компартментах ФИ фосфорилируются до ТФИ и гидролизуются посредством активации ФЛС до IP_3 и далее до IP_n . (Barlow et al., 2010).

Мутации генов ферментов метаболизма фосфоинозитидов приводят к большому количеству различных заболеваний, таким как нейропатия (Robinson and Dixon, 2005.), онкология (Osaki et al., 2004), диабет (Marion et al., 2002), шизофрения (Stopkova et al., 2004), болезнь Дауна, болезнь Альцгеймера (Berman et al., 2008; Oliveira et al., 2010; Sanchez-Mejia and Mucke, 2010) и др.

Участие ПФИ в патологических процессах в значительной степени зависит от состояния компонентов соответствующей внутриклеточной системы сигнальной трансдукции. Умеренная активация полифосфоинозитидной системы вовлекается в формирование адаптивных реакций мозга, а гиперактивация – патологических реакций (Самойлов, 1995).

Один из возможных механизмов вовлечения ПФИ в развитие патологии состоит в том, что IP_3 , взаимодействуя с собственными рецепторами внутриклеточных депо, вызывает выброс Ca^{2+} в цитоплазму и ядро и запуск Ca^{2+} -зависимых процессов (активация

протеинкиназы С (PKC) и других киназ, взаимодействие с Ca^{2+} -связывающими белками (кальмодулин, парвальбумины, S-100), и др.) (Berridge, 1984; Berridge, 1993).

Инозиттрифосфатный рецепторный комплекс.

Повышение концентрации кальция в цитозоле происходит за счет входа наружного кальция и высвобождения его из внутриклеточного кальциевого депо – эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и других эндогенных кальциевых хранилищ. Высвобождения кальция из ЭПР (или поступление кальция извне) происходит, когда в возбудимых клетках возникает потенциал действия. Выход Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума, помимо активации потенциалом действия в возбудимых клетках, запускается каскадом сигналов, берущих начало от рецептора на клеточной мембране. Важным звеном этого процесса является активация фосфолипазы С, что приводит к гидролизу мембранных липидов - фосфатидилинозитол 4,5-дифосфатов, с образованием инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3) (Berridge 1993). IP3 выходит в цитоплазму и связывается с инозитолтрифосфатными рецепторами (IP3R), которые являются внутриклеточными лиганд-управляемым Ca^{2+} каналами (Ferris et al. 1989), локализованными в первую очередь на мембране ЭПР (Ferrerri-Jacobia et al. 2005). ЭПР является основным «хранилищем» внутриклеточных запасов Ca^{2+} . Концентрация свободных Ca^{2+} в ЭПР, оценивается в сумме от 100 до 700 мкм (Alvarez and Montero 2002). В отличие от концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме от 50 до 100 нм, что на 3-4 порядка меньше, чем в ЭПР. Это низкая концентрация поддерживается Ca^{2+} насосами и другими кальциевыми транспортерами, находящимися в ЭПР, а также на плазматической мембране. После присоединения IP3, IP3R активируется, обеспечивая транспорт Ca^{2+} по электрохимическому градиента из ЭПР в цитоплазму. IP3-опосредованной кальциевый сигнал на микроскопическом (одноканальном) уровне порождает ответы, которые являются наблюдаемыми на макроскопическом (цитоплазматические) уровне (Kessler and Levine 1998).

Гликопротеиновый рецептор для IP3 был впервые выделен из мозжечка крысы (Supattapone et al. 1988). IP3 обладал наиболее высоким сродством к очищенному белку (K_d около 100 нм) по сравнению с другими инозитол фосфатами. Электрофоретический анализ показал, что рецептор обладал молекулярной массой около 260 кДа (Supattapone et al. 1988), Иммуноцитохимические исследования показали, что основная локализация рецептора находится на ЭПР клетки Пуркинье, окраска также была выражена в ядерной оболочке и части аппаратом Гольджи, но не плазматических мембран или митохондрий (Ross et al. 1989).

IP3R1 выполняет функции внутриклеточного Ca^{2+} -канала, который активируется IP3 (Рис. 5, 6). IP3R1, как и рианодиновый (RyR) рецептор, являются тетрамерами, состоящими из больших субъединиц с молекулярной массой 310 и 565 кД, соответственно. Значительная степень гомологии между двумя семействами обнаруживается в домене, локализованном в СООН-конце, который шестикратно пронзает мембрану и участвует в образовании канала. Оба типа каналов имеют геометрическую форму «цветной капусты», приблизительно одинаковой ширины порядка 20 нм, но разной высоты – 10 и 18 нм для IP3R1 и RyR R1 и RyR, соответственно. Белок состоит из восьми трансмембранных доменов, формирующих проводящий канал для катионов. Вся остальная часть молекулы располагается на цитоплазматической стороне, где находятся места связывания IP3, Ca^{2+} , АТФ, а также два остатка Ser, фосфорилируемых PKA и PKG. Было показано, что протеинкиназы PKC и CaMKPK также фосфорилируют IP3R1. Выделенный из ткани мозга IP3R1 может быть фосфорилирован сАМФ-зависимой протеинкиназой, PKC и CaMKPK II. Фосфорилирующая активность этих протеинкиназ аддитивна – каждая из них фосфорилирует IP3R1 добавляя фосфатный остаток в собственном участке молекулы белка. Аминокислотная последовательность IP3R1 имеет мало межвидовых различий. В IP3R1 два домена (с N-конца) обращены к стороне цитоплазмы. Участок связывания IP3 расположен на наружном домене молекулы, тогда как примембранный домен является необходимым для контакта с мембраной и изменения конформации рецептора вследствие связывания с IP3, которое приводит к открытию канала (Рис. 6). Полагают, что тетрамерной структуре IP3R1 соответствует четыре Ca^{2+} -канала в составе одного белкового комплекса. Основное влияние на проводимость канала оказывает связывание Ca^{2+} и IP3. индуцированное инозиттрифосфатами высвобождение кальция зависит от концентрации Ca^{2+} в среде. Выброс Ca^{2+} потенцируется бимикомолярными концентрациями ионов кальция и подавляется с ростом их концентрации. Связывание IP3 с рецепторами мембран обратимо ингибируется Ca^{2+} (Зинченко, Долгачева, 2003)

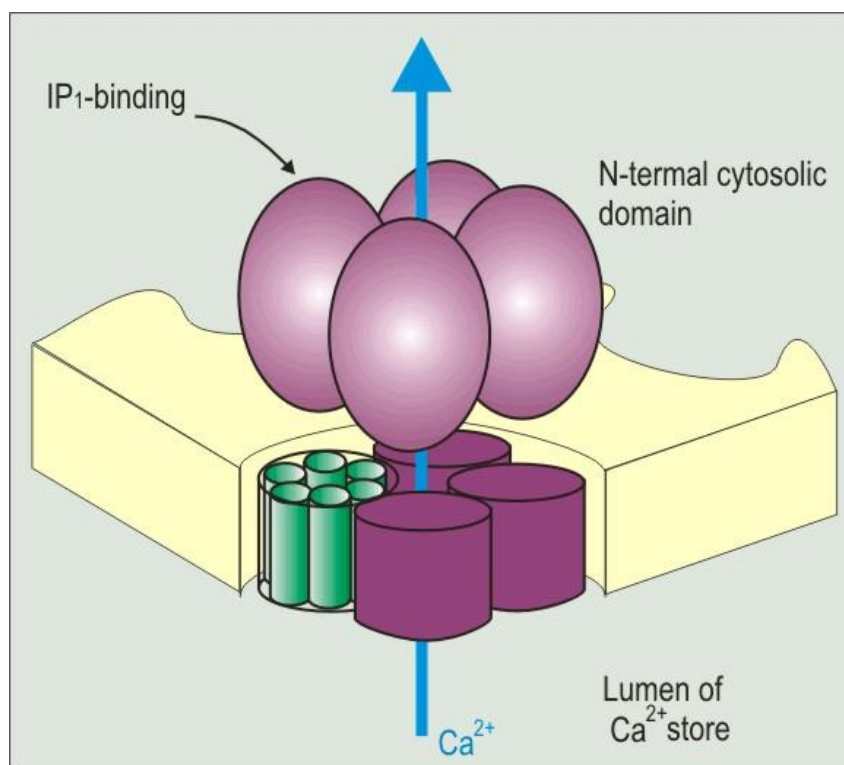
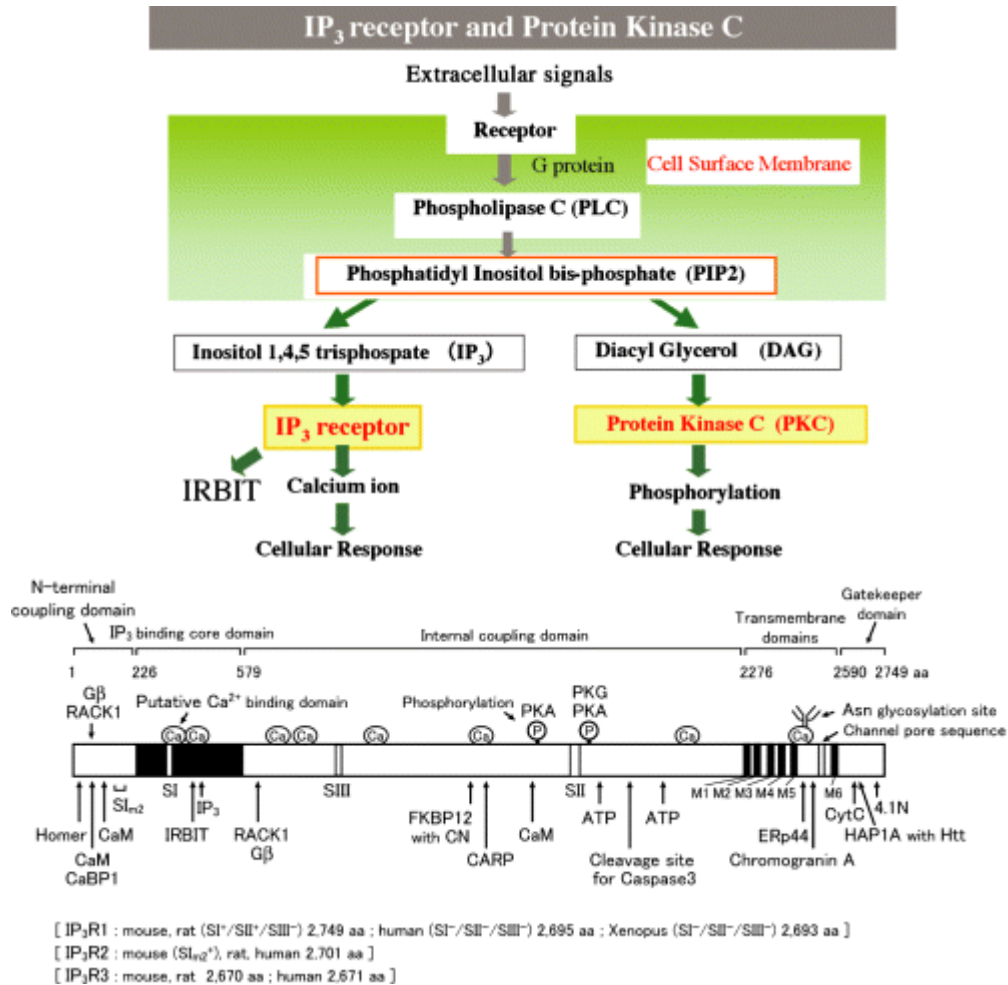


Рис. 5. Строение IP3-рецептора (Зинченко, Долгачева, 2003)

Наличие некоторых общих последовательностей с наибольшей гомологией в области трансмембранного домена IP3- и Ry- рецепторов определяет их способность к взаимодействию с одними и теми же агентами. Так, кофеин, сильный активатор рианодинового рецептора, оказывает слабое ингибирующее действие на IP3-рецептор, а ингибитор IP3- активируемого канала — гепарин является слабым активатором рианодинового рецептора. Общим и функционально наиболее важным участком этих рецепторов является кальций-связывающий сайт, обеспечивающий кальций-индуцируемое активирование и ингибирование рецепторов. Оба рецептора активируются низкими концентрациями Ca^{2+} и подавляются высокими, причем связывание специфического активатора увеличивает чувствительность к Ca^{2+} . При этом IP3- рецептор чувствителен к изменению кальция в области наномолярных концентраций Ca^{2+} , а рианодиновый рецептор — в более широком диапазоне.

Рис. 6. Схема работы IP₃R1 (Foskett JK et al. 2007)

1.1.1.2. Внутриклеточная Ca-система мозга

Кальциевая внутриклеточная регуляторная система.

Основными компонентами кальцевой ВРС являются ионы кальция, кальций связывающие белки, Ca²⁺–кальмодулинзависимые протеинкиназы, Ca²⁺–зависимые протеазы, эндонуклеазы, фосфолипазы. Кальций является основным внутриклеточным посредником, связывающим звеном между синаптической активностью нейронов и экспрессией генов для управления разнообразными функциями, в том числе адаптивными реакциями и процессами, определяющими гибель-выживание клеток (West et al. 2001; Bootman et al. 2009; Hardingham and Bading 2010). В нейронах мозга кальциевая сигнальная трансдукция включает различные звенья внутриклеточных молекулярных процессов, в том числе активацию протеинкиназы C, и связанный с этим гидролиз полифосфоинозитидов, взаимодействие с ядерными белками, активацию аденилатциклазы, фосфодиэстеразы, протеаз, эндонуклеаз, различных фосфолипаз, Ca²⁺–зависимый транспорт макромолекул, (Berridge, 1985). Кальциевая ВРС является одной из основных в нейронах мозга. Она участвует в фосфорилировании и дефосфорилировании

белков транскрипционных факторов, рецепторов, ионных каналов, цитоскелета, синаптической передаче, а также оказывает влияние на функционирование других ВРС и экспрессию генов (Alema, 1984; Peters, 1986; Самойлов, 1999; West et al., 2001; Lyons and West 2011; Bengtson and Bading 2012). Концентрация внутриклеточного Ca^{2+} в нейронах является гомеостатическим параметром и в физиологических условиях трансмембранный кальциевый обмен регулируется несколькими механизмами. С одной стороны, концентрация Ca^{2+} растет в результате открытия лиганд-управляемых и потенциал-управляемых кальциевых каналов и высвобождения Ca^{2+} , связанного внутриклеточными депо, при активации IP₃ или рианодиновых рецепторов эндоплазматического ретикулума. С другой стороны, избыточной концентрации внутриклеточного Ca^{2+} противодействуют АТФ-зависимые механизмы Ca^{2+} «откачки» через плазмолемму и секвестрирования в эндоплазматическом ретикулуме, $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ трансмембранный обмен и другие буферные и/или Ca^{2+} - связывающие процессы. Скоординированное управление этими механизмами контролирует уровень Ca^{2+} в цитозоле, позволяя ему флуктуировать в определенных пределах и с определенной пространственно-временной закономерностью для обеспечения множества Ca^{2+} - зависимых процессов внутриклеточной сигнальной трансдукции.

В работах нашей лаборатории убедительно показано, что умеренная активация кальциевой ВРС необходима для индукции адаптивных реакций мозга (Самойлов, 1999; Самойлов и др, 2001; Semenov et al., 2002). С другой стороны, избыточное накопление внутриклеточного Ca^{2+} запускает каскад реакций, приводящий к гибели клеток. Эти процессы сопровождаются активацией протеолитических ферментов и разрушением клеточных структур, приводят к увеличению синтеза оксида азота, усилению процессов перекисного окисления липидов, и последующего развития оксидативного стресса, нарушению синтеза нейротрофических факторов, и в конечном итоге запуску механизмов некроза и апоптоза (Choi, 1995; Hardingham and Bading 2010). Вызываемая различными патогенными воздействиями гиперактивация ВРС, приводящая к кальциевой перегрузке, является центральным механизмом патологических реакций нейронов (Самойлов, 1999). Показано, что механизмы кальций-опосредованной эксайтотоксичности играют особую роль в развитии острой церебральной ишемии и формировании инфаркта мозга (Brierley L. 1976; Ginsberg M.D. 1990; Pulsinelli and Brierley J. 1982 и др.). Высокая плотность кальциевых каналов на поверхности нейронов определяет уязвимость нейронов области CA1 гиппокампа к ишемии. Увеличение концентрации Ca^{2+} обусловлено высокой плотностью агонист-зависимых кальциевых каналов, контролируемых NMDA-рецепторами (Hardingham and Bading 2010; Zhang et al., 2014) . Вызванная ишемией

внеклеточная аккумуляция глутамата приводит к стимуляции глутаматных рецепторов и вызывает значительное увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , а также Na^+ и Cl^- , что является основным фактором избирательного повреждения нейронов (Drejer and Nielsen, 1989; Johansen et al., 1993; Rothman and Olney, 1986, Костюк и др. 2004). Значительный вклад в поддержании повышенного уровня Ca^{2+} в цитозоле при аноксии может вносить активация потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов и инверсия $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -трансмембранного обмена (Siesjo, Bengtsson, 1989). Кроме повышения уровня внутриклеточного свободного Ca^{2+} за счет входа из вне клетки, существенное значение имеют процессы поддержания его высокой концентрации в цитозоле за счет высвобождения кальция из мембран эндоплазматического ретикулула и митохондрий, а также нарушении процессов его секвестирования. Высвобождение 1% связанного кальция приводит к повышению концентрации Ca^{2+} в цитозоле более чем в 10 раз, что достаточно для запуска Ca -зависимого функционального ответа. Мощная внутриклеточная кальциевая «перегрузка» приводит к активации целого ряда протеаз, киназ, эндонуклеаз, накопление арахидоновой кислоты и эйкозаноидов. Следствием этих процессов являются необратимые повреждения мембран – изменяется их микровязкость, пластичность, ионная проводимость, белок-липидные взаимоотношения, лиганд-рецепторные взаимодействия, активация ферментов, стимуляция свободно-радикальных процессов, что приводит к модификации трансмембранной передачи сигналов и модуляции возбудимости нейронов.

Более 90% Ca^{2+} в клетке находится в связанном состоянии, благодаря чему клеточная регуляция Ca^{2+} обмена осуществляется не только за счет его входа через потенциал- или лиганд- управляемые ионные каналы или $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ обменник, но и за счет высвобождения из мембран, органелл и гидрофобных белковых макромолекул цитозоля (Carvalho, 1982; Berridge, 1985; Никитин и Самойлов, 1990). Сильное увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} является токсичным (летальным) для нейронов, однако показано, что умеренное ее увеличение до 50-200нМ (в течение 30 мин) может индуцировать долговременную толерантность к последующей ишемии или другому стрессу.

Различные способы изменения внутриклеточной концентрации кальция, по-видимому, служат основой запуска специфических механизмов Ca -опосредуемой трансдукции разного вида сигналов, передаваемых нейромедиаторами и гормонами. При адекватных умеренных воздействиях входящие в нейроны ионы кальция оказывают преимущественно локальные эффекты, ограниченные плазмалеммой и примембранной областью вблизи кальциевых-каналов. Этот процесс обусловлен наличием Ca^{2+} -АТФазной помпы, $\text{Ca}^{2+},\text{Na}^+$ -переносчика в плазмалемме, кальций-связывающих белков, АТФ-

зависимого транспорта Ca^{2+} в эндоплазматический ретикулум. Такие быстродействующие системы удаления свободного внутриклеточного Ca^{2+} запускаются при повышении его концентрации до 10^{-7} – 10^{-6} М (Carvalho, 1982). При этом не происходит диффузии Ca^{2+} в глубь клетки, ограничивая «канальный» тип передачи сигналов областью, близкой к кальциевым-каналам плазмалеммы. (Allbritton et al., 1992).

Трансдукция Ca^{2+} -опосредуемых сигналов, связанная с вовлечением сложных каскадных химических реакций и с мобилизацией внутриклеточного секвестированного кальция, способствует более пролонгированной активации Ca^{2+} -зависимых молекулярных процессов в цитоплазме и ядре. Такой способ передачи сигналов, как правило, происходит с участием фосфоинозитидной системы (Berridge, 1985, Sladeczek, 1987, Miller, 1988, и др.). Инозиттрифосфат-зависимая мобилизация Ca^{2+} , депонированного в эндоплазматическом ретикулуме, как правило, носит длительный, волнообразный характер, что является важным фактором индукции устойчивой модификации ионной проницаемости, возбудимости нейронов и экспрессии генов. Кроме IP3-рецепторов, на мембранах эндоплазматического ретикулума расположены рианодиновые рецепторы, также открывающие Ca^{2+} -каналы, регулируемые системой цГМФ. (Berridge 1993, Kostyuk, Verkhatsky, 1995).

Сигналы, передача которых опосредована вне- или внутриклеточным кальцием, могут иметь неодинаковую информационную значимость и определять специфику реакций нейронов на различные виды стимуляции. При сочетанном взаимодействии обоих типов Ca^{2+} -опосредуемой сигнальной трансдукции должен возникать выраженный и пролонгированный ответ нейронов, что имеет важное значение при формировании долговременных реакций мозга на различные внешние воздействия. Обнаружены кальциевые депо на выпячиваниях ядерных мембран, где также расположены IP3- и рианодиновые рецепторы (Petersen, 1996, Mishra and Delivoria-Papadopoulos, 2004, Szlufcik K, et al., 2006, Barlow et al., 2010). Стимуляция этих рецепторов приводит к мощному входу в ядро клеток ионов кальция, участвующих в экспрессии генома (Hardingham and Bading 2010).

Кальциевая система внутриклеточной регуляции наряду с фосфоинозитидной играют чрезвычайно важную роль в процессах формирования реакций мозга на внешние патологические воздействия в том числе гипоксию. Ca^{2+} , активируя ключевые ферменты фосфоинозитидной системы - фосфолипазу C и протеинкиназу C, тем самым стимулирует деятельность этой регуляторной системы. Ca^{2+} стимулирует также образование из ФИ диацилглицерола и арахидоновой кислоты и ее продуктов. В свою очередь продукты гидролиза ФИ – инозитфосфаты индуцируют выброс Ca^{2+} из эндоплазматического

ритикулума и перераспределение кальция между клеточными компартментами. Активация ПКС препятствует Ca^{2+} -зависимому гидролизу ПФИ фосфолипазой C и изменяет интенсивность рецептор-зависимого входа Ca^{2+} в клетку. Ca^{2+} -зависимая протеаза длительно модифицирует активность протеинкиназы C.

За счёт кальциевой перегрузки развивается гиперактивация ряда ферментов, в том числе синтазы окиси азота. Образующаяся в результате избыточная NO также вовлекается в свободнорадикальные реакции. Участие избыточной продукции NO в развитии патологических состояний было показано в работе с использованием мутантных мышей с дефектом в гене, кодирующем NO-синтазу (Panahian et al., 1996). У таких мышей повреждение нейронов коры после глобальной ишемии было менее выражено. Показано, что длительная продукция NO в срезах гиппокампа, индуцируемая гипоксией, опосредуется активацией NMDA-рецепторов (Akira et al., 1994; Zubrow et al., 2000).

Глутаматэргическая сигнальная трансдукция.

Глутаматные рецепторы расположены на цитоплазматической мембране и активируются при действии L-глутаминовой кислоты (L-Glu). Глутаматные рецепторы могут быть подразделены на две большие группы, основываясь на избирательном сродстве для различных агонистов: (1) Ионотропные глутаматные рецепторы, которые включают в себя рецепторы N-метил-D-аспарагиновой кислоты (NMDA рецепторы), α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA рецепторы) и каиновой кислоты (KA рецепторы); и (2) метаботропные глутаматные рецепторы (mGluR) (Cross, 2010).

Одним из ключевых факторов гипоксической и постгипоксической патологии является нарушение глутаматэргической сигнальной трансдукции, в особенности гиперактивация ионотропных NMDA-рецепторов (Siesjö, Bengtsson, 1989; Choi, Rothman, 1990; Goldberg, Choi, 1993; Szatkowski, Attwell, 1994; Rossiet al., 2000; Arundine and Tymianski 2004; Jagadapillai et al., 2014). Гиперстимуляция NMDA-рецепторов при длительной гипоксии может вызываться как чрезвычайно высоким содержанием глутамата и глицина в межклеточном пространстве, так и деполяризацией, внутриклеточным ацидозом, накоплением арахидоновой кислоты и NO, устойчивой активацией протеинкиназы C и калпаина, истощением запасов АТФ и подавлением ингибирующего действия фосфатазы I, ионов магния и цинка (Hammond et al., 1994). Возможно, в регуляции активности NMDA-рецепторов принимает участие и внеклеточный pH (Dingledine et al., 1999; Mayer 2005). Большая часть этих факторов продолжает действовать и после восстановления кислородного снабжения, обуславливая

продолжающуюся гиперактивацию NMDA-рецепторов. В результате этого процесса происходит приток в клетку ионов кальция, натрия и цинка, что может привести к гибели клеток (Cross, 2010). Чрезмерное накопление внутриклеточного Ca^{2+} активирует фосфолипазы и эндонуклеазы, вызывая разрушения клеточных органелл и мембран, ведущих преимущественно к некрозу. Недостаточная (умеренная) эксайтотоксичность может вызвать спектр клеточных нарушений, таких как окислительный стресс, синтез белка, нарушение функции митохондрий, а также к изменениям клеточной сигнализации. Эти нарушения в конечном итоге могут вызвать вторичное повышение внутриклеточного кальция и активации апоптоза, некроза, аутофагии и, в конечном счете, приводят к гибели нейрона.

Роль NMDA-рецепторов в развитии патологии при тяжёлой гипоксии показана в ряде экспериментов с использованием их блокаторов и мутаций по кодирующим их генам. Так, в случае мутации по гену, кодирующему NR2 субъединицу NMDA-рецептора, структурные повреждения нейронов после фокальной ишемии менее выражены (Kadotani et al., 1998). Применение антагонистов NMDA-рецепторов, как конкурентного, так и неконкурентного действия, защищает нейроны мозга при гипоксическом воздействии. Так, например, блокаторы NMDA-рецепторов AP5 и AP6 оказывают протектирующий эффект, если применяются во время ишемии или на начальном этапе (Choi, Rothman, 1990; Goldberg, Choi, 1993; Papas et al., 1993; Yassin, Scholfield, 1994), но не в отдаленные сроки (Tsubokawa et al., 1995) постишемической рециркуляции. Применение CGS-19755 (цис-4-фосфометил-2-пиперидинкарбоксилата), другого антагониста NMDA-рецепторов, наиболее эффективно предотвращало ишемическое повреждение нервных клеток гиппокампа, стриатума и новой коры в сочетании с гипотермией (Shuaib et al., 1993). В нашей лаборатории было убедительно показано, в мозге животных, подвергавшихся воздействию умеренной гипобарической гипоксии в режиме preconditionирования, потенциация ответов на глутамат включает в себя повышение Ca^{2+} проницаемости плазмолеммы, опосредуемой активацией как NMDA, так и AMPA подтипов ионотропных глутаматных рецепторов. Обнаружено, что кинетика потенциации этих двух подтипов различна: если NMDA-опосредуемый избыточный вход Ca^{2+} немедленно компенсируется внутриклеточными Ca^{2+} -связывающими структурами, то стимуляция AMPA рецепторов создает временное существенное повышение внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} за счет менее интенсивного процесса его связывания (Semenov et al., 2008).

В процесс отсроченной гибели нейронов вовлекаются и не-NMDA-рецепторы (Frandsen et al., 1989; Choi, Rothman, 1990; Koh et al., 1990; Tsubokawa et al., 1995). Показано, что антагонист метаботропного L-AP4-рецептора способствует

функциональному восстановлению нейронов гиппокампа после гипоксии (Opitz, Reymann, 1991). Предотвращает структурное повреждение нейронов гиппокампа монгольских песчанок после 4-минутной полной ишемии мозга и антагонист *I*, *II* и *III* групп метаботропных рецепторов (S)-4C3HPG (Henrich-Noack et al., 1998). Антагонист AMPA-каинатных рецепторов защищает нейроны от отсроченного повреждения после депривации кислорода и глюкозы в культуре коры головного мозга (Kaku et al., 1991). Антагонист AMPA-рецепторов NBQX также защищает нейроны гиппокампа от отсроченных постгипоксических структурных повреждений (Henrich-Noack et al., 1998). Через сутки после тяжёлой ишемии в нейронах гиппокампа проводимость через каналы AMPA-рецепторов сильно повышается на фоне снижения NMDA-токов (Tsubokawa et al., 1995). Эти данные могут свидетельствовать о том, что если в раннем периоде постишемии основная роль в усилении входа ионов кальция в нейроны принадлежит NMDA-рецепторам, то в позднем периоде – по-видимому, AMPA-рецепторам.

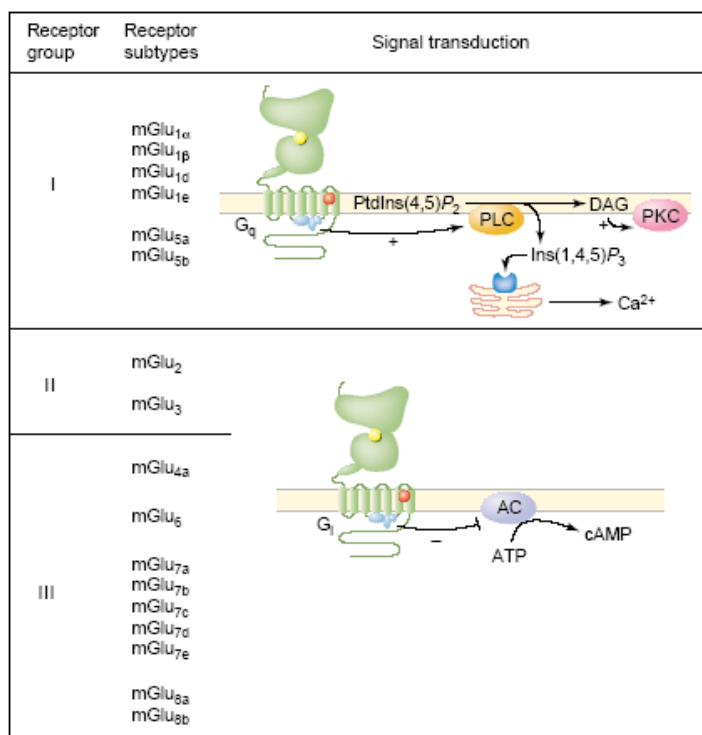


Рис. 7. Классификация и пути активации сигнальных путей mGluRs (Pellegrini-Giampietro, 2003)

Метаботропные глутаматные рецепторы были впервые открыты в 1985 году (Sladeczek et al 1985; Nicoletti et al., 1986). Метаботропные рецепторы, в отличие от ионотропных, не образуют ионного канала. mGluRs принадлежат к весьма разнообразному семейству ГТФ-связанных белков. На данный момент идентифицировано 8 членов mGluRs семейства (mGluR1–8). На основе их гомологических последовательностей, вторичных посредников и фармакологических свойств они объединены в три группы: ImGluRs (mGluR1 и 5), IImGluRs (mGluR2 и 3) IIIImGluRs (mGluR4, 6, 7, 8) (Conn et al., 1997; Schoepp et al., 1999) (Рис. 7). Группа I

преимущественно связана через Gq/G11 белок с фосфолипазой C, в то время как II и III группы рецепторов через Gi/Go белок ингибируют активность аденилат циклазы. Сигнальная трансдукция, опосредованная mGluRs, реализуется через активацию внутриклеточных вторичных посредников с последующей регуляцией их эффекторов.

Глутаматэргическая сигнальная трансдукция, опосредуемая через гидролиз фосфоинозитидов, осуществляется в основном через метаботропные глутаматные рецепторы I группы (mGluR1 и mGluR5). ImGluRs связаны преимущественно с Gq/G11 белком, стимулирующим ФЛСβ. Активация ФЛСβ приводит к разделению фосфотидилинозитол дифосфата (ТФИ, PIP₂) на два вторичных посредника, инозитол-3 фосфат (IP₃) и диацилглицерол (ДАГ) и последующему высвобождению внутриклеточного кальция и активации протеинкиназы C (ПКС), соответственно. Инозитол трифосфат, взаимодействуя с IP₃R1 высвобождает Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума, в то время как ДАГ активирует ПКС, которая выступает посредником при запуске, в частности, NMDA-зависимого входа Ca²⁺ (Рис. 7). Высвобождение ионов кальция необходимо для активации кальций-зависимых ПКС изоформ; точно так же, ПКС может фосфорилировать белки-активаторы кальциевой сигнализации. При ишемии чрезмерная активация NMDA и AMPA глутаматных рецепторов является основным источником входа кальция (Zipfel, 1999; Pellegrini-Giampietro; 1997, Liu, 2004; Nakanishi, 2009), тогда как активация определенных метаботропных глутаматных рецепторов может вызвать высвобождение кальция из эндоплазматического ретикулума (Yoshioka, 2009).

mGluR1 и mGluR5 могут также запускать различные сигнальные каскады и изменять активность ионов и лиганд-управляемых каналов через функциональные связи с другими путями трансдукции, включающими фосфолипазу A₂, фосфолипазу D, тирозинкиназу и митоген-активируемую протеинкиназу (Hermans and Challiss, 2001; Valenti 2002). Таким образом, активация mGluR1 и mGluR5 может приводить к сложным процессам патологических каскадов и в итоге к гибели нейронов. Эти процессы включают усиление нейрональной возбудимости, вследствие активации внутренних катионных токов или снижения калиевой проводимости; увеличение содержания цитоплазматического ионизированного Ca²⁺ за счет облегчения связи с рианодиновыми рецепторами и IP₃ рецепторами или прямого входа Ca²⁺ из внеклеточного пространства через NMDA-каналы (Fagni et al., 2000); увеличение высвобождения глутамата из-за нейротоксических эффектов самих ImGluR (Strasser et al., 1998); взаимопотенциацию NMDA и AMPA рецепторов, наблюдаемую во многих областях мозга; возбуждение митогенактивируемых протеинкиназных путей, как связанных с ПКС (Calabresi et al., 2001), так и не зависящих от нее. Кроме этого пресинаптические mGluR1 модулируют высвобождение

нейротрансмиттеров в гиппокампе (Manahan-Vaughan et al., 1999) и неокортексе (Moroni et al., 1998).

mGluR1 и mGluR5 показывают различную локализацию в ЦНС. Распределение mGluR1 встречается во всех областях человеческого мозга с высоким уровнем в обонятельной луковице, гипоталамусе, гиппокампе, верхнем бугорке четверохолмия и мозжечке (Olive, 2009). Ингибирование mGluR1 было предложено в качестве возможного лечения различных психических заболеваний, включая шизофрению, депрессию и нейропатические боли. mGluR5 обычно локализованы в постсинаптических нейронах с умеренной или высокой плотностью в лобной части коры головного мозга, хвостатом ядре, обонятельном бугорке, и гиппокампе. В отличие от mGluR1, их плотность в мозжечке низкая (Olive, 2009). Дисфункция mGluR1 и mGluR5 приводит к различным заболеваниям ЦНС, в том числе, повышенной тревожности, депрессии, шизофрении, болезни Паркинсона (Dekundy et al., 2006; Pietraszek et al. 2007; Gray et al., 2009).

В развивающийся после тяжелой гипоксии патологический процесс вовлекается не только глутаматергическая, но и другие нейромедиаторные системы – серотонинергическая, холинергическая, адренергическая (Gibson, Blass, 1976; Blass, Gibson, 1979; Самойлов, 1985; Пылова, 1988; Ishimaru et al., 1995; Doyle et al., 2008). Нарушения функционирования этих систем также имеют долговременный характер.

В развитие реакций на гипоксию вовлекается геном нервных клеток, а также продукты генов раннего и позднего действия. Показано, что стимуляция глутаматных (прежде всего NMDA) рецепторов через каскады внутриклеточной сигнальной трансдукции индуцирует экспрессию ранних генов (immediately-early genes) *c-fos*, *c-jun*, *junB* (Dragunow et al., 1990; Sharp et al., 1991; Hisanaga et al., 1992). При различных гипоксических воздействиях модифицируется содержание как мРНК ранних генов (Рыбникова и др., 2004; An et al., 1993; Liu et al., 1994c; Abe, Nowak, 1996; Soriano et al., 1996; Schölzke and Schwaninger 2007), так и их продуктов – транскрипционных факторов AP-1, CREB, NF-kB (An et al., 1993; Liu et al., 1994c; Rybnikova et al., 2005; Rybnikova et al., 2009; Salminen et al., 1995; Schölzke and Schwaninger 2007). Характер экспрессии ранних генов и транскрипционных факторов может различаться в зависимости от вида и длительности воздействия. Так, после 30-ти и 90-минутной односторонней фокальной ишемии коры головного мозга (An et al., 1993) максимальная экспрессия ранних генов (*c-fos*, *c-jun*, *junB*) достигалась к 30 – 90 минуте рециркуляции и сохранялась в течение 4 часов. При этом 30-минутная ишемия, не имевшая патологических последствий, вызывала существенно более интенсивную экспрессию этих генов по сравнению с 90-минутной, вызывавшей морфологически заметное повреждение нейронов.

Показано (An et al., 1993), что сравнительно короткая фокальная ишемия повышает ДНК-связывающую активность транскрипционного фактора AP-1. Однако, после более длительной, 90-минутной ишемии этот эффект проявлялся лишь в тканях, окружающих зону инфаркта, но не в ней самой (Salminen et al., 1995;).

Постишемическое увеличение связывающей активности AP-1 и CREB может лежать в основе механизма, позволяющего пережившим гипоксию нейронам защищаться от индуцируемых ишемией дегенеративных внутриклеточных процессов (Moblely et al., 1988; Goldgaber et al., 1989; Hengerer et al., 1990; Liu et al., 1994; Doyle et al., 2008). Это объясняется тем, что AP-1 и CREB регулируют активность поздних генов, продукты которых (антиоксиданты, белки теплового шока, нейротрофины и др.) обладают адаптогенными свойствами. Важная роль про-адаптивных транскрипционных факторов в механизмах повышения толерантности мозга к гипоксии отражена в обзоре Самойлова и Рыбниковой 2012 года.

Гиперстимуляция NMDA рецепторов и нарушение кальциевого гомеостаза вследствие тяжелого аноксического воздействия ингибируют нейрональный синтез пептидов, в том числе и адаптогенов-протекторов (Raley-Susman, Lipton, 1990; Carter, Muller, 1991; Shigeno et al., 1991; Kinouchi et al., 1994; Chen et al., 1995). Однако, блокада транскрипции или трансляции белка может играть роль и в предотвращении апоптоза (Shigeno et al., 1990; Okamoto et al., 1993; Gwag et al., 1995; Lobner, Choi, 1996). Следовательно, тяжелая гипоксия селективно подавляет синтез пептидов-адаптогенов, но индуцирует синтез пептидов-«киллеров».

Таким образом, гипоксия-ишемия индуцирует изменения внутриклеточного редокс-состояния, ионной проводимости и возбудимости нейронов, механизмов синаптической и внутриклеточной сигнальной трансдукции, активность генов и их продуктов. Направленность и степень изменений этих молекулярных процессов определяют исход гипоксических воздействий, то есть повреждение и гибель или выживание нервных клеток мозга.

Хотя после восстановления кислородного снабжения и восстановления энергообеспечения клеток концентрации глутамата, Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} во внеклеточной среде могут быстро нормализоваться (Szatkowski, Attwell, 1994), необратимые деструктивные процессы в клетках продолжаются. Ведущую роль в этих деструктивных процессах играют три фактора – нарушения внутриклеточного кальциевого гомеостаза, глутаматэргической сигнальной трансдукции и гиперпродукция свободных радикалов (Kaplan et al., 1987; Siesjö, Bengtsson, 1989; Choi, Rothman, 1990; Szatkowski, Attwell, 1994; Choi et al., 1998; Самойлов, 1999).

Благодаря наличию прямых и опосредуемых положительных и отрицательных связей внутриклеточные регуляторные системы осуществляют самоконтроль функционирования, направленный как на стимуляцию (потенциацию) их активности, так и на предотвращение возможной гиперактивации, которая может приводить к развитию функциональных и структурных повреждений нейронов. Угнетение деятельности одной из ВРС или их чрезмерная активация являются одной из основных причин возникновения дезадаптационных и патологических состояний мозга.

1.1.2. Участие системы перекисного окисления липидов в реакциях нейронов мозга на гипоксическое воздействие

Одним из важнейших механизмов повреждения клеток мозга при гипоксическом воздействии и последующей реоксигенации является окислительный стресс, обусловленный продукцией активных форм кислорода (АФК) и других свободных радикалов, а также нарушением внутриклеточного окислительно-восстановительного состояния (Siesjö, 1978; Самойлов, 1985; Thompson, Hess, 1986; Kloner et al., 1989; Coyle, Puttfarcken, 1993; Choi, 1995; Chan, 1996; Clemens, 2000; Candelario-Jalil et al., 2001; Mohri et al., 2001; Sugawara, Chan, 2003 и др.). Термин «активные формы кислорода», соответствующий используемому в англоязычной литературе термину «reactive oxygen species» (ROS), объединяет в себе кислородные свободные радикалы и высокореактивные кислород-содержащие молекулы (Aguoma, 1998; Зенков и др., 2001). АФК играют важную роль во множестве физиологических и патологических процессов: в механизмах сигнальной трансдукции, в окислительном повреждении органов, тканей, клеток и биомолекул (Junod, 1987; Bast et al., 1991), в потенцировании действия ксенобиотиков (Sinha, Mimnough, 1990), в реакциях на гипоксию/реоксигенацию (Биленко, 1989), в реализации фагоцитарных и лимфоцитарных функций, в регуляции тонуса сосудов (Rubanyi, 1988), в развитии воспалительного процесса (Collier, Vallance, 1989; Harris et al., 1992), в реакциях на бактериальные и вирусные инфекции (Маянский, Маянский, 1989; Maeda, Akiake, 1991), в росте и дифференциации клеток, регуляции клеточной пролиферации, при канцерогенезе, при старении, стимулируют синтез ДНК в клетках и защищают их от цитотоксичности (Valko et al. 2007) и т.д.

Уже в первые часы после гипоксического воздействия окислительный стресс вызывает высвобождение из митохондрий в цитозоль цитохрома C, который способствует запуску процессов гибели клеток по типу апоптоза. Митохондрии являются главным

источником свободных радикалов и ключевыми органеллами в запуске апоптоза (Ueda et al., 2002).

В центральной нервной системе ряд ферментов, включающих митохондриальные оксидазы, ксантиноксидазу, миелопероксидазы, цитохром P450 цитоплазмы и моноаминоксидазу, циклооксигеназы, липооксигеназы, NO-синтазу, и НАДФН оксидазу плазматической мембраны, утилизируют молекулярный кислород, продуцируя свободные радикалы в нормальных физиологических условиях (Sun et al., 2007). Образовавшиеся таким образом свободные радикалы и активные формы кислорода способны активировать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), являющиеся одним из механизмов, ответственных за модификацию состава и физико-химических свойств мембран, с которыми связаны практически все процессы, протекающие в структурах центральной нервной системы, определяющие её чувствительность к внешним и внутренним повреждающим факторам.

В условиях существенного сдвига окислительно-восстановительного баланса в сторону восстановления, накопления НАДН и ацидоза, характерных для гипоксического состояния, $O_2^{\cdot -}$ взаимодействует в протонном с образованием HO_2^{\cdot} – ещё одного кислородного свободного радикала, существенно более реактивного по сравнению с $O_2^{\cdot -}$ и способного инициировать перекисное окисление липидов (ПОЛ). Происходящее в ходе гипоксии накопление ненасыщенных жирных кислот, создаёт субстрат для развития цепных реакций ПОЛ. Другим важным фактором усиления ПОЛ является повышение симпатoadреналовых влияний: с одной стороны АФК образуются в процессе биосинтеза и хиноидного распада катехоламинов, с другой – большие количества этих соединений могут вызывать перегрузку цепи переноса электронов и, следовательно, усиление генерации АФК (Хавинсон и др., 2003). Кроме того, катехоламины повышают активность липаз, способствуя накоплению жирных кислот и, тем самым, повышая интенсивность ПОЛ (Хачатурян и др., 1996).

В условиях полной восстановленности дыхательной цепи, вызванной гипоксией, кислород приобретает повышенную способность взаимодействовать с убихинолами, поэтому восстановление кислородного снабжения после тяжёлой гипоксии не только не восстанавливает нормальное состояние, но вызывает ещё большее усиление продукции $O_2^{\cdot -}$ (Болдырев, 1998). При гипоксии отмечаются повышение активности НАДН-оксидазы, усиление расщепления АТФ с образованием ксантина и трансформация ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу. Эти процессы создают предпосылки для мощного повышения образования АФК с началом реоксигенации (Хавинсон и др., 2003).

Гиперпродукция свободных радикалов приводит к развитию цепных реакций перекисного окисления мембранных липидов, окислению белков и углеводов, повреждению нуклеиновых кислот (Пескин, 1987; Арчаков, Мохосев, 1989; Yu, 1994; Aguoma, 1998).

Особенность перекисного окисления липидов состоит в цепном механизме реакции, в которой выделяются четыре стадии: реакции инициации, развития, разветвления и обрыва цепи (Владимиров и др., 1991) (Табл. 1).

Табл. 1. Основные реакции перекисного окисления липидов.

$\text{OH}^\bullet + \text{RH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{R}^\bullet$	инициация
$\text{R}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROO}^\bullet$ $\text{ROO}^\bullet + \text{RH} \rightarrow \text{R}^\bullet + \text{ROOH}$	развитие
$\text{ROOH} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^\bullet + 2\text{RO}^\bullet + \text{Fe}^{3+}$ $\text{RO}^\bullet + \text{RH} \rightarrow \text{R}^\bullet + \text{ROH}$	разветвление
$2\text{ROO}^\bullet \rightarrow \text{ROH} + \text{R}=\text{O}$	обрыв

Различные гипоксические воздействия способны нарушать функционирование ферментов прооксидантной системы в клетках центральной нервной системы, и как следствие, изменять уровень свободных радикалов, которые способны активировать процессы перекисного окисления липидов. ПОЛ активно вовлекается в процессы модификации состава и физико-химических свойств мембран, а также регуляции ионного гомеостаза нейронов (Питлик и др., 2009). Так, в результате взаимодействия вторичных продуктов ПОЛ с белками нарушается функционирование Na^+/K^+ - АТФазы, Ca^{2+} - АТФаз плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума, а также GLUT3 – транспортера глюкозы. Образование ряда вторичных продуктов ПОЛ приводит к увеличению активности потенциал зависимых кальциевых каналов плазматической мембраны, которые играют важную роль в ряде физиологических процессов, протекающих в нейронах, а именно, индукции долговременной потенциации, высвобождении нейромедиаторов и экспрессии генов (Lu et al., 2002; Mattason, 1998; Emerit et al., 2004). Показано, что гиперактивация прооксидантных систем, приводящая к

выраженным нарушениям свободно-радикального окисления липидов нейрональных мембран, вовлекается в механизмы ряда постстрессорных и нейродегенеративных патологий (Флеров, Герасимова, 2006; Adibhatla, Hatcher, 2006, 2007, 2010).

При физиологических условиях прооксидантная система активно участвует в поддержании структурной целостности и функциональной пластичности структур головного мозга. Она активно вовлекается в механизмы обеспечения работы и регуляции многих ионных каналов, рецепторов и ферментов, как в нейронах, так и в глиальных клетках. Важная роль отводится прооксидантной системе в целом и ПОЛ в частности в механизмах синаптической пластичности и процессах памяти (Kishida, Klann, 2007). Так показано, что при физиологической концентрации перекись водорода, в диапазоне 1-50 μM , индуцирует изменения синаптической пластичности. Данный диапазон концентраций перекиси водорода способен стимулировать выход ионов кальция из внутриклеточных депо, при этом, выход кальция из эндоплазматического ретикулума происходит через рианодиновые рецепторы, в структуре которых описан редокс чувствительный домен (Kamsler, Segal, 2004). Сдвиг редокс статуса рианодиновых рецепторов, приводящий к выходу кальция, может быть *in vitro* стимулирован добавлением свободных радикалов в среду или снижением уровня белковых антиоксидантов в результате генетических манипуляций, а *in vivo* наблюдается в процессе нормального старения организма. Выход ионов кальция может активировать различные кальций-зависимые белки (кальмодулин – зависимую протеинкиназу II), кальцийнейрин и протеин фосфатазу 1, которые напрямую влияют на проводимость потенциал-зависимых кальциевых каналов. Изменение кальциевого входа в процессе синаптической передачи может влиять на нейрофизиологическую значимость сигнала, вызывая при этом сдвиг в кальций – зависимых калиевых токах. *In vitro* на переживающих срезах гиппокампа мышей дикого типа и трансгенных мышей с усиленной экспрессией супероксиддисмутазы H_2O_2 – зависимая передача сигнала при долговременной посттетанической потенциации (LTP) опосредуется кальцийнейрином (Kamsler, Segal, 2004). В настоящее время в литературе H_2O_2 все чаще и чаще описывается как одна из важнейших сигнальных молекул. H_2O_2 *in vivo* обладает коротким периодом полураспада, однако она легко проникает через клеточные мембраны и способна перемещаться на десятки μm от места образования, что позволяет ей выступать в качестве сигнальной молекулы, способной вызывать и модулировать кальциевые токи в пре- и постсинапсе нейронов, и кальциевые волны в астроцитах (Kishida, Klann, 2009). Помимо H_2O_2 , в синаптическую активность вовлекаются постоянно образующиеся из специфических фосфолипидов мембран липидные посредники. Их образование может происходить в результате работы

различных фосфолипаз, а также неферментативно при свободно-радикальном окислении при посредстве нейромедиаторов, цитокинов, нейротрофических и ростовых факторов и при деполяризации и активации ряда ионных каналов (Bazan, 2005). Регулирование синаптической активности липидными мессенджерами способно влиять на статус нервных клеток. Так арахидоновая кислота, один из наиболее изученных ретроградных посредников, способна вызывать устойчивую гиперактивацию NMDA-рецепторов, приводящую к гибели клетки.

Молекулярные и структурные нарушения, вызванные тяжелой гипобарической гипоксией, в значительной мере связаны с последствиями увеличения концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме и оксидативным стрессом и затрагивают ключевые механизмы, обеспечивающие молекулярную основу процессов обучения и памяти. И как было показано в работах (Ватаева и др., 2004а, б; Rybnikova et al., 2005), находят своё отражение в расстройствах ряда поведенческих реакций, индуцируемых тяжелой гипоксией.

1.1.3. Участие антиоксидантной системы в реакциях нейронов мозга на гипоксическое воздействие

Как отмечалось выше, одним из важнейших механизмов повреждения клеток мозга при гипоксическом воздействии и последующей реоксигенации является окислительный стресс, обусловленный продукцией активных форм кислорода (АФК) и других свободных радикалов, а также нарушением внутриклеточного окислительно-восстановительного состояния (Siesjö, 1978; Самойлов, 1985; Thompson, Hess, 1986; Kloner et al., 1989; Coyle, Puttfarcken, 1993; Choi, 1995; Chan, 1996; Clemens, 2000; Candelario-Jalil et al., 2001; Mohri et al., 2001; Sugawara, Chan, 2003; Saito et al., 2007 и др.). Эндогенные антиоксиданты, блокирующие или, по крайней мере, существенно ослабляющие действие окислительного стресса, представляют собой одну из важнейших нейропротективных систем. Они действуют и как антагонисты свободно-радикального окисления (ловушки свободных радикалов, хелаторы металлов, антиперекисные антиоксиданты), и как восстановители и регуляторы редокс-баланса.

Антиоксидантные системы играют существенную роль в формировании защитных реакций на гипоксию, изменяя уровень экспрессии антиоксидантных белков в ответ на кислородное голодание. Молекулярные механизмы, обеспечивающие защиту нейронов от гипоксии и последующей реоксигенации на клеточном уровне, включают активацию ферментативных и неферментативных антиоксидантных систем. Нормализуя редокс-состояние, связывая и инактивируя свободные радикалы, эндогенные антиоксиданты

препятствуют развитию процессов перекисного окисления липидов и окислительного повреждения ферментов и нуклеиновых кислот, предотвращают развитие некроза и апоптоза.

Существует множество эндогенных антиоксидантов – как внутри-, так и внеклеточных, как гидрофильных, и так и гидрофобных, как ферментативных, так и неферментативных. Ферментативные антиоксидантные системы представлены супероксиддисмутазами (SOD), пероксидазами и ферментами тиоредоксиновой и глутатион-глутаредоксиновой систем. Среди неферментативных антиоксидантов выделяются хелаторы металлов (ферритин, гемоседерин, трансферины, церулоплазмин, молочная и мочевая кислоты и ряд пептидов) и енольные ловушки свободных радикалов (аскорбат и фенолы: токоферолы, ретинолы, убихиноны, витамин К, триптофан, фенилаланин).

Следует отметить, что в мозге имеются все условия для интенсивного протекания процессов свободно-радикального окисления. Это, во-первых, высокий уровень потребления кислорода. На долю мозга приходится 20–25% всего потребляемого организмом O_2 при том, что он составляет лишь около 2% массы тела (Siesjö, 1978); при этом 25% потребляемого мозгом кислорода приходится на нейроны, составляющие лишь около 5% объема мозга. Во-вторых, это наличие в клетках мозга дополнительных систем генерации активных форм кислорода, связанных с нейромедиаторами – глутаматом, дофамином, серотонином и катехоламинами. В-третьих, это высокое содержание в мозге липидов (около 50% сухого веса ткани) при чрезвычайно высоком уровне ненасыщенности их жирных кислот.

Указанные факторы обуславливают наиболее высокую чувствительность нейронов мозга к окислительному стрессу, вызываемому, в частности, гипоксией. При этом, содержание и активность таких антиоксидантных ферментов как супероксиддисмутаза и каталазы в мозге в несколько раз ниже, чем в других тканях (Hayes et al., 1989; Львова, Абаева, 1996; Левадная и др., 1998). Поэтому, по-видимому, особое значение в защите нервных клеток при гипоксических воздействиях приобретают тиольные антиоксиданты, в частности, тиоредоксины.

1.1.3.1. Тиоредоксины

Тиоредоксины вовлекаются в такие процессы, как синтез белка и ДНК, фолдинг и формирование белковой структуры, ферментативные реакции, регуляция экспрессии генов, ингибирование апоптоза, клеточный рост и пролиферация, ангиогенез, фотосинтез, канцерогенез и др. (Holmgren, 1985; Biaglow, Miller, 2005; Patenaude et al., 2005).

Семейство тиоредоксинов (Trx) представляет собой небольшие убиквитинилированные белки, содержащие две восстанавливающие цистеиновые группы в активном центре, которые включают консервативную аминокислотную последовательность -Cys-Gly-Pro-Cys-, благодаря которой обладают дисульфид-дितिольной восстановительной активностью (Holmgren, 1985). Эти белки могут существовать как в восстановленной дितिольной (тиоредоксин-(SH)₂), так и в окисленной дисульфидной (тиоредоксин-S₂) формах. Тиоредоксин-(SH)₂ является полноценной белковой дисульфид-редуктазой, участвующей во многих тиол-зависимых восстановительных реакциях через обратимое окисление дитиолов своего активного центра в дисульфид, и катализирует реакции дитиол-дисульфидного обмена. Окисленный тиоредоксин-S₂ обычно восстанавливается затем флавопротеиновой тиоредоксин-редуктазой за счет электронов НАДФН; Trx, Trx-редуктаза и НАДФН составляют так называемую «тиоредоксиновую систему» (Powis, Montfort, 2001).

Одним из ключевых эндогенных антиоксидантов этого семейства является цитозольный тиоредоксин-1 (Trx-1), представляющий собой небольшой (около 12 кДа) полифункциональный убиквитинилированный белок. Trx-1 защищает клетки от окислительного стресса (Takagi et al., 1999). Различные формы гипоксии/ишемии обычно повышают экспрессию Trx-1 (Berggren et al., 1996; Stroeve et al., 2004), однако при особо тяжёлых гипоксических воздействиях может, напротив, наблюдаться её подавление. Например, экспрессия тиоредоксина и его мРНК была снижена в зоне ишемического ядра, но при этом повышена в прилежащих к нему перифокальных областях спустя 4 часа после фокальной ишемии мозга (Hattori et al., 2002; Takagi et al., 1998a, b). Также нами ранее была показана возможность снижения экспрессии Trx-1, напротив, в ответ на умеренные, адаптивные формы гипоксии (Строев и др., 2008).

Молекулярные механизмы участия тиоредоксина в осуществлении нейропротективных функций при окислительном стрессе многообразны и до сих пор не до конца изучены. Одна из ключевых его защитных функций определяется его непосредственными антиоксидантными свойствами: он служит как регулятором окислительно-восстановительного баланса, так и ловушкой свободных радикалов (Nakamura et al., 1994; Ueda et al., 2002) и за счёт этого подавляет высвобождение цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль (Andoh et al., 2002a, 2002b), ингибируя тем самым запуск апоптоза. С другой стороны, при тяжёлых повреждениях, когда клеточная гибель неизбежна, тиоредоксин может, по крайней мере, переключать клеточную гибель с некротического пути на апоптотический за счёт регуляции активности каспаз, чувствительных к окислительно-восстановительному состоянию (Ueda et al., 1998, 2002).

Защитные функции тиоредоксина, по-видимому, не исчерпываются его ролью тиолового восстановителя и «ловушки свободных радикалов» (Patenaude et al., 2005). Он действует также как индуктор других эндогенных антиоксидантов, в частности, митохондриальной Mn-супероксиддисмутазы (Das et al., 1997), а также вовлекается в процессы сигнальной трансдукции (Takagi et al., 1998a, 1999).

Помимо давно известного и наиболее изученного цитозольного тиоредоксина-1, семейство тиоредоксинов млекопитающих включает и митохондриальный тиоредоксин-2 (Trx-2) (Spyrou et al., 1997). Специфическая локализация на внутренней митохондриальной мембране и высокая устойчивость к окислению дают основания считать, что тиоредоксин-2 служит первичной линией защиты от окислительного стресса, вызванного образованием активных форм кислорода в процессе функционирования митохондрии (Spyrou et al., 1997; Ueda et al., 2002). Механизмы осуществления антиапоптотической защитной функции тиоредоксина-2 состоят в ингибировании регулирующей апоптозный сигнал киназы 1 (Zhang et al., 2004) и блокировании высвобождения цитохрома *c* из митохондрий (Chen et al., 2002; Nonn et al., 2003). В силу своей дисульфид-редуктазной активности Trx-2 вовлекается в регуляцию проницаемости митохондриальной мембраны (Miranda-Vizuite et al., 2000), что также может играть важную роль в реализации его антиапоптотических функций (Damdimopoulos et al., 2002; Tanaka et al., 2002; Nonn et al., 2003). Подробно изучены модификации экспрессии тиоредоксина-2 в различных структурах мозга крыс, подвергавшихся действию гипобарической гипоксии различной тяжести (Строев, Самойлов, 2008; Stroeve et al., 2004; 2011)

1.1.3.2. Супероксиддисмутазы

Гипоксия/ишемия и последующее восстановление приводят к многократному увеличению супероксид-анион-радикалов ($O_2^{\cdot-}$) в клетках, которые являются одной из наиболее опасных АФК (Chan, 1996; Chan et al., 1996; Dawson, Dawson, 1996; Szabo, 1996). Супероксиддисмутазы преобразуют супероксид-анион до молекулярного кислорода и перекиси водорода (Marklund, 1984), которая затем метаболизируется каталазой до молекулярного кислорода и воды. *Супероксиддисмутазы* (EC 1.15.1.1, SOD) представляют собой семейство антиоксидантных белков, содержащих атом металла переменной валентности.

Дисмутация супероксид-аниона способствует ингибированию индуцируемого окислительным стрессом высвобождения цитохрома *c* и вторичных активаторов каспаз (Smac) из митохондрий (Fujimura et al., 2000; Sugawara et al., 2002), блокируя тем самым

запуск апоптоза (Fujimura et al., 2000). Таким образом, SOD защищают клетки различных тканей от повреждения и гибели, вызываемых окислительным стрессом (Chen et al., 1998; Keller et al., 1998; Manna et al., 1998; Abunasra et al., 2001).

Известны различные формы SOD. Наиболее изучена Cu, Zn-SOD, существующая в форме гомодимера с молекулярной массой 32 кДа, содержащая по одному атому меди и цинка в каждой из двух своих субъединиц и присутствующая в цитозоле и ядре практически всех типов клеток (McCord, Fridovich, 1969; Crapo et al., 1992). Cu,Zn-SOD обнаружена также в микросомах (Авакян, 1990) и в межмембранном пространстве митохондрий (Slot et al., 1986). Позднее была открыта специфическая марганец-содержащая SOD (Mn-SOD) митохондриального матрикса, существующая в форме гомотетрамера с молекулярной массой 96 кДа (Weisiger, Fridovich, 1973; Slot et al., 1986; Lindenau et al., 2000).

Митохондрия как органелла клеточного дыхания является основным источником свободных радикалов (Ueda et al., 2002), поэтому митохондриальная Mn-SOD играет особенно важную роль. В различных экспериментах с гипоксическими/ишемическими воздействиями была показана возможность как индукции (Arthur et al., 2004; Martinez-Romero et al., 2006), так и подавления (Liu et al., 1994a, 1994b; Kato et al., 1995) Mn-SOD в зависимости от вида, интенсивности и продолжительности воздействия. Очевидно, индукция Mn-SOD является нормальной защитной реакцией на повреждающее воздействие, однако, если интенсивность повреждения превышает резервы адаптивных возможностей, то развивается дезадаптивный патологический процесс, связанный с угнетением экспрессии и активности данного фермента.

Cu, Zn-SOD также защищает нейроны от повреждений, вызванных различными стрессорными воздействиями (Bordet et al., 2000), включая ишемию (Bordet et al., 2000; Huang et al., 2001; Morita-Fujimura et al., 2001; Wang et al., 2005). Подавление Cu, Zn-SOD, особенно на ранних сроках после ишемического инсульта, ведёт к развитию нейронального повреждения, в то время как индукция Cu, Zn-SOD, в частности наблюдаемая в модели фокальной ишемии в промежуточной области между нормальной и инфарктной тканью, может рассматриваться как защитный механизм и форма адаптации (Liu et al., 1994a).

В исследованиях, проводимых в нашей лаборатории, было показано увеличение иммунореактивности Mn-SOD и Cu, Zn-SOD в мозге крыс через 3 – 24 часа после воздействия тяжелой гипобарической гипоксии (Самойлов и др. 2002; Строев и др. 2003; Строев и Самойлов, 2008). Предварительное гипоксическое прекондиционирование приводило к усилению иммунореактивности как Mn-SOD, так и Cu, Zn-SOD во всех

областях гиппокампа на ранних стадиях восстановления после тяжелой гипоксии, что, очевидно, является одним из механизмов повышения толерантности мозга к гипоксии (Строев и Самойлов, 2008; Строев и др., 2005, Stroeв, 2013).

1.1.4. Гормон-зависимые механизмы развития адаптации и патологии в реакциях мозга на гипоксическое воздействие

1.1.4.1. Классические теории адаптации. Понятие о стрессе

Согласно современным представлениям в формировании механизмов повреждения и толерантности мозга к гипоксии важная роль отводится механизмам «проводниковой» (нейромедиаторной) и «объемной» (гормональной, нейропептидной) межклеточной трансдукции адаптогенных и патологических сигналов (Самойлов, 1999). В механизмах развития патологических состояний при действии гипоксии важную роль играют нарушения нейроэндокринной регуляции приспособительных реакций, прежде всего гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы.

Различные стрессорные воздействия вызывают состояние, для которого характерен комплекс реакций, которые направлены на адаптацию организма к повреждающим факторам среды, противостоянию развития патологических реакций, сохранению гомеостаза. Стрессорный ответ включает в себя реакции всех систем и органов и опосредуется в течение достаточно длительного времени гормонами. Согласно классическим теориям стресса, гормональный паттерн определяет целостный характер реакций и каскадные механизмы, которые участвуют в осуществлении адаптационно-компенсаторных процессов организма. Первая теория стресса и адаптации была сформулирована У. Кэнноном. Основная нагрузка в механизмах экстренной мобилизации в стрессорных условиях в этой теории отводится симпатoadреналовой системе (САС). Активация САС путем выброса адреналина в кровь обеспечивает адаптацию (Cannon, 1939). Основы современных представлений, как «эры общего адаптационного синдрома» заложены в работах канадского ученого Ганса Селье: «Стресс есть неспецифический ответ организма на любое предъявленное ему требование» (Selye, 1974). До появления работ Селье считалось, что реакция организма на различные по природе стрессорные стимулы – стрессоры – различается. Селье показал, что несмотря на различия во внешних раздражителях, во всех случаях кора надпочечников выделяет одни и те же «антистрессорные» гормоны, помогающие организму адаптироваться к любому стрессору. За теорию общего адаптационного синдрома в 1949 году Г.Селье был номинирован на Нобелевскую премию. Согласно этой теории ведущая роль в реакции организма на любые достаточно сильные воздействия среды принадлежит

неспецифической активации гипофизарно-адренокортикальной системы (ГАС). Основные гормоны ГАС – глюкокортикоиды, синтезирующиеся в коре надпочечников, собственно и выполняют эту адаптивную функцию. ГАС и САС являются основными компонентами стресс-системы, функцией которой является адаптация организма в меняющихся условиях внешней среды, в том числе, мобилизация организма при стрессовых воздействиях различного генеза (Henry, 1993; Chrousos and Gold, 1992; Pacak and Palcovitz, 2001; Gold and Chrousos, 2002; Tsigos and Chrousos, 2002), в том числе при развитии долговременных последствий стресса в раннем возрасте (Faravelli et al., 2012).

Обычно под стрессом понимают реакцию организма на негативные воздействия внешней среды, что находит отражение в определениях, которые дают этому феномену различные исследователи. Согласно одному из них, стресс возникает в том случае, если стрессор имеет выраженное повреждающее действие, то есть наносит организму явное повреждение. Нейрогуморальные механизмы развития адаптивных реакций включают три стадии – тревогу, адаптацию и истощение. Г. Селье ввел понятие психоэмоционального стресса (психологического стресса), включающего психические и поведенческие проявления общего адаптационного синдрома. Воздействие психоэмоционального стресса на организм связано с нейротоксическим действием избытка глюкокортикоидов, эксайтотоксичностью возбуждающих аминокислот, оксидативного стресса.

Таким образом, согласно Г. Селье, любое воздействие экстремальных и повреждающих факторов среды, в том числе гипоксии, является для организма стрессом, а следовательно происходит запуск каскада реакций адаптации к стрессу, центральное место среди которых занимает активация ГАС (Reichlin, 1993). ГАС – основная гормональная система адаптации организма, её активация является показателем любого стрессорного состояния, она мобилизует защитные силы организма, предотвращает трансформацию физиологического стресса в патологический (Филаретов и др., 1994). Особенности ответа этой гормональной системы на вредное воздействие является показателем способности организма противостоять этим воздействиям и приводить к развитию адаптивных или патологических состояний.

1.1.4.2. Гипоталамо-гипофизарно адренокортикальная система – основная гормональная системы адаптации организма

Гипоталамо-гипофизарно адренокортикальная система (ГГАС) состоит из нескольких функциональных звеньев (рис. 8):

– *аденогипофиз* в ответ на нейроэндокринный стимул выделяет в кровь адренокортикотропный гормон (АКТГ);

- *кора надпочечников* выделяет в кровоток кортикостероидные гормоны;
- *паравентрикулярное ядро (PVN)* гипоталамуса представляет собой главный нейроэндокринный уровень регуляции ГАС. (Филаретов, 1987; Fulford and Harbuz, 2005; Vale et al., 1981; Owens and Nemeroff, 1991; Gold and Chrousos, 2002). Кортиколиберин (КЛ), нейрогормон выделяемый PVN, является основным нейроэндокринным регулятором/активатором базальной и стрессорной активности ГГАС. КЛ оказывает влияние на ГГАС на нескольких уровнях - он не только вызывает секрецию АКТГ гипофизом, но и стимулирует транскрипцию гена проопиомеланокортина (ПОМК) – предшественника АКТГ (Vale et al., 1981; Lightman and Young, 1988). АКТГ стимулирует гормон-продуцирующие клетки пучковой зоны коры надпочечников к секреции в кровоток глюкокортикоидных гормонов (кортизола и кортикостерона) - конечных продуктов ГГАС, ее эффекторного звена.

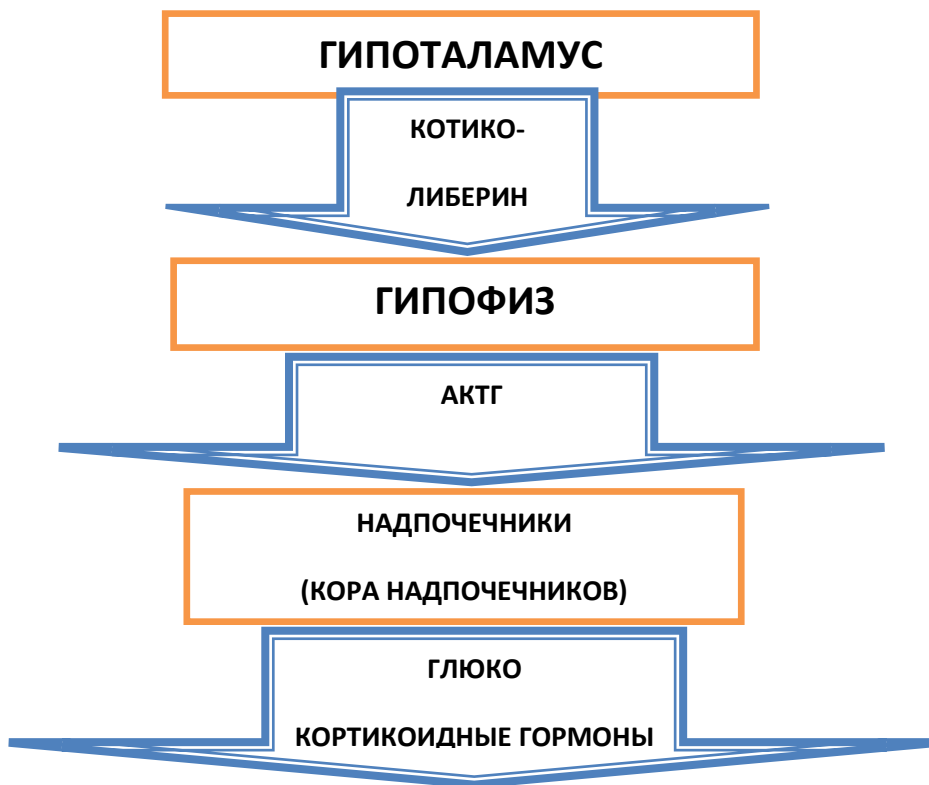


Рис. 8. Гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальная эндокринная ось.

Кортиколиберин представлен не только в гипоталамусе, но и в других областях мозга. Он является образующим звеном пептидной системы регуляции стрессорных реакций (Roseboom et al., 2005), которая составляет основу экстрагипоталамического контура нейроэндокринной регуляции ГГАС (Шаляпина В.Г. и др.2003; Шаляпина, 2005).

ГГАС запускает комплекс реакций, обеспечивающих возможность противостоять неблагоприятным воздействиям (Филаретов и др., 1994, Fulford and Harbuz, 2005),

обеспечивая запуск и координацию поведенческого, эндокринного и висцерального ответов на действие стрессора.

Конечными продуктами активации ГГАС являются *глюкокортикоиды*, которые действуют практически на все органы и ткани организма, усиливая резистентность и адаптируемость при действии стрессора путем изменения поведения и энергетического баланса для активации приоритетных в данных обстоятельствах процессов. Выброс глюкокортикоидов в кровь приводит к ингибированию иммунной системы, роста, репродуктивной системы, пищеварения и перестраивает метаболизм таким образом, чтобы усилить потребление энергии за счет внутренних ресурсов организма. Глюкокортикоиды вызывают ферментативную перестройку, обеспечивающую длительную мобилизацию энергоресурсов путём переключения различных видов обмена на катаболизм. При этом важно не только количество глюкокортикоидов, но и гармоничное функционирование всех звеньев механизма трансформации гормонального сигнала в биохимический ответ клетки - в изменение функциональной активности ядерного аппарата. Цитозольные глюкокортикоидные рецепторы выполняют роль основного посредника в реализации биологической активности гормонов (Биленко М.В., 1989; Теппермен Дж., Теппермен Х., 1989).

Повышенная в течение длительного времени секреция глюкокортикоидов отражает дезадаптивный стрессорный ответ, является вредной для организма и может приводить к возникновению стресс-индуцированных болезней. С другой стороны, недостаточная активация ГГАС может обуславливать пониженную устойчивость организма к стрессу. Для нормальной жизнедеятельности организма необходима сбалансированность работы ГГАС, которая подчиняется сложной многоуровневой регуляции, включающей стимулирующие или ингибирующие эффекты со стороны головного мозга через посредство нейротрансмиттерных систем и супрессирующее влияние самих гормонов по принципу отрицательной обратной связи (Baxter and Tyrrel, 1987; Филаретов, 1987, Чистякова, Савостьянов, 2011). При этом можно выделить три режима функционирования ГГАС: базальный уровень (состояние покоя) с небольшими изменениями, связанными с циркадными ритмами; стрессорная активация; торможение (по принципу обратной связи).

Своевременное торможение ГГАС имеет такое же важное значение, как и активация на стрессорный раздражитель. Длительная активация ГГАС может привести к истощению мышц, сердечно-сосудистым патологиям, нарушениям процессов роста и т.д., в том числе и иммуносупрессии (Baxter and Tyrrel, 1987; Филаретов, 1987, Чистякова, Савостьянов, 2011).

Торможение ГГАС глюкокортикоидными гормонами представляет собой классический пример саморегуляции по механизму отрицательной обратной связи (ООС). Саморегуляция реализуется посредством быстрой и отсроченной ООС, в которой в свою очередь, выделяют ультракороткую, короткую и длинную петли.

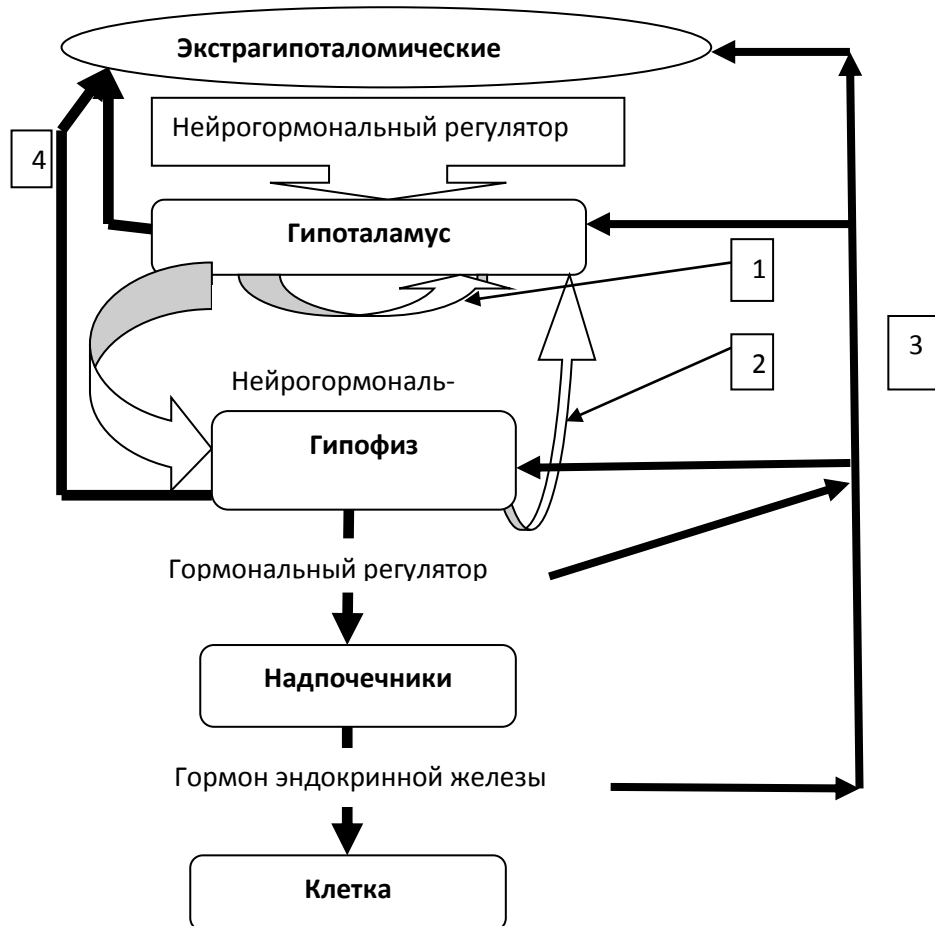


Рис. 9. Саморегуляция ГГАС по принципу отрицательной обратной связи (по Дильман В.М., с модификациями). 1, ультракороткая петля; 2, короткая петля; 3, длинная петля; 4, регуляция активности ЦНС гормонами гипофиза и нейрогормонами гипоталамуса.

В регуляции по принципу ООС можно выделить ультракороткую, короткую и длинную петли (Рис. 9). Быстрая ООС реагирует на изменения уровня секреции глюкокортикоидов (ГК) и опосредуется негеномными эффектами гормонов через неидентифицированные в настоящий момент мембранные кортикостероидные рецепторы (Orchinik et al., 1991; Di et al, 2003). Отсроченная ООС опосредуется реакцией на изменения уровня циркулирующих в крови ГК и реализуется геномными эффектами гормонов через внутриклеточные глюко- (ГР) и минералокортикоидные рецепторы (МР), расположенные в головном мозге и играющие центральную роль в функционировании

механизмов обратной связи (Keller-Wood and Dallman, 1984). (De Kloet, 1991, DeRijk R., de Kloet E.R., 2005). Связывание гормона с мембранным глюкокортикоидным рецептором, сцепленным с G-белком, запускает внутриклеточный каскад, который приводит к активации синтеза эндоканнабиноидов. Последние выделяются из КЛ-нейрона в синаптическую щель и связываются с аффинными рецепторами на пресинаптической мембране глутаматергического нейрона, что вызывает торможение высвобождения возбуждающего медиатора с последующим торможением активности КЛ-нейрона. (Di et al., 2003).

Основным эффекторным центром нейроэндокринной регуляции активности ГГАС является паравентрикулярное ядро гипоталамуса (PVN). Аксоны нейронов паравентрикулярного ядра, образуя гипоталамо-гипофизарный пучок, достигают задней доли гипофиза, где накапливаются гипоталамические нейрогормоны, откуда они поступают в кровоток. На PVN сходятся все регуляторные влияния, как внутри-, так и экстрагипоталамические – от коры, лимбических структур и стволовых центров. Гипоталамус является одним из ключевых звеньев так называемой стресс-системы – сложного регуляторного комплекса, который координирует гомеостаз в обычных условиях и играет ключевую роль в активации и координировании всех изменений в организме, составляющих адаптивную реакцию на стрессоры (Поленов и др., 1993; Филаретов и др., 1994; Pasak and Palkovitz, 2001). Важную роль в запуске и тонкой настройке нейроэндокринного стрессорного ответа играют экстрагипоталамические регуляторные пути, проводящие сигнал от высших отделов кортиколиберинергической системы мозга - неокортекса, септо-гиппокампальной области, миндалевидного комплекса. Они оказывают на гипоталамус нисходящие влияния, которые по своей природе могут быть как нервными, так и нейроэндокринными (Pasak and Palkovits, 2001).

Центральное место среди экстрагипоталамических регуляторов занимает гиппокамп. Вовлечение стероидных рецепторов гиппокампа замыкает длинную петлю глюкокортикоидной обратной связи. Плотность глюко- и минералокортикоидных рецепторов в гиппокампе очень велика. Даун-регуляция кортикостероидных рецепторов гиппокампа приводит к снижению чувствительности ГГАС к сигналам глюкокортикоидной обратной связи, в результате чего организм подвергается длительному действию повышенного уровня циркулирующих глюкокортикоидов. Гиппокампальные влияния на ГГАС являются преимущественно ингибиторными (Jacobson, Sapolsky, 1991). В то же время, повреждения гиппокампа не всегда приводят к активации ГГАС (Herman et al., 2005). Возбудимость нейронов гиппокампа и способность к обучению – два аспекта функций мозга, теснейшим образом зависящие от активности

ГГАС: эффективность обучения находится в прямой зависимости от нормальной степени активации ГГАС, тогда как нарушения реактивности ГГАС в ту или другую сторону приводят к нарушениям когнитивных функций (Meijer et al., 2005).

Неокортекс также играет существенную роль в регуляции ГГАС по механизму ООС. В неокортексе обширно экспрессируются глюко- и минералокортикоидные рецепторы, у крыс, например, уровень экспрессии ГР составляет 75-80% от такового в гиппокампе (Ahima and Harlan, 1990). Повреждение цингулярного и прелимбического отделов неокортекса вызывает усиление секреции АКТГ и кортикостерона, а также экспрессии мРНК c-fos в PVN гипоталамуса после иммобилизационного, но не эфирного стресса, что указывает на участие неокортекса в стрессор-специфичном торможении ГГАС (Diorio et al., 1993; Figueiredo et al., 2003). Роль гиппокампа и неокортекса в регуляции ГГАС не до конца выяснена, однако очевидно, что экстрагипоталамическая регуляция ГГАС является комплексным, стрессор- и регион- специфичным процессом. Таким образом, нейроэндокринные ядра гипоталамуса, а также гиппокамп и неокортекс играют ключевую роль в формировании эндокринного и поведенческого ответа организма на стресс.

Глюко- и минералокортикоидные рецепторы. Центральная роль в функционировании механизмов обратной связи принадлежит кортикостероидным рецепторам. Глюкокортикоидные гормоны реализуют свои геномные эффекты через глюко- (ГР) и минералокортикоидные рецепторы (МР) (De Kloet, 1991) Они участвуют в регуляции ГГАС по принципу ООС в основном за счет чувствительности к изменению уровня глюкокортикоидов крови посредством имеющихся в этих областях внутриклеточных ГР и МР (Keller-Wood and Dallman, 1984; De Kloet, 1991). Кортикостероидные рецепторы, опосредующие биологические эффекты стероидных гормонов, присутствуют в многочисленных тканях и органах и действуют на уровне ДНК, контролируя экспрессию генов-мишеней, то есть являются транскрипционными факторами. На активность ГГАС и стрессоустойчивость организма влияют два типа рецепторов головного мозга – высокоаффинный минералокортикоидный и низкоаффинный глюкокортикоидный.

ГР и МР принадлежат к семейству внутриклеточных (цитозольных и ядерных) рецепторов стероидных гормонов, представляющих собой простые мономерные белки линейного строения. Рецепторная молекула включает в себя несколько структурно-функциональных доменов: гормон-связывающий; ДНК-связывающий и эффекторный фрагменты (Kino and Chrousos, 2005). Лиганд-активированные ГР и МР функционируют как транскрипционные факторы, непосредственно связываясь с участками промоторов

генов, содержащими короткие палиндромные последовательности, - GRE (glucocorticoid response element), влияя таким образом на процессы транскрипции генов (Zilliacus et al., 1995), или взаимодействуя с другими транскрипционными факторами (только ГР) (Pfahl, 1993; De Kloet, 2004). Гены-мишени ГР и МР многообразны, к ним относятся гены про- и анти-апоптотических белков семейства bcl-2, нейротрофических факторов BDNF и NGF, белков кальциевых каналов (Almeida et al., 2000; Hansson et al., 2000; Nair et al., 1998). Репрессия считывания гена возможна как посредством связывания димерного активированного гормон-рецепторного комплекса с негативным nGRE-элементом (negative glucocorticoid response element) промотора, так и посредством взаимодействия мономерного гормон-рецепторного комплекса с другими транскрипционными факторами, такими как AP-1, NFkB, CREB, в результате чего последние теряют способность связываться с ДНК (Heck et al., 1994).

Паттерн экспрессии МР и ГР в мозге различен. МР экспрессируются в основном в септо-гиппокампальной области, а также в миндалине и префронтальном неокортексе (Reul and De Kloet, 1986; Arriza et al., 1988; Ahima et al., 1991; Ito et al., 2000), тогда как ГР имеют более широкое представительство во всех структурах мозга, но в большей степени представлены в КЛ- и ВП-продуцирующих нейронах ПВЯ гипоталамуса, кортикотропocyтах гипофиза, нейронах гиппокампа (Reul and De Kloet, 1986; Aronsson et al., 1988; Uht et al., 1988; Van Eekelen et al., 1988; Ahima and Harlan, 1990). Обнаружено, что аффинность МР к кортикостероидам на порядок превышает таковую ГР (Reul and De Kloet, 1985; De Kloet, 1991). На основании этих данных, а также того факта, что только ГР, но не МР способны взаимодействовать с транскрипционными факторами, возникло представление о том, что МР обеспечивают тоническое ингибирование ГГАС в условиях низкого уровня циркулирующих кортикостероидов, а ГР – в условиях стрессорного подъёма уровня кортикостероидов (Munck et al., 1984; Reul et al., 1990; De Kloet et al., 1998).

Полагают, что соотношение экспрессии ГР и МР играет важную роль в процессах гибели/выживания нейронов гиппокампа при действии экстремальных факторов (Almeida et al., 2000; Crochemore et al., 2005; Rogalska, 2010). Вместе с тем кортикостероидные рецепторы гиппокампа участвуют в регуляции ГГАС (De Kloet et al., 1998, 2005; Pryce, 2008; Rogalska, 2010). Нарушения координированной работы ГР и МР приводят к расстройству функционирования ГГАС (Rogalska, 2010). Активация транскрипционных факторов ГР и МР, наряду с экспрессией других про-адаптивных белков, играет важную роль в механизмах выживания нейронов и регуляции активности ГГАС, нарушаемых

различными патологическими воздействиями, в том числе гипоксическими (Самойлов и Рыбникова, 2012).

1.1.5. Влияние тяжелой гипоксии-ишемии на поведение животных и способность к обучению.

Труды Г.Е. Владимирова, посвященные механизмам гипоксии в начале 1930-х годов положили начало исследованиям высотной гипоксии. Они были особо востребованы с развитием авиации. Под его руководством комплексная экспедиция на Эльбрус решила ряд важных задач, причем были выявлены новые закономерности динамики изменений концентраций лактата и газов крови при воздействии гипобарической гипоксии, которые ревизовали существовавшие тогда представления. Параллельно проводились исследования на крысах с использованием метода меченых атомов, выявивших влияние высотной гипоксии на метаболизм. В то же время Г. Е. Владимиров на основании обобщения итогов исследовательской работы представил хорошо обоснованные рекомендации режимов адаптации и питания в условиях высокогорья (Владимиров, Григорьев, 1945).

У людей, перенесших тяжелую гипобарическую гипоксию, отмечены нарушения обработки информации, снижение внимания и ухудшение когнитивных процессов, при этом в литературе встречаются описания как отдельных клинических случаев, так и исследования экспериментальных групп. Было описано несколько случаев глобальной амнезии, которая встречалась у ряда индивидов в результате быстрого высокогорного подъема и сохранялась после спуска. Джейсон с коллегами провел серию нейрофизиологических исследований, направленных на выявление отсроченных эффектов гипобарической гипоксии у людей совершавших экспедицию на гору Эверест. При этом не в одном из проведенных тестов, каких либо нарушений когнитивных функций выявлено не было. С другой стороны, исследования Хорнбейн с коллегами (Hornbein et al., 1989), направленные на выявление эффектов хронической тяжелой кислородной недостаточности, связанной с экстремальными восхождениями, выявили нарушения в кратко- и долгосрочной зрительной памяти, проявлявшейся в увеличении ошибок в скрининг тестах на афазию и снижении скорости работы пальцев. Однако через год нарушения памяти и афазия не проявляли себя в исследованных группах людей. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными Регардом с сотрудниками (Regard et al., 1989), которые показали, что экстремальные восхождения могут обуславливать незначительные, но устойчивые нарушения концентрации внимания,

кратковременной памяти, а также способности изменения стратегии поведения и контроля ошибок.

В настоящее время опубликовано лишь несколько статей (Barhwal et al., 2007, 2009; Maiti et al., 2008; Shukitt-Hale et al., 1994), в которых описаны нарушения поведения у грызунов в условиях гипобарической гипоксии, при этом большинство исследований были посвящены влиянию хронической гипоксии (3-21 день, “подъем” на 6100м). Полученные данные свидетельствуют, что в условиях тяжелой гипобарической гипоксии существенно нарушается как кратковременная, так и долговременная память, процесс обработки информации, способность к обучению. В других исследованиях при хронической гипобарической гипоксии, различных циклических гипоксиях и ишемии (Squire, Zola, 1996), а также в нашей лаборатории на модели острой тяжелой гипобарической гипоксии (Батаева и др., 2004а; Rybnikova et al., 2005) было показано, что гипоксические воздействия способны вызывать ретроградную и антероградную амнезию.

1.2. Современные представления о действии повреждающих факторов в раннем онтогенезе на развивающийся мозг.

1.2.1. Влияние гипоксии на развивающийся мозг

Проблема пренатальной гипоксии и отдаленных ее последствий является чрезвычайно актуальной с точки зрения механизмов развития различных патологических состояний (Leonard, Goldberger, 1987). Современные исследования показали развитие патологических изменений функциональных показателей головного мозга в ответ на воздействие экстремальных факторов в пренатальном периоде развития. Гипоксия занимает важное место в генезе нарушений развития организма (Журавин, и др. 2001, 2003; Отеллин и др., 2012). Это обусловлено тем, что гипоксия стоит на первом месте в ряду причин гибели плода в антенатальном периоде, а также во многом определяет частоту психических и физических заболеваний в постнатальном онтогенезе (Барашнев, 2000, Жукова и др. 1984, Nyakas et al. 1996). Хроническое кислородное голодание наблюдается практически при всякой патологии беременности, включая инфекционные заболевания женщин, гипертензивные нарушения почечного или сердечно-сосудистого генеза или вследствие тяжелой нефропатии беременных (Торубарова и др., 1993). Кислородная недостаточность приводит к характерным изменениям метаболизма, гемодинамики и микроциркуляции при рождении у каждого второго ребенка и нарушает процессы адаптации в первые дни жизни у 50-75% детей (Федорова и Калашникова, 1986). Поражения головного мозга вследствие перенесенной перинатальной гипоксии-ишемии в настоящее время является одной из основных причин внезапной смерти и

стойких неврологических расстройств у детей раннего возраста. Статистика свидетельствует о 2-4 случаях системной асфиксии на 1000 детей, родившихся в срок. У преждевременно родившихся детей и детей со сниженной массой тела этот показатель достигает 60% (Vannucci, 2000; Volpe, 1992). По российской статистике (Г.М.Бордули, О.Г.Фролова, 1997) в структуре причин перинатальной смертности, мертворожденности и ранней неонатальной смертности ведущее место занимали внутриматочная гипоксия и асфиксия в родах – 40,42%. От 20 до 50% новорожденных детей с гипоксически – ишемической энцефалопатией после перенесенной перинатальной асфиксии умирают, а у 25% выживших могут развиваться нейропсихологические нарушения, включая задержку умственного развития, церебральный паралич и эпилепсию, а также неспособность к обучению. Важно иметь в виду, что интранатальная асфиксия и, так называемая, родовая травма чаще поражают нервную систему аномально развивающегося плода (Бадалян, 1984). В этих случаях вредоносные факторы родового периода накладываются на дизэмбриогенез, и даже характерные для нормальной родовой деятельности ситуации могут оказаться сверхсильными, превышающими адаптационные возможности аномально развивающегося плода. У большинства детей поражение нервной системы происходит внутриутробно и лишь осложняется в процессе родов механической травмой мозга, кровоизлиянием в мозг или же теми патологическими изменениями в сосудистой и нервной системах, которые возникают при асфиксии (Ходос, 1974). Дети, перенесшие перинатальную гипоксию, в анамнезе в течение 1-го года жизни проявили неврологические изменения у 45% детей в течение первых 4-х мес., а у 10% в течение всего первого года (Громбах, 1981)

У плода 23-32 нед пренатальная гипоксия часто приводит к повреждению субкортикального развития белого вещества – перивентрикулярной лейкоэнцефалопатии (Terrie and Volpe, 2000; Du Plessis and Volpe, 2002). Задержки развития у детей приводят к нарушениям способности к обучению, двигательной активности вплоть до церебрального паралича и другим последствиям (Tuor et al., 1996; Roland et al., 1998). Ранние повреждения мозга, такие, например, как разрушение белого вещества в результате гипоксии-ишемии у недоношенных и новорожденных с низкой массой тела являются высоким фактором риска, приводят к ранней смертности и хроническим заболеваниям, в том числе к сенсорным, моторным, поведенческим и когнитивным расстройствам (Delcour et al., 2012a, b). Гипоксия-ишемия часто встречается в контексте с дисфункцией плаценты, длительными родами, преждевременными родами, сердечно-сосудистыми патологиями.

Гипоксия плода или новорожденного влечет за собой длительно текущий стадийный патологический процесс. Совершенно особое место занимает стадия, которая наступает вслед за острой гипоксией и характеризуется, с одной стороны, расстройством мозгового кровообращения, а с другой – глубокими нарушениями процессов роста и дифференцировки клеточных элементов головного и спинного мозга. Именно эта стадия совпадает с наиболее ответственными периодами постнатальной адаптации и созревания организма, особенно его мозга. Морфологические изменения со стороны сосудистой системы мозга свидетельствуют о состоянии хронической гипоксии в этот период, в основе которой лежат не только нарушения процессов доставки кислорода и субстратов окисления, но и глубокая дезорганизация клеточного метаболизма.

Диагностика поражений мозга у новорожденных, причиной которых является перинатальная гипоксия-ишемия, в большинстве случаев затруднительна. Разработка методов диагностики и лечения последствий пренатальной гипоксии-ишемии является первостепенной задачей для большинства исследователей и клиницистов, работающих в этой области. Изучение влияния пренатальной гипоксии началось в 50-е годы прошлого века и является актуальным до настоящего времени. Совершенствование подходов, особенно применение молекулярно-клеточных методов, к этим исследованиям помогают понять механизмы вызываемых повреждений и разработать стратегию компенсаторной терапии. Предполагается, что на основе этих исследований будут созданы предпосылки для прорыва в области разработки методов лечения, позволяющих эффективно справляться с патологиями подобного рода.

Для более полного понимания механизмов нарушений, вызываемых пренатальной гипоксией, необходимы модельные эксперименты на животных. Эти модели позволяют понять природу и степень нарушений развития ЦНС и разработать стратегию терапевтической компенсации.

Современные представления о механизмах действия гипоксии-ишемии на мозг и методах лечения ее последствий основываются, преимущественно, на данных, полученных на взрослых животных. Считается общепринятым, что в результате глубокой гипоксии или ишемии развивается недостаточность энергетического обеспечения тканевого метаболизма. Установлено, что в условиях недостатка кислорода первым страдают нейроны, потребность которых в энергетическом обеспечении выше, чем всех других клеток организма. Гипоксическая экспозиция приводит к развитию ацидоза, окислительного стресса, глутаматергической эксайтотоксичности. 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 Na^+ , Ca^{2+} (Nyakas C., 1996, Lipton P., 1999. Самойлов 1999). Прямой перенос данных, полученных на взрослых животных, на новорожденных затруднен, т. к. требует решения следующей парадоксальной ситуации. Общепринято, что незрелый мозг «устойчив» к повреждающему действию гипоксии-ишемии. Согласно представлениям о норме для взрослых плод в матке находится в условиях глубокой гипоксии. Считается, что плод не страдает от недостатка кислорода потому, что его потребности гораздо ниже, чем у взрослого, а гемоглобин плода обладает более высоким сродством к кислороду. Наряду с этим высказывается предположение, что внутриутробная гипоксия является необходимым условием развития организма (Авршавский, 1982). В пользу этих предположений свидетельствуют данные, показавшие, что гипоксия способствует усилению пролиферации и накоплению прогениторных клеток в условиях культуры (Zhao et al., 2008).

Острая гипоксия может возникать на самых различных сроках беременности как неспецифическое проявление токсикозов и болезней сердечнососудистой и дыхательной систем, курение и употребление алкоголя во время беременности и г. п. Однако в экспериментальных и клинических исследованиях неоднократно было показано что в пре- и перинатальном онтогенезе можно выделить периоды, характеризующиеся повышенной восприимчивостью мозга к различным повреждающим факторам. Предъявление повреждающего воздействия до или после закладки определенной структуры приводит к менее разрушительным последствиям, чем воздействие в период созревания органа (Rice and Barone, 2000). Развивающийся мозг наиболее уязвим в период «максимально быстрого развития мозга» (Dobbing J. 1968). Исследования молекулярно-клеточных основ развития мозга и нейрональной дифференциации выявили несколько периодов, названных «критическими». Одним из уязвимых периодов является период клеточного митоза (undergo mitosis) (Nyakas C., et all. 1996).

Воздействие гипоксии или гипоксии-ишемии на развивающийся мозг может нарушать последующее его развитие и повлечь за собой долговременные негативные последствия. Последствия гипоксии проявляются не сразу, но независимо от того, на каком этапе внутриутробного развития действуют условия кислородной недостаточности, они влекут за собой длительно текущий процесс. Особенно пагубно действие гипоксии в критические периоды развития мозга.

Критические периоды развития наиболее чувствительны к самым разнообразным внешним воздействиям, когда происходит самое активное деление клеток и их дифференциация. Хотя в основе всех подобных периодов лежит временное повышение чувствительности к некоторым внешним влияниям, каждый из них имеет свои

характерные особенности: сущность происходящих изменений; факторы, к которым повышается чувствительность; степень избирательности к восприятию; временной режим; последствия неадекватной реализации; обратимость результата.

Согласно П.Г.Светлову, критические периоды совпадают с моментом детерминации, то есть с концом одной и началом другой цепи дифференциации. Как он считал, в это время снижается активность регуляторной способности. В определенные моменты развития зародыши чувствительны к различным внешним воздействиям, причем реакции на разные стимулы как правило однотипны. (Светлов П.Г. 1960). В основе избирательного повышения чувствительности лежит усиление процессов обмена веществ в наиболее быстро растущих органах и тканях. В общем, критические периоды в ходе внутриутробного развития ребенка совпадают со временем наиболее интенсивного роста и дифференцировки; они как бы маркируют процесс развития, отмечая стадии морфогенеза. Таким образом, критическим в полном смысле слова следует называть тот период времени, когда организм должен испытывать нормативные воздействия, и это является условием его дальнейшего полноценного развития. Светлов предложил выделить в гестационный период плацентарных млекопитающих два критических: первый – имплантация зародыша, второй – формирование плаценты. Однако этими двумя периодами нельзя описать всю проблему критических периодов.

В процессах закладки каждого органа и ткани существуют особо чувствительные периоды, когда неблагоприятные воздействия окружающей среды могут привести к отклонениям в развитии. В критические периоды плод становится высоко реактивным и лабильным по отношению к внешним воздействиям. Вредоносные воздействия на зародыш приводят к избирательным нарушениям именно того органа, который находится в стадии наиболее интенсивного формирования – роста и дифференциации. Изменения в ходе критического периода носят необратимый характер, в результате чего структура и функция приобретают законченную форму, не чувствительную к модифицирующим воздействиям в более позднем возрасте. Весьма вероятно, что критические периоды наиболее характерны для анатомо-морфологических изменений в ходе развития (Отеллин, 2003).

Критическим периодом развития головного мозга у человека является 15-20-я недели беременности. Каждая мозговая структура имеет свои характеристики созревания: начало, скорость, конец процесса и соответствующий этому период максимальной чувствительности. Иначе говоря, онтогенез ЦНС включает последовательное повышение чувствительности отдельных ее звеньев, связанное со временем наиболее интенсивного развития каждого из них.

В созревании ЦНС можно выделить два аспекта. Первый – рост и самодифференцировка нейронов и их связей, мало зависящие от внешних воздействий и идущие по генетической программе. Второй – сходные изменения нейронов, но вызванные функциональной активностью под влиянием внешней среды.

Использование моделей на животных применительно к человеку требует соотношения основных поведенческих характеристик и критических периодов. При сопоставлении модели гипоксии-ишемии на животных с человеком важное место занимает возраст (сроки) предъявления воздействия, критические сроки наибольшей уязвимости нейронов и глии в период беременности и новорожденности. В этом аспекте мозг мыши и крысы в последний триместр беременности соответствует стадии развития мозга человека 1-2-го триместра гестации, развитие мозга крысы в первые 2 недели постнатального онтогенеза соответствуют 3-ему триместру беременности человека (Bayer et al., 1993). Такое соответствие очень удобно, но слишком обобщено, так как различные области мозга человека и грызунов развиваются с разной скоростью. Более точные

Область мозга/ срок развития плода человека (нед.)	1-4 5-8 9-12 13-16 17-20 21-24 25-28 28-31 32-35
Неокортекс CR-нейроны слой IV-11 слой V слой VI Амигдала Гиппокамп CA 1-3 Зубчатая извилина Стриатум Гипоталамус Таламус	E14 E16-E19 E15-E18 E15-E17 E13-E16 E15-----E20 E20-----P19 E15-----E22 E13-----E19 E14-E17

Таблица 2. Соотношение развития мозга крысы и человека. (По Golan and Huleihel, 2006)

соотношения показаны в таблице 2. Кроме того, надо учитывать различия в синхронизации клеточной пролиферации, миграции клеток и синаптогенеза (Дубровская и Журавин, 2008; Журавин и др., 2009; Резников, 1981; Herlenius and Lagercrantz, 2004). При описании моделей на животных надо принимать во внимание все эти несоответствия.

При изучении влияния пренатальной гипоксии-ишемии на животных используется большое количество протоколов, различающихся по виду и возрасту животных при применении воздействия, степени и продолжительности воздействия, а также по возрасту, когда происходит тестирование изучаемых параметров. Различают фетальный

(беременность) и неонатальный периоды. При более детальном рассмотрении периоды развития делятся на: доплацентарный (E0-12); пренатальный (E0-E16-17); перинатальный (E18-21 – P1-10); неонатальный (P1-10).

Важным показателем является процент содержания кислорода при гипоксическом воздействии. Наиболее часто рассматриваемыми моделями являются гипоксия со сниженным содержанием кислорода во вдыхаемом воздухе и, соответственно, недостаточное снабжение мозга O_2 , и ишемия, при которой нарушается снабжение мозга кровью.

В большинстве экспериментальных исследований, связанных с изучением нарушений развития мозга под влиянием гипоксии-ишемии, используется модель унилатерального повреждения головного мозга новорожденных крыс, вызванного ишемическим инсультом (Rice et al., 1981; Vannucci and Vannucci, 1997; Vannucci et al., 1996). Позже, эта модель была модифицирована для ее использования на мышах (Sheldon et al., 1998). Метод заключается в полной перевязке сонной артерии с последующей экспозицией животного к гипоксии, которая предполагает подачу газовой смеси, состоящей из кислорода (8%) и окиси азота. С такой перевязкой семисуточные крысята способны сохранять жизнедеятельность до 2.5-3 часов; при более длительной гипоксии наступает массовая гибель животных.

В этой модели гипоксия приводит к гипоксемии, которая усугубляется гиперкапнией, вызываемой гипервентиляцией; гиперкапния компенсирует метаболический ацидоз, возникающий вследствие накопления лактата, и, как результат, системное pH в этих условиях не отличается от контрольного (Vannucci et al., 1995). Во время гипоксии системное кровяное давление падает на 25-30%, а внутримозговое кровоснабжение полушария, расположенного ипсилатерально по отношению к перевязанной сонной артерии, снижается на 40-69% по сравнению с таковым у контрольных крыс (Vannucci et al., 1988). Внутримозговое кровоснабжение восстанавливается немедленно, сразу после возвращения в условиях нормоксии. Важно отметить, что гиперемия, характерная для периода реперфузии после ишемии у взрослых животных, у незрелых крысят не развивается (Mujscse et al., 1990). У крысят, переживших 2-3-часовую экспозицию, гипоксия-ишемия вызывает изменения в мозге в виде массовой гибели нейронов или появления геморрагических очагов; в ряде случаев и то, и другое происходит одновременно. Гипоксия-ишемия, как правило, вызывает поражения коры головного мозга, субкортикального и перивентрикулярного белого вещества мозга, а также стрио-таламической системы и гиппокампа. Подобные разрушения редко наблюдаются в контралатеральном полушарии, практически отсутствуют, у крысят,

подвергавшихся воздействиям не ишемических форм гипоксии (Towfighi et al., 1995; Vannucci and Vannucci, 1997).

Другой интересной моделью изучения кислородного голодания в пренатальном периоде является нормобарическая гипоксия (Журавин и др., 2001, 2003, 2008; Отеллин и др. 2003; Отеллин и др., 2012). Экспериментальных животных помещали в камеру, которая заполнялась газовой смесью, в которой процентное содержание кислорода снижалось с 20,7 % до 7%. Было показано, что формирование нервной ткани коры в постнатальном онтогенезе крыс, перенесших гипоксию в период пролиферации и миграции нейробластов, сопровождается не только изменением клеточного состава разных слоев коры в раннем онтогенезе, но также снижением числа синапто-нодин-позитивных шипиков в молекулярном слое, которое сохраняется у взрослых животных (Васильев и др., 2008).

Одним из интересных направлений исследований в изучении уязвимости развивающейся ЦНС в экспериментах на животных является оценка долгосрочных последствий гипоксического воздействия и развития стойких мозговых дисфункций. Воздействия гипоксии-ишемия и эксайтотоксичности считаются особо важными, и, несмотря на свой острый характер воздействия на головной мозг, развиваются в течение длительного периода времени. Концепция, что большинство повреждений нервной системы развивается с задержкой после воздействия, позволяет обеспечить эффективную нейропротекторную терапию после травмы.

1.2.2. Энергетический метаболизм в мозге на ранних стадиях онтогенеза

Церебральная гипоксия-ишемия является достаточно серьезным воздействием, чтобы привести к истощению энергетических запасов ткани мозга, но часто сопровождается полным восстановлением утилизации глюкозы, АТФ и креатинфосфата после реоксигенации (Gilland et al., 1998). После этого происходит повторное снижение высокоэнергетических фосфатов вместе с параллельным снижением тканевого метаболизма глюкозы и развитием клеточных повреждений (Blumberg RM, 1997; Gilland E, 1998). Аналогичным образом, младенцы с энцефалопатией новорожденных проявляют характерные нарушения мозгового энергетического обмена, который часто нормализуется вскоре после рождения, но постепенно снижается спустя несколько часов (Azzopardi D, 1998). Последствиями такого проявления последствий гипоксии-ишемии при развитии нервной системы могут стать нарушения зрения вплоть до слепоты. Существует связь между величиной повторного спада энергетического метаболизма и серьезностью долгосрочных нарушений развития нервной системы (Roth, 1997).

Широко признано, что первичная гибель клеток, вследствие гипоксии-ишемии, происходит в результате потери энергии, которая проявляется, в частности, снижением уровня АТФ. Глюкоза является основным энергетическим субстратом как для мозга взрослых, так и новорожденных млекопитающих. Однако нельзя не учитывать и то, что в характере метаболизма глюкозы в сформировавшемся мозге и незрелом мозге имеются определенные различия, что особенно важно при анализе последствий гипоксии и оценке резистентности и уязвимости к недостаточности энергетического обеспечения при действии гипоксии-ишемии. В незрелом мозге уровень общего церебрального энергетического метаболизма относительно невысок и напрямую зависит от зрелости нейронов и синаптической активности, свойственной исследуемому возрасту (Cremer, 1982; Nehlig and Pereira de Vasconcelos, 1993). Кроме того, новорожденные грызуны, так же как и дети могут легко утилизировать не только глюкозу, но и другие субстраты, такие как лактат и кетоновые тела, для удовлетворения своих энергетических потребностей (Edmond et al., 1985; Nehlig and Pereira de Vasconcelos, 1993). В течение первых двух недель жизни крысята-сосунки преимущественно утилизируют кетоновые тела; причиной является высокое содержание жира в молоке грызунов. В сосунковом периоде кетоновые тела могут обеспечивать до 60% церебрального метаболизма (Nehlig and Pereira de Vasconcelos, 1993). Транспорт этих субстратов из системы кровообращения в мозг опосредуется белками, принадлежащими к двум семействам мембранных транспортных протеинов - связывающие глюкозу (glucose transporter proteins, GLUTs) и переносчики монокарбоксилатов (monocarboxylic acid transporter proteins, MCTs) (Dwyer et al., 2002; Price et al., 1998; Vannucci et al., 1997). Хотя GLUT1 and GLUT3, and MCT1 and MCT2 образуют отдельную мультимембранную семью гомологичных белков, каждый из них является основной изоформой соответствующих семейств, выделяемых в мозге млекопитающих. Транспорт глюкозы через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) опосредуется высоко гликолизированными (55kDa) формами GLUT1, менее гликолизированная форма 45 kDa GLUT1 экспрессируется в хороидном сплетении, в эпендиме плаценты, а также в глиальных элементах мозга; GLUT3 является транспортером глюкозы в нейронах (Vannucci et al., 1997). В течение первых двух недель жизни утилизация глюкозы в мозге крысят составляет 10% от уровня ее утилизации в мозге взрослых животных; этот период характеризуется относительно низким уровнем GLUT. Важно также, что повышение экспрессии GLUT3 приходится на период, когда происходит созревание нейронов, миелинизация и синаптогенеза (Nehlig et al., 1988; Vannucci et al., 1994). Однако, в течение первых двух недель жизни кетоновые тела обеспечивают значительную часть потребностей мозга в энергии, и, соответственно,

уровень экспрессии, особенно МСТ1 в ГЭБ, отражает повышенную утилизацию кетонов. В мозге 1-14-суточных крысят обнаруживается очень высокий уровень МСТ1 mRNA в ГЭБ, которая экспрессируется в клетках всех типов, нейронах и глии, в то время как МСТ2 экспрессируется в нейрональных элементах (Pierre et al., 2000; Vannucci and Simpson, 2003). Таким образом, незрелые нейроны характеризуются низкой способностью транспортировать глюкозу и высокой способностью транспортировать кетоновые тела и лактат. Во время гипоксии и гипоксии-ишемии повышается зависимость мозга от анаэробного гликолиза, что усиливает церебральную утилизацию глюкозы (Vannucci et al., 1994). Однако, низкая концентрация транспортеров глюкозы в мозге 7-суточных крысят препятствует церебральной утилизации глюкозы в этом возрасте. Уровень глюкозы быстро падает до едва определяемого уровня, несмотря на почти нормальное ее содержание в плазме крови. Первые признаки церебральной энергетической недостаточности начинают проявляться на 90-й минуте экспозиции гипоксии-ишемии (Yager et al., 1992a).

Незрелые крысята, подвергаясь воздействию гипоксии-ишемии, способны выживать в течение более длительного периода, чем взрослые животные. Это их свойство объясняется более низкими энергетическими потребностями. Однако неспособность транспортировать достаточное количество глюкозы через ГЭБ в значительной мере лимитирует утилизацию глюкозы в мозге, что делает крысят болееязвимыми к гипоксии. Показано, что факторы, приводящие к развитию гипергликемии обеспечивают протекцию незрелого мозга при гипоксии-ишемии (Voorhies et al., 1986). Известно, что противоположное действие оказывает гипергликемия на зрелый мозг; в этом случае преишемическая гипергликемия усиливает разрушение ткани мозга. Сразу после возвращения к нормоксии, однако, содержание глюкозы в мозге крысят увеличивается в два раза, достигая нормального уровня (Vannucci, 1992), а дальнейшее добавление глюкозы в кровь во время периода восстановления способствует проявлению деструктивных изменений (Sheldon et al., 1992). Другое уникальное свойство незрелого мозга, на котором следует остановиться, это повышенная способность транспортировать как лактат, так и кетоновые тела в мозг и выводить их из него. Так, при повышении уровня лактата во время гипоксии-ишемии он или быстро утилизируется, или выводится из мозга в течение короткого периода после начала восстановления. Даже ничтожное повышение уровня кетонов в крови, обусловленное ночным голоданием или подкожными инъекциями, может послужить дополнительным источником энергии, которая необходима для обеспечения протекции мозга крысят, подвергавшихся воздействию гипоксии-ишемии (Yager et al., 1992b).

Учитывая роль митохондрий в качестве основного поставщика АТФ, можно предположить, что именно они будут первыми реагировать на последствия гипоксии/ишемии. Многие факторы могут влиять на митохондриальный баланс и нормальное их функционирование: ДНК-мутации, увеличение внутриклеточного кальция, АФК, воспаления, снижение трофических факторов. Митохондриальные дисфункции играют важную роль в повреждении мозга (DiMauro, 2008). Расположение митохондрий в клетке колеблется между типами клеток, но они чаще всего локализуются вблизи максимальной потребности АТФ, так как их главная роль производство и поставка энергии к клеткам через ферментативные комплексы дыхательной цепи. Функции митохондрий очень важны в течении всего периода развития и в течении всей жизни как основной составляющей во всех метаболических процессах, клеточной пролиферации, регуляции клеточного редокс состояния, апоптоза, эксайтотоксичности и др. Растет интерес к митохондриальным болезням, приводящими к нарушениям дыхательной цепи/окислительного фосфорилирования. Митохондриальные болезни, возникающие, главным образом, из-за мутаций ядерной или митохондриальной ДНК, приводят к нарушению транскрипции, трансляции и сборки ферментных комплексов, ведущие к порокам развития, и/или нарушению работы митохондрий (Kucharczyk, 2008; Schon, 2010). Нарушения дыхательной цепи, связанные со старением, приводят к нейродегенеративным расстройствам (Baron, 2007) и митохондриальным заболеваниям (Kucharczyk, 2008). Во время старения, неэффективность дыхательной цепи связывают со снижением активности AMP-activated protein kinase (AMPK), что ведет к снижению биогенеза и функций митохондрий (Jornayvaz, 2010). В развитии нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Паркинсона и Альцгеймера, происходит увеличение АФК, приводящих к окислительному стрессу, что является ключевым инициатором нарушений дыхательной цепи, что приводит в конечном итоге к гибели клеток (Baron, 2007).

Очень мало известно о том, что происходит с дыхательной цепью при перинатальном повреждении головного мозга в результате гипоксии-ишемии. После неонатальной гипоксии мозга наблюдается значительный сбой энергетического баланса в мозге, затем восстановительный период перед повторным этапом развивающейся энергетической недостаточности (Vannucci, 2004; Wyatt, 1989). В настоящее время, большинство исследователей в области перинатальных повреждений головного мозга, основное внимание уделяют отсроченной гибели клеток и последующему повреждению тканей (Hagberg, 2004). Однако то, что происходит непосредственно вслед за воздействием и какие механизмы приводят к отсроченному нарушению энергетического метаболизма остаются неизвестными.

Нарушения биогенеза митохондрий и их целостности, скорее всего, происходят в самом начале каскада событий, приводящих, в конечном счете, к необратимым нарушениям вплоть до апоптоза после гипоксии-ишемии (Hagberg, 2004). Недавно показан пик активности AMPK уже через 20 мин после гипоксии-ишемии в мозге новорожденных мышей (Rousset et al., 2012). AMPK хорошо известна, как энергетический датчик клетки и активируется, когда существует дисбаланс в соотношении АМФ/АТФ (например, в условиях теплового шока, кислородного голодания, и так далее) (Carling, 2005). Активация AMPK будет препятствовать развитию энергопотребляющих путей (синтез жирных кислот, синтез холестерина) и приводить к увеличению производства энергии (гликолиз, или через увеличение биогенеза митохондрий, (Scarpulla, 2011), в попытке восстановить энергетический баланс, что является критичным для выживания клетки. AMPK активируется рядом киназ: LKB1 и CaMKK β (Woods, 2003). Последний активируется при резком увеличении внутриклеточного кальция, которое приводит к эксайтотоксичности вследствие гипоксии (Mespès et al., 2005). Кроме того, AMPK, как недавно было показано, является посредником апоптоза через экспрессию проапоптотических белков Bim (Concannon et al., 2010). Таким образом, увеличение уровня внутриклеточного Ca²⁺ приводит к эксайтотоксичности и запуску АФК-сигналикации (Mungai et al., 2011), что может не только активировать CaMKK β , а затем AMPK, но может также одновременно нарушать дыхательную цепь митохондрий, что, в свою очередь, приводит к дисбалансу отношения АМФ/АТФ, усиливая AMPK активацию через киназу LKB1 (Рис. 10).

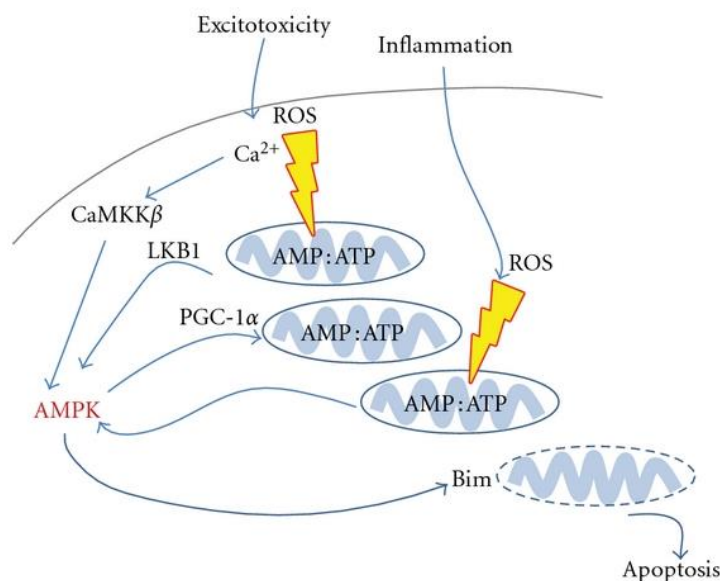


Рис. 10. Возможная роль AMPK в повреждении клеток мозга в пренатальном периоде. AMPK активируется в ответ на стрессы (в том числе гипоксические), которые

изменяют либо уровень Ca^{2+} внутри клетки, приводя к эксайтотоксичности, или разрушают внутриклеточные запасы АТФ, вызывая, например, воспаление, продукцию активных форм кислорода. Хотя в результате активации АМРК нормализуется энергетический баланс клетки, длительная активация приводит к экспрессии белка Vim и в результате к апоптозу. (Thornton et al. 2012)

1.2.3. Нейротоксичность глутамата и регуляция NMDA рецепторов в раннем онтогенезе.

Истощение энергетических резервов клеток в условиях длительного действия гипоксии или гипоксии-ишемии вызывает деполяризацию нейронов и глиальных клеток, и выброс избыточного количества возбуждающих аминокислот – глутамата и аспартата во внеклеточное пространство. В результате возникающего энергетического дефицита нарушается также обратный захват этих аминокислот поврежденными глиальными клетками. Содержание глутамата достигает уровня, достаточного для запуска механизмов эксайтотоксичности; происходит перевозбуждение *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) рецепторов. При запуске патологического механизма эксайтотоксичности происходит избыточное накопление внутриклеточного кальция, который и является конечным индуктором необратимой гибели нейронов (обзор: Dirnagl et al., 1999). Затем через определенный промежуток времени развивается апоптоз. Таким образом, процесс эксайтотоксического повреждения клеток наступает в течение нескольких минут, а воспаление и апоптоз развиваются в последующие часы и дни.

Последствия активации NMDA рецепторов могут быть особенно тяжелыми для незрелого мозга. Глутамат является важным трофическим фактором, играющим значительную роль в развитии мозга, а NMDA рецепторы в период раннего онтогенеза выполняют специфические функции, не характерных для зрелого организма, т.е. осуществляют контроль пролиферации и миграцию нейробластов, а также синаптогенеза и формирования нейрональной пластичности (Komuro and Rakic, 1993; McDonald and Johnston, 1990). Согласно современным данным между NMDA рецепторами, присутствующими в незрелом мозге и мозге взрослых животных, имеются определенные функциональные и структурные различия, определяющие повышенную уязвимость незрелого мозга к эксайтотоксическим повреждениям на определенных стадиях онтогенеза (see Johnston, 1995, and references therein). NMDA рецепторы являются гетеро-олигомерными комплексами, формируемыми комбинацией трех субъединиц: NR1 (8

различных сплайсинг-вариантов) и NR2 (от A до D) и NR3 (Ciabarra et al., 1995; Moriyoshi et al., 1991; Nishi et al., 2001; Sucher et al., 1995). В то время как, NR1 имеет важное значение для формирования лиганд- и потенциал-активируемых ионных каналов, специфические фармакологические и биофизические свойства зависят от субъединицы NR2 (или NR3) (Cull-Candy et al., 2001; Dingledine et al., 1988; Sucher et al., 1996). В ходе развития происходят значительные изменения в уровне экспрессии субъединицы NR2: в течение первых двух недель жизни наблюдается высокий уровень экспрессии субъединицы NR2B, а во взрослом мозге преобладает субъединица NR2A (Gurd et al., 2002; Sheng et al., 1994; Zhong et al., 1995). Сдвиг в соотношении между NR2A и NR2B отражается на свойствах рецепторов, и, в частности, может являться причиной повышенного поступления кальция в клетку при глутаматной активации, что, в свою очередь, может способствовать повышению чувствительности незрелого мозга к действию гипоксии-ишемии (Johnston, 1995).

Функциональная активность рецепторов регулируется на клеточном уровне посредством реакций фосфорилирования компонентов субъединиц рецепторов (Raymond et al., 1994; Swope et al., 1999). Тирозин фосфорилирование субъединицы NR2 вызывает активацию рецепторных ионных каналов (Kohr et al., 1994; Wang and Salter, 1994). Кроме того, фосфорилирование NR2 может изменять степень связывания ее с протеинами постсинаптических уплотнений и влиять на активность внутриклеточных сигнальных каскадов (Gurd, 1997; Takagi et al., 1999). В норме в ходе развития наблюдается активирование церебральной тирозинкиназной активности (Cudmore and Gurd, 1991; Gurd and Bissoon, 1990). Эти изменения напрямую связаны с усилением процессов тирозин фосфорилирования NMDA рецепторов (Gurd et al., 2002). Хотя у 7-суточных крысят уровень NR2A ниже, чем у 21-суточных, первые характеризуются повышенным базальным уровнем фосфорилирования, что может способствовать повышенной возбудимости NMDA рецепторов. Повышение возбудимости последних имеет несомненное значение в этот период для нормального развития мозга, в то же время может увеличить риск поражения мозга при гипоксии-ишемии (Gurd et al., 2002).

1.2.4. Системы внутриклеточной регуляции в незрелом мозге

Кроме NMDA рецепторов большое значение в развивающемся мозге играют метаботропные рецепторы. Активация метеботропных рецепторов индуцирует стимуляцию фосфоинозитидного ответа. Важно отметить отсутствие параллелизма процесса формирования различных рецепторов и проявление фосфоинозитидного ответа. Речь идет о рецепторных отношениях. Видимо следует говорить об организующей –

проявляющийся участием в формировании мозга, и медиаторной роли рецепторов. На ранних этапах рецепторов мало, но их роль велика из-за высокой чувствительности фосфоинозитидных систем. (Balduino, 1991).

Первостепенное значение имеет решение следующего вопроса. Каковы могут быть последствия повышения метаболизма фосфоинозитидов для развития мозга. Ранний постнатальный период (1-15-е дни жизни) у крыс, который обозначается как «brain growth spurt» (период взрывного роста мозга), характеризуется формированием дендритов (ветвлением дендритов –dendritic arborization), установлением синаптических контактов и пролиферацией астроглии (astroglial cell proliferation). В определенных областях мозга, таких как мозжечок, в течение перинатального периода развиваются специфические нейроны (Porkinje cells). Некоторые нейромедиаторы, особенно ацетилхолин и глутамат, концентрация которых в мозгу неонатальных крыс достаточно высока, могут, таким образом, играть главную роль в развитии мозга. Участие этих нейромедиаторов в развитии мозга опосредуется через фосфоинозитидные пути. Роль, которую играют нейромедиаторы, имеет несколько граней. В астроцитах происходит гидролиз фосфоинозитидов под воздействием ацетилхолина, глутамата, а также норадреналина и серотонина (Balduino et al., 1991). Прямая активация протеинкиназы C в астроцитах, как известно, стимулирует их пролиферацию. Показано также, что ацетилхолин стимулирует DNA синтез (показатель клеточной пролиферации) в неонатальных астроглиальных клетках. Этот эффект зависит от возраста и связан с активацией фосфолипазы C, ассоциированной с мускариновыми рецепторами (Balduino et al., 1991). С другой стороны, гидролиз полифосфоинозитидов возбуждающими аминокислотами в культуре астроцитов снижает их пролиферацию. Глутамат, как было показано, способствует росту нейронов и их дифференциации в культуре ткани из развивающегося мозга. Высокая концентрация глутамата, с другой стороны, вызывает снижение развития сети дендритов и роста аксонов с нейронах гиппокампа, таким образом влияя на формирование и модифицируя структуру нейрональных цепей. Отмечается также, что реакции фосфоинозитидов на глутамат, которые имеют максимальные пики до и в период синапсогенеза, могут в большей степени быть вовлечены в процесс нейрональной дифференцировки, чем ацетилхолин (Costa, 1994). Действие последнего проявляется в период завершения дифференцировки нейронов. Важно также отметить, что ацетилхолин играет первостепенную роль в пролиферации астроглии.

Изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , и, в особенности, активация протеин киназы C, как известно, оказывает значительный эффект на дифференциацию и

пролиферацию нейронов и глиальных клеток (Gonzales and Anderson 2006; Tamiya-Koizumi, 2002) и могут опосредовать эффект нейротрансмитеров.

Данные, свидетельствующие о зависящих от возраста различиях в ответе мозга на гипоксию-ишемию, не позволяют сделать определенных предположения относительно механизмов, составляющих основу различной его чувствительности к этому воздействию в различные возрастные периоды, а также не объясняют, почему вызываемые гипоксией-ишемией последствия столь долговременны.

1.2.5. Оксидативный стресс и гипоксия-ишемия в незрелом мозге

Результатом гиперактивации NMDA рецепторов является эксайтотоксическая гибель нейронов. Этот эффект опосредуется посредством оверэкспрессии нейрональной NO-синтазы (nNos) и повышением выброса NO, развитием митохондриальной дисфункции, гиперпродукции АФК, что приводит к оксидативному стрессу и гибели клетки (Dugan and Choi, 1994). Повышенная уязвимость определенных структур незрелого мозга для воздействий гипоксии-ишемии, по крайней мере отчасти, определяется плотностью NMDA рецепторов и NOS-позитивных клеток (Ferriero, 2001). Разрушение NOS-позитивных нейронов до экспозиции к гипоксии-ишемии приводит к заметному уменьшению масштаба разрушений, причиненных инсультом (Ferriero et al., 1995). Сходные результаты были получены в опытах на мышах нокаутных линий с дефицитом продукции nNOS (Ferriero et al., 1996).

Повышенная уязвимость для оксидативного стресса незрелого мозга по сравнению со зрелым объясняется двумя причинами: для незрелого мозга характерна низкая активность системы антиоксидантной защиты и высокое содержание свободных ионов железа. Антиоксидантная защита клеток обеспечивается несколькими ферментами, включая супероксиддисмутазу (SOD), которая присутствует в виде Cu,Zn-супероксиддисмутазы (Cu,Zn-SOD) в цитоплазме и Mn-супероксиддисмутазы (Mn-SOD) в митохондриях. Оба энзима элиминируют супероксид-анион ($O_2^{\cdot-}$) в H_2O_2 , которая в дальнейшем может быть элиминирована каталазой или глутатионпероксидазой. Конечный продукт этих реакций – вода. Глутатионпероксидаза одновременно катализирует превращение восстановленного глутатиона в окисленный глутатион, который затем восстанавливается глутатионредуктазой с использованием в качестве доноров электронов NADPH. Таким образом, очевидно, что регенеративная активность клетки, которая обеспечивается антиоксидантными системами, зависит от ее энергетического статуса. Очевидно, что когда активность этой системы снижена, как это происходит при гипоксии-

ишемии, мозг страдает из-за последствий оксидативного стресса, вызывающего разрушение макромолекул и гибели клеток. Показано, что гиперэкспрессия Cu,Zn-SOD, которая наблюдается у мышей нокаутных линий, способствует протекции нервной системы взрослых животных (Chan, 1996). Однако было установлено, что гиперэкспрессия Cu,Zn-SOD в мозге неонатальных мышей усиливает разрушение тканей при действии гипоксии-ишемии. Результаты этих исследований очередной раз свидетельствуют о том, что существенные различия могут быть прослежены между зрелым и незрелым мозгом (Ditelberg et al., 1996). Причиной этого, также как повышенной уязвимости незрелого мозга для оксидативного стресса, является неспособность элиминировать H_2O_2 , вследствие ограниченных возможностей антиоксидантной системы (Fullerton et al., 1998). Кроме того, аккумуляция H_2O_2 оказывает значительно больший разрушающий эффект из-за более высокого уровня свободных ионов железа в незрелом мозге, чем в зрелом, и, соответственно усилением реакция Фентона – химической реакции неферментативного образования из перекиси водорода высокореакционных гидроксильных радикалов. Снижение уровня свободных ионов железа с помощью хелатора дефероксамина обеспечивает определенный уровень нейропротекции мозга и лучшую переносимость гипоксии-ишемии неонатальными мышами дикого типа и мышами нокаутных линий с повышенным уровнем SOD (Sarco et al., 2000).

1.2.6. Апоптотические процессы в незрелом мозге

Существует два различных вида клеточной смерти – апоптоз и некроз (MacManus and Linnik, 1997). Основу такого разделения составляют биохимические и морфологические критерии активности патологического процесса в клетке. Некроз — наиболее распространенный тип гибели клетки. Он проявляется ее резким набуханием и разрывом клеточной мембраны, денатурацией и коагуляцией цитоплазматических белков, разрушением клеточных органелл, вытеканием содержимого цитоплазмы в межклеточное пространство и формированием вторичной воспалительной реакции. Некроз - генетически не контролируемая гибель клетки под влиянием патогенных факторов. Апоптоз, напротив, генетически контролируемая клеточная гибель, обусловленная действием внешних и внутренних стимулов, которые активируя генетическую программу, приводят к гибели клетки и ее эффективному удалению из ткани. Этот процесс хорошо отрегулирован и является энергетически затратным. Запуск программы апоптоза, или запрограммированной клеточной гибели, является одним из важнейших механизмов повреждающих воздействий на мозг, в то время как ингибирование этого процесса

составляет основу нейропротекции. Для клеток, находящихся в состоянии апоптоза, характерны изменения, среди которых одними из первых является сжатие клетки и конденсация хроматина по периферии ядра. На ранних стадиях апоптоза плазматическая мембрана погибающей клетки остается интактной. Завершается апоптоз образованием апоптотических телец и их фагоцитозом.

Апоптоз – это важный физиологический процесс, имеющий две стороны. С одной стороны, это естественный и необходимый процесс, который играет критическую роль в регуляции развития и естественной гибели клеток организма. Посредством запуска апоптоза элиминируются нейроны, которые не образовали контактов с клетками-мишенями или не получают достаточного количества нейротрофических факторов. Кроме того, у взрослого организма апоптоз служит для уничтожения поврежденных и трансформированных клеток, предотвращая развитие опухолей. С другой стороны, стимуляция апоптоза вследствие действия различных вредных факторов, как внешних, так и внутренних, приводит к гибели нейронов и возникновению многих неврологических заболеваний - болезней Паркинсона, Альцгеймера, депрессий, постинсультных патологий и др. (Vila and Przedborski, 2003). Базисным патогенным механизмом в последнем случае, очевидно, является нарушение баланса факторов регуляции апоптоза в пользу антиапоптотических белков-регуляторов. Это обуславливает возрастающий интерес к поиску средств, направленных на поддержание этого баланса и стимуляцию антиапоптотических регуляторов, что рассматривается в качестве одного из наиболее перспективных терапевтических способов для профилактики и лечения большого числа болезней (Gogvadze et al., 2009).

Механизмы инициации апоптоза включают широкий спектр как внешних, так и внутренних сигналов, конвергирующих на митохондриях. К ним прежде всего относятся различные повреждающие факторы (стрессы, ионизирующие излучения, тепловой шок, гипоксия/ишемия, экзитотоксичность), повреждения ДНК, недостаточность питания и онтогенетические процессы (депривация или избыток ростовых факторов, и др.) (Oberst et al., 2008).

Процессы апоптоза в развивающемся мозге (при нормальных физиологических условиях) происходят в основном во время внутриутробного развития, в начале постнатального периода наблюдается снижение уровня апоптоза, достигающего минимальных значений во взрослом мозге (Vexler and Ferriero, 2001; Marks and Berg, 1999). Ишемия и многие другие острые и хронические нейродегенеративные процессы являются триггерами апоптоза (Dirnagl et al., 1999; Vexler and Ferriero, 2001). Результаты многочисленных исследований позволяют предполагать, что апоптоз, в тканях,

перенесших гипоксию-ишемию, отличается от апоптоза, который наблюдается при дифференцировке тканей и органов. Ряд исследователей также указывают на существование некротическо-апоптотического фенотипа (Leist and Jaattela, 2001; Martin et al., 1998). В течение эмбрионального и перинатального периода развития грызунов апоптоз является основным путем клеточной смерти вследствие гипоксии-ишемии, в то время, как в более поздние сроки некроз является доминирующим процессом. (Grojean et al., 2003a; Liu et al., 2004). Хотя и у взрослого организма развитие апоптоза или некроза зависит от степени тяжести воздействия. Так при ишемических воздействиях в очаге поражения в основном преобладает некроз, а на периферии – апоптоз, при гипобарической гипоксии – в основном апоптоз (Самойлов и др., 2005). Биохимические исследования свидетельствуют, что гибель клетки, обусловленная действием гипоксии/ишемии, может протекать с вовлечением всех специфических механизмов, характерных для апоптоза. Так, данные о повышении экспрессии ключевых элементов апоптоза, таких как каспаза-3 (Blomgren et al., 2001; Hu et al., 2000), APAF-1 (Ota et al., 2002), Bcl-2 (Merry et al., 1994) и Bax (Vekrellis et al., 1997) в незрелом мозге, также как и зрелом, позволяют предполагать, что они играют важную роль в процессах адаптации развивающегося организма к неблагоприятным условиям среды.

У большинства млекопитающих клеточный апоптоз протекает с вовлечением каспаз, которые вступают в качестве проэнзимов, включенных в высоко специализированный и сложно регулируемый каскад протеолитических процессов. Каспазы играют важную роль в процессе апоптоза. Каспазы можно разделить на три группы: каспазы-инициаторы (каспазы-2, -8, -9, -10), каспазы-эффекторы (каспазы-3, -6, -7), и воспалительные каспазы (каспазы-1, -4, -5, -11, -12). В то время как каспазы-эффекторы активируются каспазами-инициаторами, каспазы-инициаторы активизируются другими более сложными механизмами (Troy et al., 2011).

Каспаза-3, вероятнее всего, является ключевым элементом апоптоза в ЦНС и ее активация ведет к расщеплению сотен различных необходимых для нормальной жизнедеятельности клетки субстратов. К такого рода субстратам относятся ядерный шаперон, ингибитор каспаза-3-активированной ДНКазы (ICAD). Каспаза-3-активированная ДНКаза (CAD), напротив, активируется, что приводит к фрагментации ДНК (Enari et al., 1998). Каспаза-3 может быть активирована посредством внеклеточных и внутриклеточных сигналов (Hengartner, 2000). Внутриклеточные механизмы включают выделение цитохрома С и формирование «апоптосом» и, вслед за этим, активацию каспазы-9. Под действием внеклеточных стимулов происходит связывание лиганда Fas с его рецептором, что приводит к активации каспазы-3. Кроме цитохрома С

высвобождаются и другие эффекторы апоптоза, содержащиеся в митохондриях, например апоптозиндуцирующий фактор (AIF), SMACs (second mitochondria-derived activator of caspases) и различные прокаспазы.

Непосредственная регуляция апоптотической программы осуществляется факторами регуляции апоптоза (apoptosis-related factors), составляющими сложную динамическую систему из белков, стимулирующих и ингибирующих апоптоз. Самую обширную группу таких белков представляют продукты семейства генов *bcl-2*, общее число которых у человека превосходит 16. Среди них проапоптотические белки - Bax, Bak, bok/mtd, Bcl-xS, bik/nbk, hrk/dp5, bim/bod, blk, Bad, bid, и антиапоптотические - Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-xS, Mcl1, Bfl1 (Fadeel and Orrenius, 2005). Они могут образовывать гомо-, гетеродимеры, при этом их активность меняется. Основной функцией семейства Bcl-2 является регуляция проницаемости наружной мембраны митохондрий и формирования митохондриальной поры (MPTP – mitochondrial permeability transition pore), имеющей ключевое значение для запуска апоптотического процесса, при котором первым звеном является цитохром С. При увеличении проницаемости мембраны и открытии митохондриальной поры цитохром С выходит в цитозоль, где вместе с апоптотическим протеаз-активированным фактором-1 (Araf-1) и прокаспазой 9 образует специфический комплекс, приводящий к дальнейшей активации каспаз, в частности каспазы 3 (рис.11) (Hengartner, 2000).

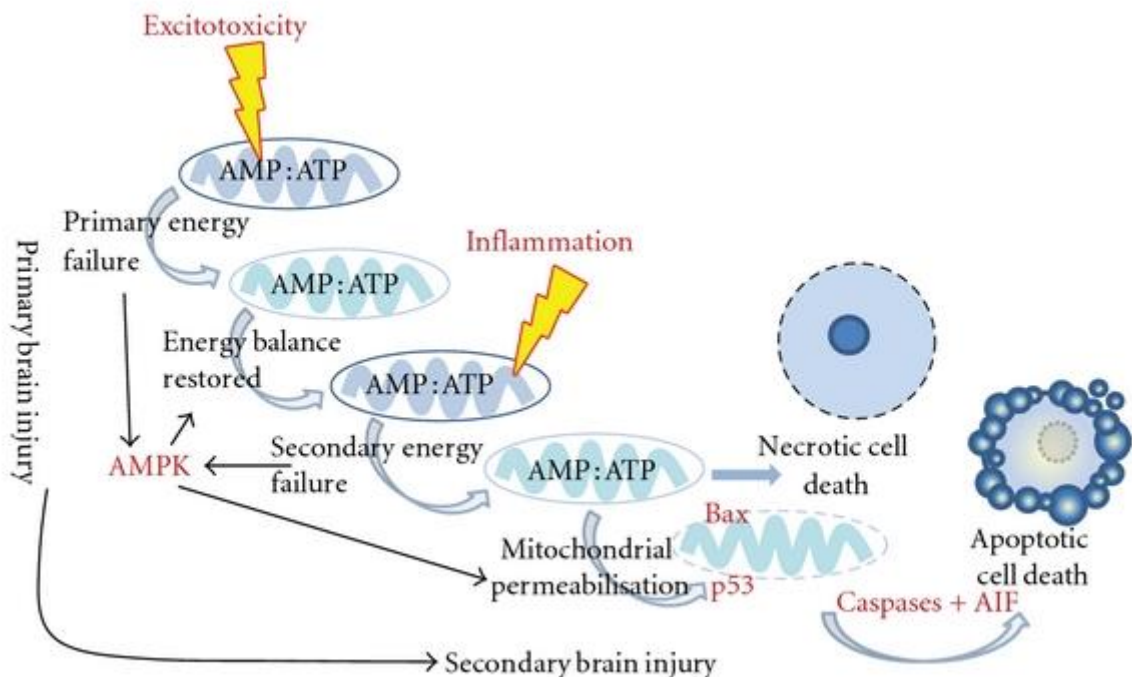


Рис. 11. Развитие отсроченных повреждений мозга. Истощение энергетических запасов приводит к Bax-зависимым проницаемости митохондриальной мембраны –

образованию митохондриальной поры, что приводит к необратимой клеточной смерти после патологических воздействий на мозг (гипоксии-ишемии) в неонатальный период. (по Thornton et al., 2012)

В процессе развития мозга, большое количество нейронов устраняются путем апоптоза, что необходимо для оптимизации нейронных сетей. Существуют различные доказательства того, что система каспаз может быть активирована в незрелом мозге при действии гипоксии-ишемии. Пренатальные гипоксические/ишемические воздействия приводят к активации апоптотических механизмов путем активации каспазы-3 в нейронах развивающегося мозга (Ozyürek et al., 2014). Степень активации каспазы-3 после гипоксии/ишемии в недоразвитом головном мозге больше, чем у взрослых (Northington et al., 2011).

Показано, что в незрелом мозге, также как в зрелом, при гипоксии-ишемии увеличивается активность не только каспазы-3, но и каспаз-8 и -9 (Blomgren et al., 2001; Cheng et al., 1998; Northington et al., 2001; Zhu et al., 2003) с последующим расщеплением их субстратов - ICAD и poly(ADP-ribose) (Wang et al., 2001). Более того, показано, что при введении ингибиторов «широкого спектра» активность каспазы-3 может быть снижена, а вызываемые гипоксией-ишемией поражения мозга ювенильных животных нивелированы (Cheng et al., 1998). Сходные результаты были получены в опытах на культурах тканей незрелого организма с введением эндогенного ингибитора каспаз (Wang et al., 2003, 2004).

Каспазы важны для апоптоза в период развития мозга. Тем не менее, существует предположение, что каспазы-независимые пути гибели нейронов также играют значительную роль в альтернативных механизмах регулирования гибели/выживания нейронов. Данные, полученные в течение последних лет, свидетельствуют о том, что при определенных условиях митохондрии являются поставщиком белков, являющихся апоптотическими факторами. Среди этих белков, кроме цитохрома C и прокаспаз 2, 3 и 9, выделяют AIF (apoptosis inducing factor), представляющий собой флавопротеин с молекулярной массой 57 кДа. AIF является оксидоредуктазой, которая обладает свойством вызывать конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК. Этот путь апоптоза не зависит от каспаз (Susin et al., 1999). AIF включен в регуляцию PARP (poly(ADPribose) polymerase). Этот белок является одним из субстратов каспаз. Показано, что на ранних стадиях экспозиции незрелого мозга к гипоксии-ишемии PARP высвобождается из митохондрий и проявляется в ядре нейронов (Zhu et al., 2003). Возможны также альтернативные пути реализации апоптоза. Один из них, эволюционно более молодой путь, связан с активацией «рецепторов смерти» (CD95/Fas, рецепторы TNF- α и др.),

расположенных на плазматической мембране. Связывание таких рецепторов с лигандом приводит к образованию комплекса, посылающего клетке сигнал о ее гибели (Wajant, 2002). Затем с помощью Fas-ассоциированного белка, подающего сигнал о гибели клетки, активируется каспаза 8.

Во время перинатальных повреждений головного мозга, таких как воспаление, гипоксия/ишемия, активация большого количества нейронов (Jin et al., 2009) и микроглии приводит к образованию активных форм кислорода, высвобождению возбуждающих аминокислот агонистов, провоспалительных цитокинов (напр., IL-1 γ , IL-18, TNF- α), хемокинов и фактора некроза опухоли (напр., TNF- α , TNF- β , FasL, RAIL, TWEAK) (Hagberg and Mallard, 2005), что способствует гибели клеток по так называемому смешанному апоптозо-некротическому фенотипу (Northington et al. 2011).

1.2.7. Кортикостероидные рецепторы в развивающемся мозге.

Глюкокортикоидные гормоны играют одну из ключевых ролей в реализации ответа организма на стрессорное воздействие (Sapolsky, 2000). До сих пор мало изучены механизмы действия глюкокортикоидов на развивающийся мозг. Известно, что большинство глюкокортикоидных эффектов обусловлены влиянием гормонов на экспрессию определенных генов-мишеней. Как было сказано выше, глюкокортикоиды связываются с двумя филогенетически родственными ядерными глюко- и минералокортикоидными рецепторами (Woolley et al., 1991). ГР и МР зачастую по-разному влияют на различные процессы в ЦНС. Эффекты глюкокортикоидов, осуществляемые через МР, как правило, увеличивают возбудимость и стабильность функционирования нейронных сетей, активируя синтез проапоптотических белков, а активация ГР приводит к отложенной супрессии некоторых процессов, запущенных через МР (de Kloet et al., 2009). Обнаружены различия эффектов глюкокортикоидов на функционирование нервных клеток в различных регионах мозга, связанные с различиями в уровнях экспрессии двух типов рецепторов в разных отделах мозга, и различной величиной отношения экспрессии ГР/МР в них. В целом, ГР экспрессируются в большинстве тканей плода (Speirs et al., 2004), их экспрессия высока в плаценте (Meaney, Szyf et al. 2007). В мозге ГР экспрессируются повсеместно как в нейронах, так и в глиальных клетках (de Kloet et al., 2005).

1.2.8. Влияние гипоксии на ранних стадиях онтогенеза на поведение животных и способность к обучению.

Нарушения молекулярно-клеточных и биохимических процессов нормального функционирования мозга отражаются на поведенческом уровне и способности к обучению. Гипоксия/ишемия в пренатальном и раннем постнатальном онтогенезе

приводит к задержке физического и физиологического развития, нарушениям когнитивных функций, долговременной и кратковременной памяти (Батаева и др. 2001; Дубровская и Журавин 2008; Журавин и др. 2009; Delcour et al., 2012a, b). Кроме того эти нарушения могут приводить к психопатологии, например шизофрении (Zornberg et al., 2000; Boksa, 2004).

В течение периода раннего постнатального онтогенеза наблюдается задержка развития различных сенсомоторных рефлексов в ответ на пре- и перинатальные воздействия гипоксии/ишемии, в результате чего наблюдаются длительные ухудшения выработки навыков поведения и моторных реакций. (Журавин и др. 2003; Grojean et al., 2003; Lubics et al., 2005; Perez et al., 2013; Ten et al., 2003).

Двигательные навыки и координация развиваются в течении первого месяца постнатального онтогенеза. Например, способность новорожденных удерживаться на вращающемся бруске или поверхности улучшается со временем. Крысята, пережившие пре- или перинатальную гипоксию/ишемию способны удерживаться в подобных условиях гораздо меньшее время по сравнению с контрольными (Журавин и др. 2003; Grojean et al., 2003; Lubics et al., 2005). В течение 5 недель постнатального развития некоторые, но не все эти различия нивелируются. Ухудшения моторных функций и координации в ранний период постнатального онтогенеза можно рассматривать как индикатор перенесенной пренатальной гипоксии.

Моторные функции.

Одним из тестов – показателей двигательной активности является тест «Открытого поля». Регистрируемыми величинами в этом тесте являются: время нахождения в центре поля по сравнению с периферией, траектория и скорость (кол-во пересеченных квадратов за единицу времени) движения. Путь, который проходят животные, и скорость передвижения являются показателями двигательной активности, в то время как нахождение в центре, количество стоек, груминг – показатели тревожности. Гиперактивность в открытом поле наблюдается у 2-х недельных крыс, перенесших пренатальную гипоксию (Cai et al., 1999). Однако, в большинстве исследований, включая работы на взрослых животных, нет достоверных различий по двигательной активности в открытом поле у крыс, перенесших пренатальную гипоксию, и контрольных животных (McQuillen et al., 2003; Lubics et al., 2005; Ådén et al., 2002;). Отмечены различные нарушения более сложных форм поведения при определении двигательной активности после пре- или перинатальной гипоксии (Дубровская и журавин, 2008; Golan et al. 2004; Robinson et al., 2005; Delcour et al., 2012) . Трудности моторного поведения проявляются, в частности, в увеличении спотыканий (заминок) при подъеме по ступенькам (McQuillen et

al., 2003). Кроме того пренатальная гипоксия уменьшает время, которое мышь может удерживаться (цепляться) за провод, по сравнению с контролем (Golan et al., 2004). Все эти результаты показывают, что пре- и перинатальная гипоксия оказывают длительный эффект на двигательную активность (моторное поведение). Эффект гипоксии-ишемии не определяется когда крысы свободно ориентируются в открытом поле, но неоднократно проявляется в более сложных тестах. Интересны исследования (Ådén et al., 2002), показавшие положительную корреляцию между повреждением мозгового вещества и снижением двигательной активности. Это исследование показывает, что хотя все животные подвергались одинаковым воздействиям, значительные повреждения мозга проявлялись не у всех животных (75%). Животные, пережившие гипоксию-ишемию, у которых не обнаружено повреждений мозга, не показывали нарушений моторного поведения. Это предполагает, что нарушения двигательной активности проявляются только в случае структурных повреждений мозга.

Обучение и память.

Высшие функции мозга – способность к обучению и память, были протестированы в моделях на животных различными группами исследователей. В последние годы различные исследователи пытаются разработать профилактические воздействия для предотвращения развития постгипоксических дисфункций.

Гипоксия в поздний эмбриональный период ухудшает долговременную память на авersive стимулы у цыплят, при этом нарушения краткосрочной памяти зависят от возраста животного (Rodricks et al., 2004). При определении неврологических и когнитивных фенотипов важными параметрами являются срок пренатального периода, а также кратность, длительность и степень гипоксического воздействия. Показано, что гипоксия на 10-14 сутки гестации, но не на 14-18, может влиять на краткосрочную память. Особенно перенатальная гипоксия на 13-е сут (3-х часовая) уменьшает число крыс, способных к обучению достижения цели (Rodricks et al., 2004). Гипоксия на 17-сут эмбрионального развития приводит к увеличению числа стимулов, необходимых для выработки рефлексного пассивного избегания (Cai et al., 1999). У некоторых животных пространственное обучение в водном лабиринте Морриса в группе, подвергавшейся гипоксии, увеличивается время нахождения платформы по сравнению с контрольной группой. Мыши, пережившие пренатальную гипоксию на 17-е сутки гестации, не показывают значительной задержки при нахождении платформы в водном лабиринте Морриса; но они не запоминают расположение платформы спустя 30 мин или 7 суток после обучения (Golan et al., 2004). Крысята, пережившие гипоксию на 7-е сутки

постнатального онтогенеза, значительно медленнее овладевают пространственными навыками в водном лабиринте Морриса, что выражается в увеличении времени нахождения платформы (Chou et al., 2001). Пространственное ориентирование в других тестах (радиальный лабиринт) показывает, что гипоксия у новорожденных приводит к минимальным нарушениям у взрослых животных (Grojean et al., 2003) по сравнению с контролем. Однако гипоксия-ишемия на 7-9-е сутки после рождения приводит к более длительным нарушениям, увеличивая количество ошибок в радиальном лабиринте в течение обучающей сессии и время обучения по сравнению с контролем (Decker et al., 2003). Примечательно, что все исследователи описывают вышеуказанные нарушения в тех регионах мозга, которые отвечают за обучение и память у человека, а именно гиппокамп, неокортекс и таламус.

Различные паттерны нарушения поведения могут быть связаны с возрастом предъявления гипоксии и моделью гипоксического воздействия, в том числе локализацией повреждения при ишемической форме гипоксии. Это может быть также связано с многообразием протоколов используемых гипоксии/ишемии. Несмотря на недостаточность взаимосвязи между возрастом воздействия и функциональными расстройствами, поиск профилактических воздействий, которые могли бы компенсировать поведенческие дисфункции, очень важен. Диагностика и лечение последствий пренатальной гипоксии сопряжены с определенными сложностями, что обусловлено рядом факторов. Прежде всего, можно отметить недостаточное понимание механизмов влияния гипоксии на развивающийся организм. Эта и многие другие проблемы, связанные с действием гипоксии в раннем онтогенезе, требуют особого внимания и являются предметом изучения в специально проводимых экспериментах на животных. Модели пре- и перинатальной гипоксии/ишемии на животных позволяют в деталях изучить молекулярные пути, приводящие к гибели клеток и для определения возрастной восприимчивости нейронов и глии к гипоксии/ишемии.

Учитывая вышеуказанное в ходе выполнения настоящего исследования необходимо было провести комплексную оценку влияния гипобарической формы гипоксии в различные сроки пренатального онтогенеза на соматическое и сенсомоторное развитие, поведение и способность к обучению крыс. Очень важно было определить временные окна наиболее уязвимые для повреждающего действия гипоксии. Наряду с этим, в задачи данной работы входило также выявление молекулярно-клеточных и гормональных механизмов нарушений в уязвимых к гипоксии образованиях мозга (гиппокампе и неокортексе) крыс после перенесенной гипоксии в различные периоды

пренатального онтогенеза. Большой интерес представляло сопоставление повреждающего действия тяжелой гипобарической гипоксии и введения синтетического глюкокортикоидного гормона – дексаметазона в те же сроки пренатального периода развития. Понимание механизмов, лежащих в основе повреждений, вызываемых неблагоприятными факторами среды в пренатальном онтогенезе, должно способствовать разработке инновационных способов коррекции неврологических нарушений.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Экспериментальные животные.

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 в дозе 0,8 мг/кг на 11-13-е, 14-16-е или 17-19-е сутки беременности. Крысят отлучали от кормившей их самки в возрасте 30 дней. После отлучения самцы и самки находились в клетках отдельно по 6 животных в каждой. В течение всего периода проведения экспериментов крысы содержались в клетках размером 60× 30× 20 по 6 животных в каждой при режиме свет/темнота 12:12ч, температуре 20-23°С и при постоянном доступе к воде и пище.

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

Поведенческие эксперименты проводились в первой половине дня (10-12 час), количество животных в каждой протестированной группе составляло от 6 до 10.

Для биохимических и иммуногистохимических исследований животных из контрольной группы ($n = 6-8$) и животных из каждой опытной группы ($n=6-10$) декапитировали, быстро извлекали мозг и фиксировали его согласно соответствующей методике. Вся процедура занимала не более 2-х минут, что исключало возможность её влияния на результаты биохимии и иммуноцитохимии.

Для определения уровня кортизола в плазме заборы крови производились в одно и то же время дня в различных экспериментах (10-11 часов утра) при декапитации или из хвостовой вены. Количество животных в контрольной и опытной группах по $n=6-8$.

2.2.1. Гипобарическая гипоксия.

Гипобарическая гипоксия – гипоксическое воздействие, вызываемое общим падением давления в окружающей атмосфере. Встречается в естественных условиях при подъеме в горы. Создаваемая в барокамере гипобарическая гипоксия может рассматриваться как имитация подъема на соответствующую высоту.

Гипобарическая гипоксия осуществлялась в барокамере проточного типа (рис. 12), при температуре от 20° до 25°С (Четвериков, 1974). Для создания условий тяжелой гипоксии животных помещали в барокамеру при давлении 160-180 мм.рт.ст, что соответствует подъему на высоту 11 000 м, на 3 часа. В данной работе изучали влияние тяжелой гипобарической гипоксии, которая предъявлялась трижды с 24-х часовым

интервалам беременным крысам на 11-13-е, 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального онтогенеза. Подъем на соответствующую высоту производили, начиная с 760 мм.рт.ст и далее ступенчато понижая давление на 100 мм.рт.ст. каждую 1 мин до достижения отметки в 180 мм.рт.ст. В таблице 3, 4 представлены стандартный режим подъема экспериментальных животных и международная стандартная атмосфера соответственно. Данный способ подъема помогал избежать резкого перепада давления и давал возможность крысам адаптироваться. Каждые 20 мин осуществляли продув камеры

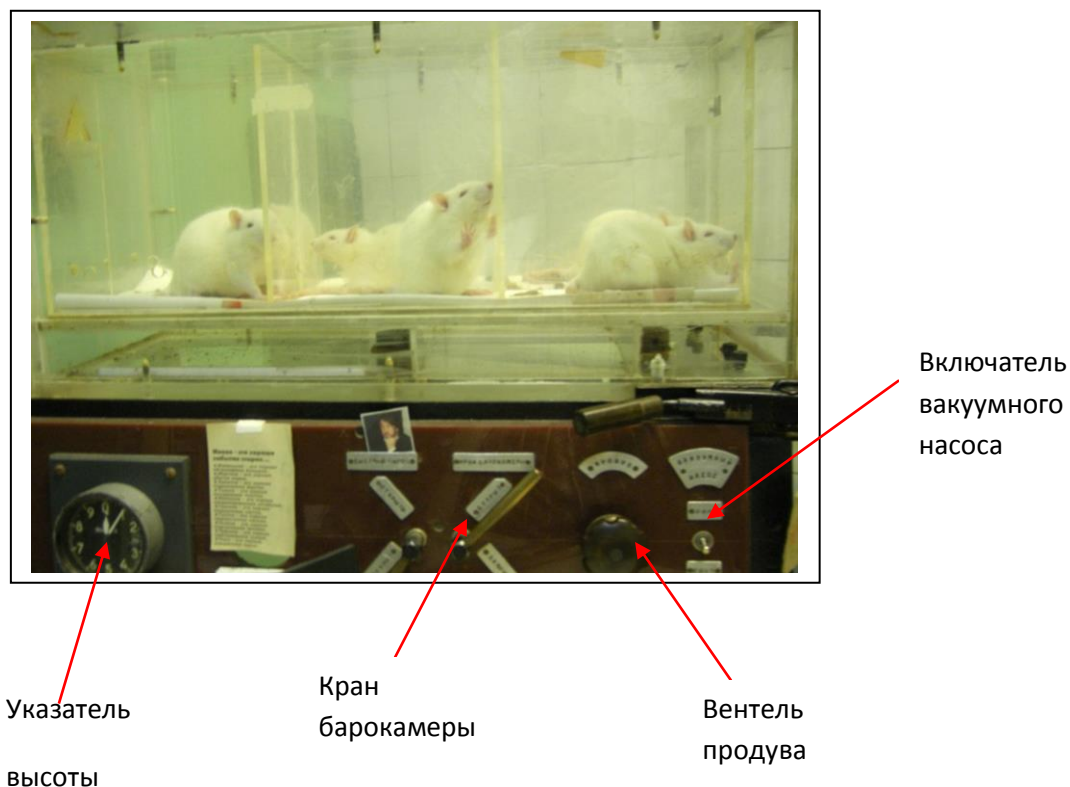


Рис. 12. Барокамера проточного типа.

Давление (мм Hg)	Величина “ступеньки”	Время достижения давления от начала подъёма.
660	1’	-
560	2’	1’
460	3’	3’
360	5’	6’
260	5’	11’
240	2’	16’
220	2’	18’
200	5’	20’
180	-	25’

Таблица 3. Схема подъема в барокамере.

Высота (м)	Давление (мм Hg)	Парциальное давление O ₂ (мм рт. ст.)	Содержание O ₂ (%)
0	760.00	159	20.9
1000	674.10	141	18.5
2000	596.10	125	16.4
3000	525.79	110	14.5
4000	462.26	98	12.9
5000	405.00	85	11.2
6000	353.77	75	9.8
7000	307.87	66	8.4
8000	266.80	56	7.3
9000	230.40	48	6.3
10000	198.10	42	5.4
11000	169.69	36	4.7
12000	144.80	32	3.9

Таблица 4. Международная стандартная атмосфера.

2.2.2. Введение дексаметазона

Синтетический гормон дексаметазон вводили внутривбрюшинно в дозе 0,8 мг/кг беременным самкам однократно на 11-13-е, 14-16-е или 17-19-е сутки. 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. Все инъекции проводили между 9 и 11 часами.

2.3. Методы изучения поведения

2.3.1. Выработка условных рефлексов на запаховые раздражители

Были проведены опыты, в которых крысятам (интактным и подвергавшимся воздействию пренатальной гипоксии) в возрасте 7-12 суток предъявлялся обонятельный раздражитель (запах мяты). Для этого в жилую клетку, в которой находилась самка с крысятами, помещали контейнер, содержащий вату, смоченную мятным экстрактом. Известно, что у крысят в течение второй недели жизни формируется условная реакция на присутствующие в гнезде запахи в результате положительного подкрепления, связанного, например, с воздействием таких факторов, как тепло, груминг и кормление крысят самкой, а также контакт с сибсами (Leon, Holtz, 1971; Александрова, Зарайская, Швыркова, 1997). В качестве контроля служили крысята, постоянно находившиеся с самкой в клетках с чистыми опилками. В возрасте 13 суток тестировали реакцию крысят на предпочтение запаха мяты. Крысят помещали в обычно используемую для этих целей стандартную плексигласовую камеру с перфорированным полом, разделенным нейтральной полосой

шириной 2 см на два отсека. Один - с обычными чистыми опилками под полом, другой – с опилками, смоченными мятным экстрактом. Тестировалось время нахождения в отсеке с запахом мяты.

2.3.2. Характеристика ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «открытое поле»

Одной из задач исследования было изучение изменений поведения взрослых животных, перенесших воздействие гипоксии в различные сроки пренатального онтогенеза. Для анализа поведения экспериментальных животных использовался простой, но вместе с тем показательный тест «открытое поле», признанный одним из наиболее адекватных методов оценки локомоторной активности и стрессорного поведения в целом (Holl, 1936; Маркель и др., 1988; Belzung, 1999). Открытое поле представляло собой четырёхугольную камеру размером 120×120 см со стенками высотой 40 см. Арена при тестировании освещалась 500 Вт люминесцентной лампой с высоты 2,5 м. За 10 мин до тестирования животных помещали в отдельную темную камеру, а затем плавно переносили в центр открытого поля. Дополнительным стимулом в «открытое поле» является его освещенность, которая усиливает авersive контекст стресса новизны обстановки, поскольку грызуны инстинктивно боятся открытых освещённых пространств. Пол камеры был расчерчен на квадраты 20×20 см. Крысу помещали в центр арены и в течение 5 минут регистрировали количество пересечённых квадратов (горизонтальная двигательная активность, локомоторная активность), число вставаний на задние лапы (вертикальная двигательная активность, исследовательская активность), длительность реакции груминга и время неподвижности (замирание). После каждого тестирования пол лабиринта протирали слабым раствором перекиси водорода. Количество животных в контрольных группах по n=12, в каждой опытной группе n=6-8.

2.3.3. Характеристика уровня тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»

Важным методом изучения стрессорного поведения животных является приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). В дополнение к характеристике общей двигательной и исследовательской активности он даёт возможность исследовать тревожность животных, как одну из важных характеристик приспособительного поведения (Pellow et al., 1985). Анксиогенным стимулом в ПКЛ является боязнь открытого пространства и высоты. ПКЛ состоял из 2 открытых (10х50 см) и 2 закрытых рукавов без крыши (10х50х40см), имеющих входы в открытые рукава (10х20 см). Каждый рукав

лабиринта был разделён на 5 равных квадратов (10x10см). Лабиринт располагался на высоте 75 см над уровнем пола. Основным показателем тревожности в этом тесте служило время, проведённое крысой в открытых рукавах лабиринта. Регистрировали время пребывания в открытых и закрытых рукавах лабиринта в течение 5 минут, число переходов, число свешиваний. Чем меньше промежуток времени, проведённый животным в открытых рукавах ПКЛ, тем больше у него уровень тревожности. После каждого тестирования пол лабиринта протирали слабым раствором перекиси водорода. Количество животных в контрольных группах по n=12, в каждой опытной группе n=6-8.

2.3.4. Выработка условного рефлекса пассивного избегания

Обучение крыс контрольной группы и преренсших гипоксию на 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального онтогенеза проводилось в аппарате, состоящем из двух отсеков: большого (50x50 см) освещенного (безопасного) и маленького (15x15 см) темного, с электрофицированным решетчатым полом. Отсеки отделялись друг от друга гильотинной дверцей. Перед началом экспериментов животные привыкали к экспериментальной установке в течение 3 дней. При обучении крыс помещали в светлое отделение. Как только животное входило в темный отсек, дверца между отсеками закрывалась и в течение 60 сек. подавался электрический ток (12 ударов, 50 Гц, 1.5 мА). Через 24 часа крыс подвергали тестированию, вновь помещая их в освещенную камеру, свободно общающуюся с темной. Продолжительность ежедневного тестирования составляла 3 мин. Тестирование осуществлялось без перерывов в течение 12-15 суток. Регистрировали латентный период перехода из освещенной камеры в темную, время пребывания в темной камере и число переходов из одной камеры в другую. Основным показателем служило время пребывания животных в темной камере. Количество животных в контрольных группах по n=12, в каждой опытной группе n=6-8.

2.3.5. Исследование процессов формирования и динамику угашения обстановочного оборонительного рефлекса и оборонительного условного рефлекса на звук

Исследовали последствия воздействия гипоксии (или введения дексаметазона) в пренатальном периоде развития на процесс обучения условно рефлекторной реакции пассивного избегания. 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. Испытуемых для каждого исследования разделили на пять групп. Первую экспериментальную группу составили контрольные животные. Во вторую и третью группу вошло потомство самок,

подвергшихся воздействию гипоксии на 14-16-е или 17-19-е сутки гестации, в четвертую и пятую – потомство самок, получавших инъекции дексаметазона (0.8 мг/кг) на 14-16-е или 17-19-е сутки гестации.

Для выработки условно рефлекторной реакции пассивного избегания крыс подвергали воздействию электрического тока (1 мА, 50 Гц) в клетках размером 50х50 см с проволочным токопроводящим полом. В качестве источника звукового сигнала использовали динамик («белый шум», громкость 90 дБ). Во время опыта животных помещали в экспериментальную камеру, и наблюдали за их поведением в течение 60 сек. Затем животных подвергали воздействию электрокожного раздражения или электро кожного раздражения в сочетании со звуком. Пять ударов током, сочетавшихся или не сочетавшихся со звуком, подавались с интервалом в 60 сек. Затем крыс пересаживали в домашние клетки и, спустя 1, 2 и 4 дня тестировали в экспериментальных клетках. В течение 5- минутного периода фиксировали продолжительность реакции замирания. Количество животных в контрольных группах по n=12, в каждой опытной группе n=6-8.

2.3.6. Исследование процессов выработки навыков пространственного распознавания в водном лабиринте Морриса

Одна из задач проводимых нами исследований состояла в изучении влияния гипоксии (или дексаметазона), перенесенной самками в различные сроки беременности, на способность их 3-месячного потомства к формированию навыка пространственного распознавания в водном лабиринте Морриса. Для выяснения роли гипотермии, как фактора влияющего на способность к обучению данного навыка животными контрольных и экспериментальных групп, их тестирование осуществлялось в условиях двух температурных режимов – при низкой и относительно высокой, «комфортной» температуре воды. Лабиринт представлял собой бассейн диаметром 2 м и глубиной 0.7 м. В воде, заполнявшей бассейн, разводили мел, в результате чего она теряла прозрачность. Ежедневно в течение 4 дней проводилось четырехкратное (с интервалом в 60 сек) тестирование крыс. При тестировании животные последовательно в определенном порядке помещались в один из четырех секторов лабиринта. При этом местоположение скрытой под водой платформы (диаметр 15 см) оставалось постоянным. Оно менялось лишь при переходе от тестирования одного животного к другому. Если крыса, помещенная в лабиринт, в течение 60 сек не находила платформу, ее принудительно помещали на нее. Время пребывания на платформе составляло 20 сек. В первой серии экспериментов (эксперимент 1) лабиринт заполнялся водой, температура которой составляла 23-24°C, во второй (эксперимент 2) - 16-17°C. Опыты поставлены на самцах и самках белых крыс

линии Вистар в возрасте от 90 до 95 суток. Количество животных в контрольных группах по $n=12$, в каждой опытной группе $n=6-8$.

2.3.7. Тестирование рабочей памяти в водном лабиринте Морриса.

В водном лабиринте Морриса тестировали пространственную рабочую память. Бассейн диаметром 2.0 м и глубиной 0.7 м заполняли водой, в которой растворяли мел, в результате чего она теряла прозрачность. Температура воды на протяжении тестирования поддерживалась на уровне 22-24°C. Ежедневно, в течение 4 дней проводили пятикратное тестирование крыс (Hamm et al. 1996; Steele and Morris 1999; Kline et al. 2002). Каждое тестирование состояло из двух предъявлений с пятисекундным перерывом. Старт каждого первого предъявления начинался в одном из четырех секторов лабиринта выбранного случайным образом, при этом местонахождение скрытой платформы (диаметр 15 см, погружена под воду на глубину 2-х см) каждый раз было новым (Рис. 13). После того как животное находило платформу оно должно было находиться на ней в течение 15с, затем его переносили на 5с в индивидуальную клетку, после чего снова помещали в воду и позволяли искать платформу (второе предъявление), при этом положение платформы и место старта оставалось как и при первом предъявлении. Если крыса в течение 60с не находила платформу в любом из предъявлений, её принудительно помещали на неё. После каждого тестирования животных помещали на 5 мин в индивидуальную клетку. Весь эксперимент фиксировался на видеокамеру. Полученное экспериментальное видео анализировали при помощи программы Ethnostudio (KulikovVictor Cort.), регистрируя латентный период избегания - время за которое животные обнаруживали платформу. По полученным трекам вычисляли дистанцию, среднюю скорость и процент нахождения в секторе ($\frac{1}{4}$ площади бассейна) с платформой. Количество животных в контрольных группах по $n=20$, в каждой опытной группе $n=12-14$.

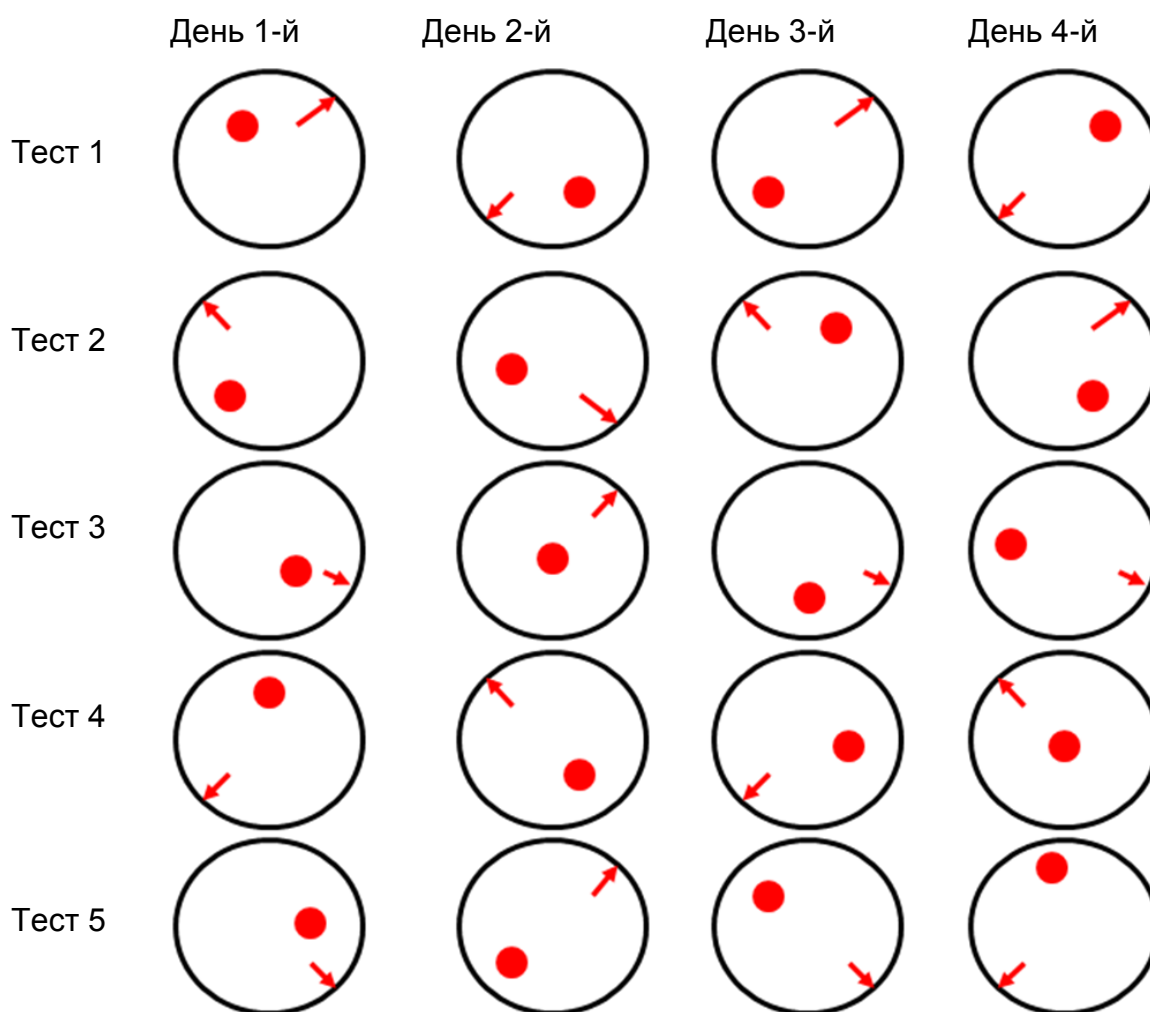


Рис. 13. Расположение платформы и места старта

2.4. Методы исследования гормональных функций

Важным показателем адаптивных возможностей организма является состояние его основной гормональной оси – гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС). Поэтому в настоящей работе необходимо было оценить функцию ГГАС. Изучали как базальную активность ГГАС, так и ее реактивность у самцов и самок взрослых крыс, подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии на 14-16-е и 17-19-е сутки гестации. Учитывая циркадную ритмическую активность ГГАС, забор крови производился при декапитации или из хвостовой вены в одно и то же время суток (10-11 часов утра).

2.4.1. Радиоиммунологический анализ кортикостероидных гормонов

С помощью радиоиммунологического метода определяли содержание в крови основного глюкокортикоидного гормона крыс – кортикостерона. Этот метод отличается большой чувствительностью и позволяет определять малые количества гормона (10^{-9} – 10^{-12} г/мл) за счёт использования радиометрического метода регистрации, а также высокой

специфичности, обусловленной принципом иммунологических реакций (Морозов и др., 1988, Ордян и др., 1996).

Сущность метода заключается в конкурентном связывании меченого и немеченого гормона (антиген) со специфическим белком (антитело) и конкурентном вытеснении меченого лиганда возрастающим количеством немеченого гормона. Антисыворотка к данному гормону (антитело) может в равной мере связывать как определяемый гормон, так и его меченый аналог. При постоянном количестве меченого гормона в пробе соотношение свободной и связанной с антителом фракций определяемого гормона будет зависеть от содержания немеченого лиганда (определяемого гормона). Поскольку реакция антиген-антитело подчиняется закону действующих масс, при достижении равновесия комплекса меченый гормон-антитело его концентрация прямо пропорциональна концентрации определяемого антигена (гормона). Поэтому, измеряя радиоактивность связанного с антисывороткой меченого лиганда, можно судить о количестве определяемого немеченого гормона. Значение радиоактивности в связанной фракции в зависимости от концентрации нерадиоактивного гормона используется для построения калибровочной кривой.

Весь ход определения можно разделить на несколько этапов:

1. Экстракция гормона из биологической среды.
2. Инкубация пробы с антисывороткой и добавленным меченым гормоном.
3. Разделение свободной и связанной с антисывороткой фракции гормона.
4. Измерение радиоактивности выделенного комплекса.

В работе использовали следующие реактивы: Натрий-фосфатный буфер (pH=7,4), содержащий 3,05 г NaH_2PO_4 и 29,2 г Na_2HPO_4 , доведённые дистиллированной водой до 1 л, куда добавляли 8,8 г NaCl , 0,1 г мертиолата и 1 г желатины. Стандарт кортикостерона. Сначала готовили исходный раствор кортикостерона ("Sigma" USA) на спирту 1 мг/мл. Этот раствор использовали для приготовления «маточного» раствора с концентрацией 10 мкг/мл. Использовали специфическую антисыворотку «Sigma» USA. Раствор меченого по тритию кортикостерона. [1,2,6,7- ^3H]-кортикостерона с удельной активностью 76.5 Кю/ммоль ("NEM TM Life Science Products", Boston, USA). разбавляли 1:100 раствором бензол : этанол или толуол : этанол (9:1). Из этого раствора отбирали нужный объём из расчёта 10 мкл кортикостерона на 1 мл буфера, выпаривали растворитель, затем добавляли буфер. Декстран-угольная смесь: 1% - активированный уголь, 0,1% - декстран (М.в. 80000, Германия). Сцинтилляционная жидкость, содержащая 4 г ППО (2,5-дифенилоксазол сцинтилляционный), 0,2 г ПОПОП (1,4-Ди-5-фенил-2-оксазолил сцинтилляционный) в 1 л толуола.

Собранную при декапитации или из хвостовой вены кровь центрифугировали в течение 10 минут при 2000 об/мин и отобранную плазму хранили при температуре -20°C до момента анализа. Сначала проводили экстракцию кортикостерона из образцов плазмы крови. Для этого отбирали в пробирки с притёртыми пробками по 20 мкл плазмы, куда добавляли 500 мкл дистиллированной воды и 2 мл очищенного метиленхлорида. Пробы энергично встряхивали в течение 1 минуты. После центрифугирования удаляли водную фазу путём отсасывания, метиленхлоридную фазу сливали в мерную пробирку и с помощью отсоса доводили объём жидкости до 1 мл. Экстракт переливали в пробирки для радиоиммунологического анализа и оставляли на ночь на воздухе для выпаривания метиленхлорида. На следующий день в пробы с сухим остатком добавляли по 100 мкл буфера и растворяли сухой остаток прогреванием на водяной бане при 60°C в течение 5 минут. После этого в пробы разливали реактивы по схеме в таблице 5:

Условные обозначения	Буфер, мл	Меченый гормон, мл	Антисыворотка, мл
Т (общая радиоактивность)	0,7	0,1	---
Во (нулевой стандарт)	0,1	0,1	0,1
О (неспецифическое связывание)	0,2	0,1	---
А ₁ -А ₇ (калибровочная кривая)	0,1	0,1	0,1
Определяемые пробы	0,1	0,1	0,1

Табл. 5. Схема проведения биохимической процедуры определения кортикостерона.

Для построения калибровочной кривой в пробирки А₁-А₇ вносили стандарт кортикостерона в диапазоне 0,125-10,0 нг.

После добавления реактивов пробы переносили на водяную баню для инкубации при 37°C в течение 40 минут. По окончании срока инкубации пробы сразу помещали в ледяную баню и в каждую, за исключением пробы Т, быстро добавляли по 500 мкл декстран-угольной смеси. Пробы энергично встряхивали и через 10 минут добавления угля центрифугировали 10 минут при 2500 об/мин. Супернатант переливали в счётные вials, содержащие 5 мл сцинтилляционной жидкости. Счёт осуществляли на жидкостном сцинтилляционном счётчике “LK Betta” (Швеция), с эффективностью счёта 50%.

Расчёт содержания кортикостерона в пробах проводили следующим образом:

вначале рассчитывали процент связывания антисыворотки по формуле:

$$\% \text{ AC} = (B_0 - O) / T \times 100\%.$$

Связывающая система считается активной, если процент связывания антисыворотки составляет 30-70 %.

Затем рассчитывали процент связывания каждой пробы стандарта по формуле:

$$\% \text{ Ст} = (A - O) / (B_0 - O) \times 100\%$$

$$\% \text{ Пробы} = (\text{Счёт пробы} - O) / (B_0 - O) \times 100\%$$

После этого вычерчивали калибровочную кривую в координатах logit-log, которая выражает зависимость процента связывания от добавки кортикостерона (по оси абсцисс откладывали $\ln \% \text{Ст}$, а по оси ординат – десятичный логарифм \log концентрации стандартов). При этом за 100% принимали количество импульсов в нулевой пробе B_0 за вычетом неспецифического связывания O . Содержание кортикостерона в пробе определяли с помощью калибровочной кривой (нг/пробе), затем значения переводили в нмоль/л.

2.4.2. Кривая стрессореактивности гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС)

При различных стрессорных воздействиях происходит активация ГГАС, результатом которой является выраженное повышение глюкокортикоидных гормонов в крови, необходимое для мобилизации адаптивных сил организма в изменяющихся условиях окружающей среды или при действии повреждающих факторов. Динамика уровня глюкокортикоидов в крови в ответ на стресс является важной характеристикой ГГАС и называется *кривой стрессореактивности*. Кривую стрессореактивности характеризуют тремя основными показателями: амплитудой (максимальной величиной гормонального ответа), динамикой (быстротой, с которой уровень глюкокортикоидов достигает своего максимума), и скоростью торможения стрессорного ответа (время, к которому постстрессорный уровень кортикостероидов снижается до базальных значений). Первые два показателя характеризуют восходящую часть кривой, отражающую активационную фазу реакции, а последний – нисходящую часть, относящуюся к инактивационной фазе гормонального стрессорного ответа. Исходя из этого, мы исследовали временную динамику изменения гормонального уровня в ответ на стрессорное воздействие – иммобилизационный стресс (ограничение подвижности животного). С этой целью крыс помещали в индивидуальные узкие пластиковые пеналы (20х7х6 см) на 20 мин. Учитывая присущую ГГАС циркадную ритмику, стрессирование

проводили между 10.00 и 12.00. Пробы крови для определения базальной концентрации кортикостероидов отбирали перед началом стрессорной процедуры из хвостовой вены у животных, предварительно (за сутки) рассаженных по 2 особи в клетке (таким образом, от момента взятия первой крысы из клетки до окончания взятия крови у второй проходило не более 3-х минут, что меньше латентного периода ГГАС (Филаретов, 1996)). Затем пробы крови отбирали через 20 мин, 1 час и 2 часа от начала стрессирования.

2.4.3. Иммуноцитохимическое исследование уровня экспрессии глюко- и минералокортикоидных рецепторов

Иммуноцитохимический метод – метод идентификации в клетке различных белков, основанный на реакции антиген-антитело. Мы использовали этот метод для определения содержания глюко- и минералокортикоидных рецепторов в клетках гиппокампа и неокортекса крыс, подвергавшихся действию гипоксии (или введению дексаметазона) в различные периоды пренатального развития, с использованием специфических коммерческих антител.

Эксперименты проводились по следующему протоколу.

Срезы толщиной 7мкм (примерно – 2.80 мм от брегмы) депарафинизировали в ксилоле (2 смены по 5 мин) и подвергали регидратации в спиртах ($98^{\circ} \rightarrow 98^{\circ} \rightarrow 95^{\circ} \rightarrow 75^{\circ} \rightarrow 50^{\circ}$ по 5 мин) и дистиллированной воде (5 мин). Затем производили демаскировку (активацию) антигена – кипячение срезов в 0.01М цитратном буфере (pH 6.0) под давлением в течение 1 мин. (Цитратный буфер: 8.8.г. цитрата натрия на 3 л. дистиллированной воды). После этого отмывали срезы в фосфатном буфере 2 раза по 5 мин. и обрисовывали гидрофобным маркером, предотвращающим растекание реактива. Далее блокировали неспецифическое связывание путем инкубации с нормальной сывороткой (1% BSA (bovine serum albumin) буфер, содержащий также 0,3 % тритона X-100, 0,2 % бацитрацина, 0,1 % NaN_3 в PBS.) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем срезы в течение ночи инкубировали при $+4^{\circ}\text{C}$ во влажной камере с первичными антителами, В работе использовали первичные антитела к рецепторам минералокортикоидов (1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA), рецепторам глюкокортикоидов (1:100, Calbiochem, Merck Chemicals, Germany или 1:50, Santa Cruz Biotechnology, USA), кроличьи антителами к белку домена инозитол 1,4,5-трифосфатного рецептора типа 1 (IP3R-1) (Sanna Cruz Biotechnology, USA), .

После инкубации стекла стряхивали (для удаления излишков антител) и отмывали в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Затем обрабатывали срезы вторичными

биотинилированными антителами (разведение 1:200) в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере. Отмывали в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Далее наносили универсальную систему авидин-биотинового комплекса (ABC, Vector Laboratories, Inc, USA) и оставляли инкубироваться 30 мин при комнатной температуре. Для приготовления ABC компоненты А и В (для каждого - разведение 1:100) последовательно добавляли в фосфатный буфер, тщательно перемешивали; полученную смесь оставляли на 30 мин. при комнатной температуре. После инкубации с ABC-комплексом стекла промывали в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Для визуализации реакции связывания антитела с антигеном использовали диаминобензидиновый кит (DAB Substrate kit, Vector Labs, USA): буфер (1 капля), 3,3-диаминобензидин (2 капли), H_2O_2 (1 капля) на 2.5 мл H_2O . Раствор готовили непосредственно перед раскапыванием и наносили на срезы на 5 мин., после чего стекла отмывали в дистиллированной воде (3 раза по 5 мин), высушивали и заключали под покровное стекло в глицерин-желатиновый гель.

Часть срезов с иммуноцитохмической реакцией отбирали для контрстейнинга – метода, позволяющего визуализировать клетки, в которых проявляется антиген. Эти срезы дополнительно окрашивали основным красителем Blue Counterstain (TAGS, UK). Этот краситель разработан специально для окрашивания клеток в нервной системе и специфически окрашивает нейроны, что позволяет их идентифицировать. Срезы помещали в краситель на 10 секунд, затем дифференцировали окраску водным раствором гидроксида аммония, отмывали, дегидрировали и заключали в безводную монтирующую среду (канадский бальзам).

При изучении иммунореактивности антиоксидантных белков анестезированных животных перфузировали транскардиально сначала 100 мл физиологического раствора, затем в течение 4–5 мин – 4%-ным раствором параформальдегида в 0.1 М фосфатном буфере (PBS; pH 7.3). После окончания перфузии животных декапитировали, мозг извлекали и в течение 60 мин фиксировали тем же фиксатором. До начала анализа образцы мозга хранили в 15%-ном растворе сахарозы в фосфатном буфере PBS при температуре +4°C. Ткань замораживали в Tissue_Tek® O.C.TTM Compound (Sakura Finetek) и немедленно с помощью криоката при температуре –20°C делали фронтальные срезы мозга толщиной 11 микрон на уровне гиппокампа и базолатеральной миндалины (примерно –2.80 мм от линии bregma). Срезы помещали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизином (Sigma) и в течение 15 мин преинкубировали в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA, Boehringer Mannheim GmbH). Затем в течение ночи каждую из четырёх групп срезов инкубировали с одним из первичных поликлональных

аффинно-очищенных кроличьих антител (разведённых в фосфатном буфере PBS, содержащем 1% BSA и 0.3% Triton X-100) при +4°C) к соответствующему антиоксидантному белку: 1) к цитозольному тиоредоксину-1 мыши (антитела любезно предоставили нам доктор Юмика Нишинака и профессор Юнджи Ёдой, Отдел биологических ответов Института исследования вирусов при Университете г. Киото, Япония; разведение 1 : 500), к митохондриальному тиоредоксину-2 крысы (антитела любезно предоставил нам профессор Яннис Спирау, Отдел биологических наук Каролинского Института, Швеция; разведение 1 : 250), к митохондриальной Mn-COD человека (StressGen Biotechnologies Corp; разведение 1 : 2000) и к бычьей цитозольной Cu, Zn-COD (антитела любезно предоставила нам доктор Линг-Йи Л. Чанг, Отдел медицины Национального Центра медицины и исследований, Денвер, Колорадо, США; разведение 1 : 200). Затем, после трехкратной промывки в фосфатном буфере (по 15 мин каждая), срезы инкубировали с биотинилированными козьими вторичными антителами (Vector Labs, разведение 1 : 300) в течение 30 мин при комнатной температуре. После повторной трехкратной промывки в фосфатном буфере, срезы в течение 30 мин инкубировали с авидин-биотиновым комплексом (Vector Labs) при комнатной температуре. Для визуализации иммунной реакции и выявления локализации пептидных антиоксидантов использовали диаминобензидин. Срезы обезживали проводкой в спиртовых растворах возрастающей концентрации, а затем в ксилоле и заключали в бальзам Entellan (Строев и др., 2012).

2.5.Выделение полифосфоинозитидов

В обзоре литературы указывалось, что тканевые ПФИ характеризуются высокой скоростью посмертного гидролиза. Эта их особенность учитывалась при выборе быстрой методики фиксации ткани. Известно также, что ПФИ более прочно связаны с тканью, чем другие ФЛ. Наличие дополнительных моноэстерных фосфатных групп в молекулах ПФИ придает им более выраженные гидрофильные и особенно ионные свойства по сравнению с монофосфоинозидами и другими фосфолипидами. Поэтому для экстракции ПФИ, в отличие от других фосфолипидов, используются подкисленные смеси органических растворителей: хлороформ – метанол – концентрированная HCl в соотношении 200-100-1 (Folch, 1949).

К навескам ткани неокортекса и гиппокампа (около 100мг) добавляли 8 мл смеси хлороформ - метанол - HCl (200:100:1). Гомогенизировали, переливали в стеклянные пробирки. Экстракцию проводили 30 мин при комнатной температуре.

Для очистки раствора от нелипидных примесей производили 2 отмывки. В первой отмывке использовали 1N HCl, во второй — смесь хлороформ : метанол : 0.2N HCl

(3:47:50). Отмывающую жидкость брали из расчета 20% от объема отмываемого раствора. Долив отмывающую жидкость, перемешивали фазы с помощью механической мешалки, затем центрифугировали на центрифуге К-23 2 - 3 мин при 4000 об./мин. Фазы расслаивались. Верхнюю воднометаноловую фазу, содержащую нелипидные примеси и кислоту, отсасывали пипеткой или водоструйным насосом и отбрасывали. Образовавшуюся в интерфазе белковую пленку снимали палочкой и переносили в мерную пробирку. В дальнейшем определяли количество белка по методу Лоури (Lowry O.H. et al., 1951) и использовали для расчета отношения количества фосфолипида к количеству белка.

После двух отмывок к раствору липидов, находящемуся в хлороформенной фазе по каплям прибавляли метанол до восстановления прозрачности раствора (до восстановления однофазной системы). Затем раствор упаривали почти досуха в токе азота при температуре 37° С. Образовавшийся осадок растворяли в 0.6 мл смеси хлороформ : метанол : вода (75:25:2). Брали две пробы по 0.02 мл на определение общих фосфолипидов и две пробы по 0.2 мл на хроматографический анализ.

Для разделения фракций ФИ из липидного экстракта использовали метод бумажной хроматографии (Киселев, 1978). Хроматографию проводили на отечественной хроматографической бумаге марки «средняя». Обработка бумаг формалином проводилась по модифицированному методу Хорхаммера, Вагнера и Рихтера (Horhammer, Wagner, Richter, 1959). Бумаги разрезали на полосы размером 13.5 x 50 см и пропитывали в кювете смесью формалина, ледяной уксусной кислоты и родамистого аммония (на 120 листов — 2 л 37% раствора формалина, 100 мл ледяной уксусной кислоты и 4 г NH_4CNS). Полосы сворачивали в рулон, заворачивали в большой лист хроматографической бумаги и в течение 5 — 6 часов сушили в герметически закрытом термостате при $t=123^\circ\text{C}$. Отмывали бумаги от избытка формалина до отрицательной реакции смывных вод на формалин с щелочным раствором резорцина. Для проведения реакции несколько миллилитров исследуемой жидкости кипятили с равным объемом 40% раствора NaOH , содержащем 0.05 г резорцина. В присутствии формальдегида желтая окраска переходит в красную. Чувствительность данного метода составляет 1:10000000. После получения отрицательной реакции на формалин бумаги высушивали и помещали на 1 час в 0.02% раствор ЭДТА для связывания катионов. После этого бумаги высушивали и проглаживали.

Для разделения использовали метод восходящей хроматографии. Пробы наносили на хроматограммы. Помещали хроматограммы в камеру с парами аммиака на 5 мин. Затем хроматограммы помещали в цилиндры, в которые заранее была налита хроматографическая смесь бутанол : ледяная уксусная кислота : эфир : вода

(400:100:120:500). Хроматограммы должны быть погружены в хроматографическую смесь на 2 мм и не должны касаться стенок цилиндра. После окончания хроматографии хроматограммы высушивали. Пятна липидов окрашивали 0.01% раствором родомина-6-g в воде, хроматограммы снова высушивали.

Данный метод позволял хорошо разделять все три фосфоинозитидные фракции. Величины R_f для каждого индивидуального фосфоинозиотида при соблюдении стандартных условий хроматографического разделения постоянны — 0.21 для ТФИ, 0.25 для ДФИ и 0.35 для МФИ.

Полученные хроматографические пятна фосфолипидов вырезали и заливали смесью 57% хлорной и концентрированной серной кислот (370:30) для минерализации и последующего анализа на содержание «Р». Количество кислоты различно для разных липидных пятен: пятна МФИ, фосфатидилсерина и общих липидов минерализовали в 0.8 мл кислотной смеси (объем последующей фотометрии — 5.0 мл), а ТФИ и ДФИ — в объеме 0.5 мл (объем последующей фотометрии — 2.0 мл). Добавляли 1 - 2 капли молибдата в качестве катализатора. Пробы медленно нагревали до $t = 170^{\circ} - 200^{\circ} \text{C}$, следя за равномерностью процесса обугливания и полной минерализации проб. После обесцвечивания раствора пробы охлаждали до комнатной температуры и определяли в них содержание фосфора по методу Бартлетта (Bartlett G.R., 1959).

Рассчитывали количества белка, ТФИ, ДФИ, МФИ. Содержание фосфоинозитидов рассчитывали как отношение Р фосфоинозитидов на мг белка ткани мозга.

2.6. Исследования на переживающих срезах пириформной коры мозга крыс.

2.6.1. Приготовление и инкубация переживающих срезов мозга.

Участки головного мозга, содержащие пириформную кору, иссекали из обоих полушарий мозга декапитированных животных. Участки переносили в преинкубационную камеру вибротома "EMS-4000" ("Electron Microscopy Sciences" USA) и готовили тангенциальные срезы коры толщиной 400 мкм (по одному из каждого полушария). Все описанные выше процедуры подготовки проводили максимально быстро и в присутствии преинкубационной среды, охлажденной до $4-6^{\circ}\text{C}$. Готовые срезы помещали в специальную камеру с проточной инкубационной средой, температура которой доводилась до $37,5^{\circ}\text{C}$. В качестве инкубационной среды использовали оксигенизированный солевой буферный раствор (модернизированный раствор Мак Илвейна) следующего состава (в mM): 124 NaCl, 5 KCl, 2.6 CaCl₂, 1.24 KH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 3 NaHCO₃, 10 глюкоза и 24 tris-HCl. Раствор фильтровали через керамический фильтр и доводили pH до 7,3.

2.6.2. Исследование фосфоинозитидного ответа на аппликацию глутамата.

Исследования характера реагирования фосфоинозитидной системы на действие глутамата проводили на переживающих тангенциальных срезах обонятельной коры мозга крыс. Срезы после приготовления помещали в 1 мл инкубационной среды. Раствор насыщали кислородом, температуру поддерживали на уровне 37⁰С, pH 7.3-7.4. После 30-минутной преинкубации срезы переносили в свежую среду того же состава, но без Ca²⁺, с добавлением меченного тритием мио-инозита (фирмы “Amersham”) (³H – 0,5 МБк в 1 мл среды). После 2-часовой инкубации срез переносили в инкубационную среду с Ca²⁺ (CaCl₂ – 2,6 мМ), Li⁺ (LiCl – 10 мМ) для предотвращения гидролиза инозит фосфатов до свободного мио-инозита (Berridge, M. J., Downes, C. P., and Hanley, M. R. (1982) Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands) и немеченым мио-инозитом, инкубировали 10 мин, прибавляли раствор глутамата в конечной концентрации 50 мкМ и через 30 секунд останавливали процесс добавлением 2,5 мл холодной смеси хлороформ – метанол в соотношении 1 – 9. Затем добавляли хлороформ и конц. HCl до соотношения хлороформ - метанол – конц. HCl 200-100-1. Добавляли 1 мл 1N HCl. Центрифугировали – верхнюю водную фазу отбирали для нанесения на колонку, межфазную белковую пленку отбирали для определения количества белка.

Водную фазу нейтрализовали NaOH до pH 7,0 и наносили на колонку диаметром 6 мм и высотой 20 мм, заполненной смолой Dowex (type 1x8, mesh 200-400, formiat form). Свободный мио-инозит и глицерофосфоинозит вымывали с колонки водой и смесью муравьинокислого аммония (60мМ) и тетрабората натрия (5 мМ) соответственно. Инозит фосфаты элюировали с колонки смесью муравьинокислого аммония (1 М) и тетрабората натрия (100 мМ). Элюат упаривали и определяли радиоактивность в сцинтилляционном счетчике. Изменения количества инозит фосфатов по отношению к базальному уровню (радиоактивность проб без аппликации глутамата) определяли в имп/мин/мг белка пробы.

2.6.3. Определение динамики флуоресценции связанного внутриклеточного кальция.

Для определения уровня, а также динамики содержания связанного внутриклеточного кальция (Ca-c) в срезе в ответ на предъявляемые экспериментальные воздействия применяли хлортетрациклиновый (ХТЦ) флуоресцентный зонд (chlortetracycline (CTC), Sigma, USA) на установке, разработанной Д. Г. Семеновым при участии автора в Лаб. Регуляции функций нейронов мозга Ин-та физиологии им. И. П.

Павлова. Базовыми элементами установки являлись: контактный микроскоп ЛЮМAM-КФ (ЛОМО, Россия), светодиодный осветитель, содержащий блок светодиодов L2523UVC (Kingbright, Hong-Kong) и оптоволоконный спектрометр AvaSpec-2048 (Avantes BV, Netherlands). Установка позволяет измерять квантовый выход флуоресценции микроучастков среза (100 мкм) в спектральной области с максимумом 522 нм, возбуждаемой облучением с пиковой длиной волны 396 нм, что соответствует условиям для селективного определения ХТЦ-опосредованной флуоресценции белковых и липидных внутриклеточных структур, содержащих Са-с в гидрофобных доменах (рис. 14).

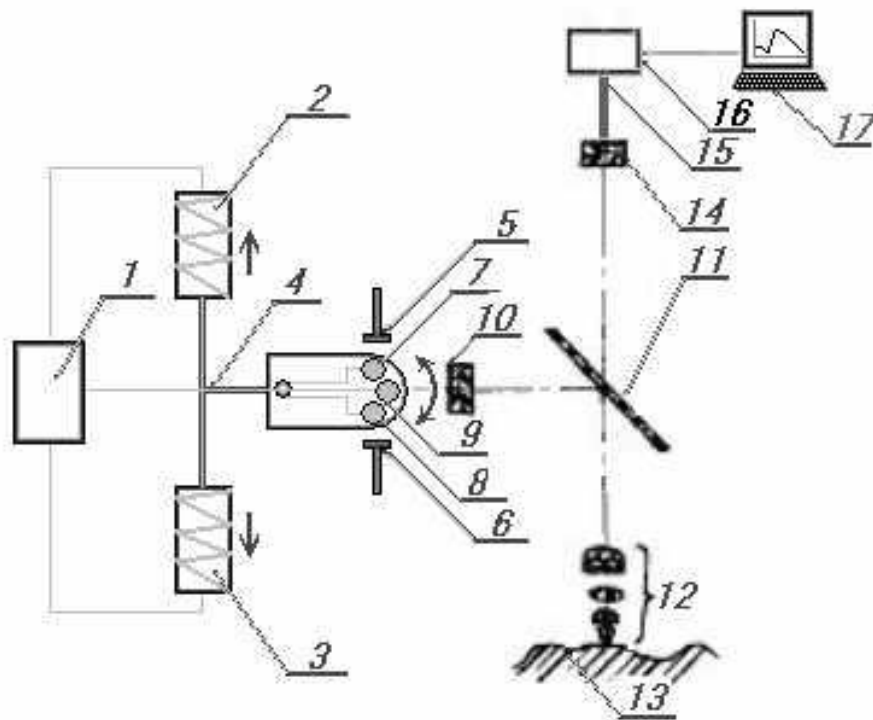


Рис. 14. Измерительная схема на основе совмещения контактного люминесцентного микроскопа ЛЮМAM-КФ, спектрофотометра Avantes и светодиодной системы освещения.

1 – стабилизированный источник питания с элементами управления; 2, 3 – соленоиды; 4 – рабочее плечо пластины светодиодов; 5, 6 – юстировочные винты, ограничивающие перемещение пластины со светодиодами; 7, 8 – возбуждающие ультрафиолетовые светодиоды; 9 – белый светодиод для освещения поля зрения; 10 – коллимационная линза; 11 – светоделительная пластинка; 12 – объектив; 13 – объект; 14 – коллимационная линза; 15 – оптоволоконный кабель; 16 – спектрофотометр Avantes, 17 – ПК.

Для стимуляции метаботропных глутаматных рецепторов первой группы (ImGluRs) применяли парную аппликацию неселективного агониста S(3-5)-дигидрокси-фенилглицин (DHPG Sigma, USA) в конечной концентрации 100 мкМ в течении 2 мин.

Флуориметрические данные представлены на графиках в виде временной последовательности средних процентных значений флуоресцентного сигнала для каждого 5-минутного измерительного этапа \pm стандартная ошибка среднего. В таблицах и диаграммах, относящихся к кальциевым ответам на предъявление агонистов глутаматных рецепторов, эти данные продублированы интегральной формой представления для серии измерений за период наблюдения ответа (40 мин).

2.7. Биохимический анализ перекисного окисления липидов.

Животных забивали декапитацией. Все процедуры проводили на холоду. Из головного мозга извлекали гиппокамп, и преимущественно, лобные доли коры. Затем ткани гомогенизировали:

А) в смеси хлороформ - метанол (2:1);

Б) в буфере трис-HCl, содержащим KCl (30мМ трис-HCl, 100мМ KCl, pH=7,4)

А: Определение диеновых и триеновых конъюгатов.

1мл хлороформной фазы упаривали досуха в водяной бани, растворяли в смеси метанол – гексан (5:1) и определяли содержание диеновых и триеновых конъюгатов спектрофотометрически при 233нм и 274нм соответственно (Pryor, 1985). Количество выражали в единицах оптической плотности на мг фосфолипидов. Кроме этого регистрировали оптическую плотность липидного экстракта при 215нм и рассчитывали индекс Клейна $I = \frac{E_{233}}{E_{215}}$, характеризующего степень окисленности липидов.

Определение липоперекисей.

Количество липоперекисей определяли колориметрическим методом с использованием хлористого алюминия (Asakawa, 1981). К 200мкл липидного экстракта добавляли 0,5 мл 2% раствора KI в этаноле, 0,5мл раствора AlCl₃ (2г безводного AlCl₃ и 0,02г о-фенантролина в 100мл 90°этанола) и 1мл гексана (х.ч.), перемешивали и инкубировали пробы 5 мин при 37°C в суховоздушном термостате. После добавляли 15мл 0,01 N HCl и 0,5мл раствора крахмала (1г крахмала и 20г NaCl в 100мл H₂O), пробы тщательно перемешивали и центрифугировали 3 мин при 3000 об./мин. Оптическую плотность нижнего слоя измеряли при 560нм. Количество липоперекисей выражали в условных единицах оптической плотности на мг фосфолипидов $C = \frac{E_{560}}{\text{мг фл}}$.

Определение оснований Шиффа.

Из липидного экстракта отбирали 1мл (0,5мл), выпаривали досуха и растворяли в хлороформе. Содержание Шиффовых оснований определяли флюориметрическим методом при максимуме возбуждения 365нм и максимуме испускания 425 нм (Bidlack, Tarpe, 1973), выражая в относительных единицах флюоресценции соотнесённых к общему количеству фосфолипидов $C = \frac{J}{\text{мг фл}}$. Предварительно прибор стандартизировали раствором хинина в 0,1 N H₂SO₄ (30 нг в 1мл).

Определение количества фосфора общих фосфолипидов.

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

Б: Определение продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБКАП)

Из буфер трис-HCl гомогенатов гиппокампа, коры и фракции митохондрий коры отбирали 0,5 мл. К нему добавляли по 0,5 мл 1% раствора ортофосфорной кислоты и 0,25мл 0,5% раствора тиобарбитуровой кислоты, перемешивали, нагревали на водяной бане (100°C) 20 мин. Затем охлаждали и образовавшийся окрашенный комплекс экстрагировали 1,5мл бутанола (х.ч.). Пробы тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 3000 об./мин. и фотометрировали при 532нм (Андреева и др., 1988). Также учитывался вклад неспецифического поглощения (светорассеяния), который оценивался по величине оптической плотности при 600нм (Гаврилова и др., 1987). Содержание ТБКАП выражали в единицах оптической плотности на 1 мг белка, определенного методом Лоури (Lowry et al., 1951).

2.8. Иммуноцитохимические исследования экспрессии пептидных антиоксидантов

Уровень экспрессии пептидных антиоксидантов определяли иммуноцитохимическим методом. Для проведения иммуноцитохимического анализа анестезированных животных перфузировали транскардиально сначала 100 мл физиологического раствора, затем в течение 4-5 минут – 4% раствором параформальдегида в 0.1 М фосфатном буфере (PBS; pH 7.3). После окончания перфузии животных декапитировали, мозг извлекали и в течение 60 мин фиксировали тем же

фиксатором. До начала анализа образцы мозга хранили в 15% растворе сахарозы в фосфатном буфере PBS при температуре +4° С.

Проводили иммуноцитохимический анализ. Ткань замораживали в Tissue-Tek® O.C.T™ Compound (Sakura Finetek) и немедленно с помощью криоката при температуре -20°С делали фронтальные срезы мозга толщиной 11 микрон на уровне гиппокампа и базолатеральной миндалины (примерно -2.80 мм от линии bregma) (Paxinos, Watson, 1986). Срезы помещали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизин (Sigma) и в течение 15 минут преинкубировали в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA, Boehringer Mannheim GmbH). Затем в течение ночи инкубировали с первичными поликлональными аффинно-очищенными кроличьими антителами к Mn-СОД человека (StressGen Biotechnologies Corp, разведение 1:2000 в фосфатном буфере PBS, содержащем 1% BSA и 0,3% Triton X-100) при +4° С. (или с поликлональными кроличьими антителами к СОД-1 (разведение 1:200), или с первичными поликлональными аффинно-очищенными кроличьими антителами к Trx-1 мыши (разведение 1:500 в фосфатном буфере PBS, содержащем 1% BSA и 0,3% Triton X-100). Затем, после трехкратной промывки в фосфатном буфере (по 15 минут каждая), срезы инкубировали с биотинилированными козыми вторичными антителами (Vector Labs, разведение 1:300) в течение 30 минут при комнатной температуре. После повторной трехкратной промывки в фосфатном буфере, срезы в течение 30 минут инкубировали с авидин-биотиновым комплексом (Vector Labs) при комнатной температуре. Для визуализации иммунной реакции и выявления локализации соответствующих антиоксидантных белков использовали диаминобензидин. Срезы обезживали проводкой в спиртовых растворах возрастающей концентрации, а затем в ксилоле и заключали в бальзам Entellan.

Уровень экспрессии Trx1, Trx2, Cu-SOD, Mn-СОД определяли в нейронах Аммонова рога (области CA1, CA2 и CA3) и зубчатой извилины (DG) гиппокампа. Анализ изображений проводили на участке длиной 500 мкм. Уровень иммунореактивности нейронов исследуемых образований оценивали в 6 срезах от каждого мозга. Степень интенсивности иммунореактивности клеток на цифровых изображениях выражали в условных единицах оптической плотности от 0 (абсолютно белого) до 100 (абсолютно черного). Иммунопозитивные клетки подразделяли на два условных класса: слабо окрашенные (окраска на 1 - 10 условных единиц интенсивнее фона) и интенсивно окрашенные (более чем на 10 условных единиц интенсивнее фона). Уровень иммунореактивности оценивался по двум критериям: 1) отношению общего числа иммунопозитивных клеток у опытных животных к общему числу иммунопозитивных клеток в контроле, выраженному в процентах (N₊) и 2) отношению числа интенсивно

окрашенных клеток у опытных животных к числу интенсивно окрашенных клеток в контроле, также выраженному в процентах (Ni).

2.9. Иммуногистохимические исследования инозиттрифосфатных рецепторов в гиппокампе крыс.

На соответствующих сроках постнатального развития животные были декапитированы, извлекали головной мозг, который фиксировали путем иммерсии с использованием МолФикс в соответствии с рекомендациями производителя и подвергали гистологической обработке по стандартному протоколу. Серийные поперечные срезы мозга толщиной ~6-7мкм (примерно – 2.80 мм от брегмы) были смонтированы попарно на предметное стекло, покрытое для предотвращения отлипания срезов, яичным альбумином.

Для оценки уровня инозиттрифосфатных рецепторов в гиппокампе крыс использовали иммуноцитохимический метод с компьютерным анализом микроизображений. Для этого после стандартных процедур депарафинизации, регидратации и демаскировки антигена, срезы в течение ночи при +4°C инкубировали с первичными поликлональными кроличьими антителами к белку домена инозитол 1,4,5-трифосфат рецептора типа 1 (IP3R-1) (Sanna Cruz Biotechnology, USA). Для визуализации мест связывания первичных антител использовали биотинированные ослиные вторичные антитела (Jackson Lab (USA), ультрачувствительный стрептавидин-пероксидазный полимер (Sigma, USA) и диаминобензидин – пероксидазный кит (Vector diagnostic, USA).

Для визуализации реакции использовали диаминобензидин. После обезвоживания и заключения срезов в желатин проводили количественный анализ иммунореактивности нейронов с использованием системы, состоящей из светового микроскопа Jenaval (Carl Zeiss, Germany), цифровой камеры Baumer CX05c (Baumer Optronic, Germany) и компьютера IBM PC с программным обеспечением Videotest Master Morphology. Полуколичественный анализ экспрессии IP3R-1 в нейронах CA1 области гиппокампа проводили согласно парадигме разработанной нами ранее для иммуногистохимического анализа. Анализу подвергались участки гиппокампа длиной 500µм для взрослых животных и 350 µм для 2-х недельных крысят. Все изображения нейронов, обладающих видимой иммунореактивностью, были оцифрованы и интенсивность окраски, показателем которой служила оптическая плотность, рассчитывалась путем усреднения данных, полученных для каждого индивидуального среза. За нейроны с повышенной экспрессией IP3R-1 принимали те, интенсивность окраски которых превышала среднюю. Количество таких нейронов было нормализовано к общему числу иммунопозитивных нейронов.

2.10. TUNEL метод детекции апоптоза

В процессе апоптоза геномная ДНК расщепляется специфическими кальций-зависимыми эндонуклеазами, в результате чего образуются двунитевые фрагменты. ДНК фрагментация в отдельной апоптотической клетке может быть визуализирована путем детекции биотинилированных нуклеотидов, присоединенных к свободным 3'-гидроксильным концам образовавшихся в результате фрагментации обрывков ДНК. На этом принципе основан TUNEL метод детекции апоптоза.

Для выявления апоптоза в нейронах мозга новорожденных (20суточных эмбрионов) крыс, подвергавшихся тяжелой гипобарической гипоксии и введению дексаметазона, мы использовали NeuroTACs Apoptosis Detection kit (R&D Systems, Abingdon, UK), основанный на TUNEL методе, однако разработанный специально для детекции апоптоза в нервных клетках.

Образцы ткани мозга (размером 0,5x0,5x0,5 см) фиксировали и изготавливали парафиновые срезы как описано выше. Перед дальнейшей процедурой срезы депарафинизировали (ксилол (10 мин) - ксилол (5 мин) – спирт 96 °(5 мин)- спирт 96 °(5 мин) - спирт 70 °(5 мин) - спирт 50 °(5 мин)- PBS(5 мин)). Затем с целью увеличения проницаемости нейрональных мембран для проникновения фермента-метки на срезы наносили по 50 мкл NeuroPore реагента (R&D Systems, Abingdon, UK) и инкубировали во влажной камере при комнатной температуре 30 мин. Затем после отмывки срезы обрабатывали раствором перекиси водорода (5 мл 30% H_2O_2 на 45 мл метанола) для подавления эндогенной пероксидазной активности. Далее на срезы последовательно наносили 1xTdT буфер (5 мин), Labeling reaction mix реагент (R&D Systems, Abingdon, UK), содержащий биотинилированные нуклеотиды и TdT фермент, присоединяющий их к 3'-участкам ДНК фрагментов (инкубация в течение 1 часа). Параллельно соседние срезы отбирались для проведения соответствующих контролей – позитивного контроля (с добавлением TACS-нуклеазы) и негативного контроля (добавление Labeling reaction mix реагента, не содержащего фермента). Реакцию останавливали путем помещения срезов в TdT Stop буфер (R&D Systems, Abingdon, UK), отмывали в PBS (2 раза по 2 мин). Метку визуализировали добавлением стрептавидин-пероксидазного раствора (10 мин) и диаминобензидина (DAB Substrate kit, Vector Labs, USA): буфер (1 капля), 3,3'-диаминобензидин (2 капли), H_2O_2 (1 капля) на 2.5 мл H_2O). После проявления и стабилизации окраски срезы дегидрировались и заключались в канадский бальзам.

Для оценки интенсивности апоптотических процессов использовали также метод выделения и электрофорез фрагментированной ДНК

Конечные эффекторы запрограммированной клеточной смерти по типу апоптоза, нуклеазы CAD (как и другие нуклеазы), режут ДНК по участкам, находящимся в свободном от нуклеосом состоянии (линкерным участкам). Это приводит к формированию фрагментов ДНК кратных по длине размеру ДНК, намотанной на нуклеосому (200-250, 400-500, 600-750 и тд. пар оснований (в зависимости от вида животного и ткани)). На электрофореграмме такие фрагменты выстраиваются в виде характерной апоптотической лестницы. К завершению апоптоза вся ДНК фрагментируется до 200-250 пар оснований (длина ДНК на одной нуклеосоме).

ДНК выделяли из мозга 20-суточных эмбрионов и 7-суточных крыс при помощи экстрагирующего буфера, содержащего 2% детергент цетилтриметиламмоний бромид, 1,4М NaCl, 0,02М ЭДТА (pH 8.0), 0,01М Трис-HCl (pH 8.0) (инкубация 30 минут при 60°C). Пробы отмывали от липидных примесей хлороформом, после чего ДНК осаждали изопропанолом и обессаливали 70% этанолом. Осадок после сушки растворяли в буфере TE (0.04 М трис, 0.002 М ЭДТА, pH 8,0). Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в горизонтальном 1 % агарозном геле (15,2 см/10,3 см/0.4 см) в буфере TAE (0.04 М трис-ацетат, 0.002 М ЭДТА, pH 8.0). Для выявления ДНК в агарозный гель вводили бромистый этидий до конечной концентрации 0,4 мкг/мл. В карманы геля вносили раствор, содержащий 3 мкг ДНК, краситель бромфеноловый синий и утяжелитель (20% глицерин). В качестве стандартов использовали 1 kb Ladder, ДНК фага λ , рестрицированную HindIII и HindIII/EcoRI. Электрофорез проводили при 50 В в течение 2,5 часов. Детекцию осуществляли с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc с ручным управлением в ультрафиолетовом свете при длине волны 310 нм.

2.11. Компьютерный анализ микроизображений

Анализ иммуногистохимических препаратов проводили с помощью морфометрической установки, позволяющей количественно оценить экспрессию продуктов генов по интенсивности иммунореактивности.

Морфометрическая установка состояла из светового микроскопа Jenaval (Carl Zeiss, Germany), цифровой камеры Baumer CX05c (Baumer Optronic, Germany) и компьютера IBM PC с программным обеспечением ВидеоТест Мастер Морфология (разработка ООО "Видео Тест", Санкт-Петербург).

Используя программу ВидеоТест Мастер Морфология производили подсчет числа иммунопозитивных клеток. Для этого определяли величину оптической плотности каждой из них в условных единицах яркости (1/ед.яркости). Иммунопозитивными автоматически

считались клетки, оптическая плотность которых превышала показатель фона на 5 условных единиц. На основании заданных параметров Таблицы классов, исходя из показателей оптической плотности, все иммунопозитивные клетки автоматически разделялись на два класса: интенсивная иммунореактивность (класс 1) и слабая иммунореактивность (класс 2). Согласно Таблице классов, в первый класс относили объекты (клетки) с условным показателем в пределах 0.08-0.55, во второй – с плотностью выше фона, но ниже 0.08 (рис. 15).

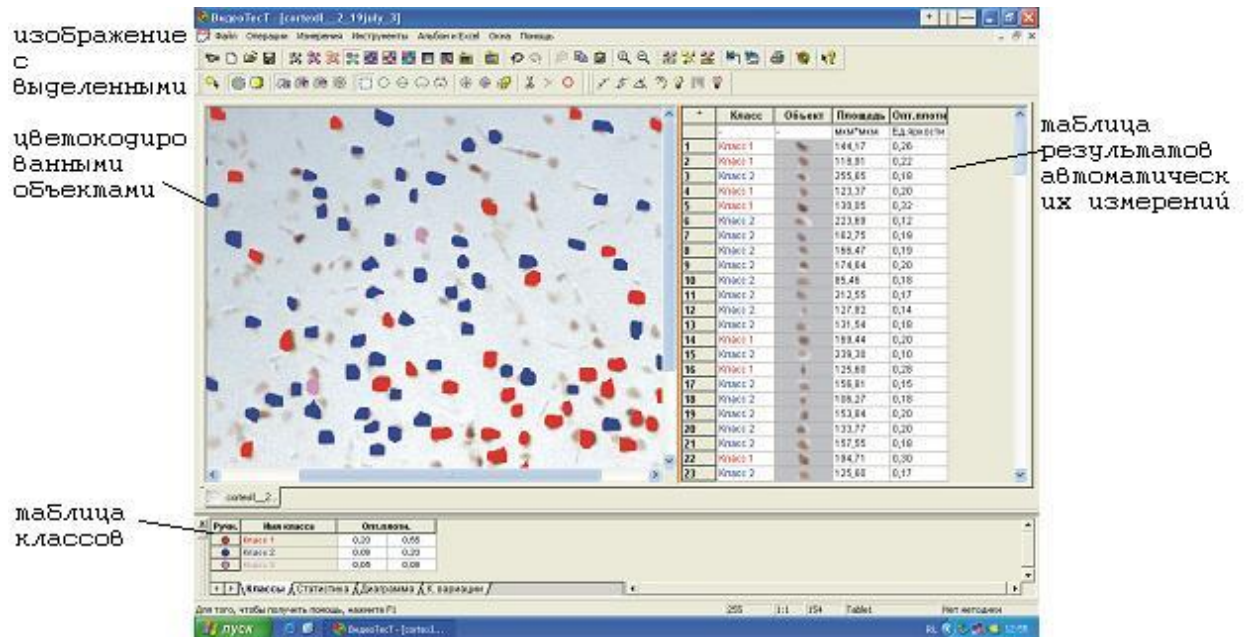


Рис.15. Автоматический анализ изображения с использованием программы ВидеоТест Мастер Морфология.

Анализировали общее число иммунореактивных клеток, и число интенсивно иммунореактивных клеток каждого класса. В зависимости от характера наблюдаемых изменений использовалось несколько способов представления результатов – представляли либо оба показателя, либо общее число иммунореактивных клеток и число интенсивно иммунопозитивных клеток. Последний показатель отражает увеличение интенсивности экспрессии иммунореактивного белка в отдельных клетках и является наиболее показательным в тех случаях, когда общее количество иммунопозитивных клеток изменяется незначительно или не изменяется вовсе.

2.12. Статистическая обработка результатов

Результаты обрабатывали статистически с помощью пакета программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.) общепринятыми для медико-биологических исследований методами - расчет средней арифметической величины и ошибки среднего в исследуемых группах животных,

сравнение средних значений выборок по критерию Стьюдента или методу однофакторного ANOVA, с достоверностью различий при $p < 0.05$. В случае, когда распределение значений переменных отличалось от нормального, использовались непараметрические критерии Вилконсона, Манни-Уитни, различия считались достоверными при $p < 0.05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Соматическое и сенсомоторное развитие, и особенности раннего постнатального обучения у крыс, перенесших воздействие тяжелой гипобарической гипоксии или дексаметазона в различные периоды пренатального онтогенеза.

3.1.1. Влияние гипоксической экспозиции или введения дексаметазона на общие показатели протекания беременности крыс.

В этом разделе работы проводили сравнительный анализ действия тяжелой гипобарической гипоксии (или введения дексаметазона) на 11-13-е, 14-16-е или 17-19-е сутки пренатального онтогенеза.

Воздействие гипоксии или дексаметазона в пренатальном периоде не влияло на количество крысят в помете (таблица 6). Средняя смертность новорожденных крысят в контрольной группе составляла 15%. В группе крыс, получавших инъекции дексаметазона на 14-16-е сутки беременности, отмечалась повышенная смертность крысят при рождении и сразу после рождения - в среднем выживали лишь 16% родившихся крысят. При обследовании плодов самок этой группы было обнаружено, что инъекции дексаметазона не приводят к остановке их развития и гибели во внутриутробный период (17-е или 20-е сутки беременности).

Анализ показателей массы тела и мозга выявил существенные межгрупповые различия. Плоды, подвергавшиеся воздействию дексаметазона на 11-13-е сутки беременности, имели наибольшую массу тела на 17-е сутки: в среднем их масса тела была выше на 30%, чем у контроля. В последующие дни в этой группе отмечалось снижение темпа прибавки массы тела. Введение дексаметазона на 11-13-е сутки беременности не привело к изменению массы мозга плодов. Не было выявлено изменений ни массы тела, ни массы мозга у крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии на 11-13-е сутки беременности.

При введении дексаметазона на 14-16-е сутки наблюдалось увеличение массы тела на 17-е сутки беременности (на 11%) по сравнению с контролем. На 20-е сутки беременности масса тела и масса мозга у плодов этой группы была снижена соответственно на 27% и на 8 % по сравнению с контролем. Воздействие гипоксии на 14-16-е сутки приводило к достоверному снижению массы тела (на 17%) и массы мозга (6%) у плодов на 20-е сутки беременности. При введении дексаметазона на 17-19-е сутки наблюдалось снижение массы тела (на 15%) и массы мозга (на 7%) на 20-е сутки беременности. У плодов, подвергавшихся воздействию гипоксии так же на 17-19-е сутки беременности, отмечалось достоверное снижение массы мозга (5%) на 20-е сутки беременности.

Таблица 6. Влияние пренатальной гипоксии и дексаметазона на продолжительность беременности, величину помета, массу тела и у мозга плодов.

Воздействие	Продолжительность беременности (сутки)	Величина помета (n)	Масса тела (г)		Масса мозга (мг)	
			17 сутки беременности	20сутки беременности	17 сутки бер.	20 сутки бер.
Контроль	21.5±0.2	12.0±0.3	0.47±0.01	3.42±0.07	64.0±1.2	161.4±2.1
ПГ/ГД 11-13	21.2±0.5	11.5±0.5	0.46±0.01*	3.32±0.042†,	65.0±1,6	162.1±2,5
ПД/ГД 11-13 0,8 мг/кг	21.0±0.6	12.6±0,4	0.61±0.01*,†	3.14±0.04*,†,††	64.7±4.0	164.6±10.4
ПГ/ГД 14-16	21.6±0.3	11.8±0.4	0.50±0.01	2.83±0.06*	61.9±1.9	152.5±2.8**
ПД/ГД 14-16 0,8 мг/кг	21.7±0.4	12.2±0.6	0.52±0.01*	2.50±0.05*	60.2±1.0	148.4±1.5*
ПГ/ГД 17-19	21.2±0.3	11.9±0.5	—	3.27±0.05†	—	153.1±3.6**
ПД/ГД 17-19 0,8 мг/кг	21.2±0.2	12.3±0,4	—	2.92±0.06*,†	—	150.9±2.6*

* $p < 0.001$, ** $P < 0.05$ достоверно отличаются от контроля.

† $p < 0.001$ достоверно отличается от показателей группы, подвергавшихся воздействию дексаметазона или гипоксии на 14-16-е сутки беременности.

†† $p < 0.001$ достоверно отличается от показателей группы, подвергавшихся воздействию дексаметазона или гипоксии на 17-19-е сутки беременности.

ПГ/ГД – группа крыс, подвергавшаяся воздействию гипоксии на соответствующий день беременности.

ПД/ГД - группа крыс, подвергавшаяся воздействию дексаметазона на соответствующий день беременности.

3.1.2. Соматическое созревание у самцов и самок крыс линии Вистар после действия пренатальной гипоксии или дексаметазона.

В ходе экспериментов беременных крыс подвергали воздействию тяжелой гипорбарической гипоксии (180 мм.рт.ст., продолжительность воздействия – 3 часа) или введению дексаметазона. Гипоксическая экспозиция осуществлялась на 11-13-е (1-я

экспериментальная группа), 14-16-е (2-я экспериментальная группа) или 17-19-е (3-я экспериментальная группа) сутки беременности. Исследовались характеристики потомков крыс, перенесших гипоксию в указанные сроки беременности.

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

Половых различий по показателям соматического и сенсомоторного развития в течение первых дней жизни выявлено не было. Это позволило усреднить данные, полученные в экспериментах на самцах и самках контрольных и опытных групп. В целом, результаты исследования показали также, что в раннем постнатальном периоде по всем исследованным показателям соматического и сенсомоторного развития крысят экспериментальных групп не различаются между собой.

Масса тела экспериментальных крысят, подвергавшихся воздействию гипоксии, на 3-е сутки жизни в среднем была на 20-25% меньше, чем у контрольных животных (масса тела контрольных животных и крысят 1-й, 2-й и 3-й экспериментальных групп соответственно составляла 8.4 ± 0.6 , 6.4 ± 0.7 , 6.7 ± 0.7 и 6.6 ± 0.5 г (для всех сравнений с контролем $p < 0.05$). Достоверных различий по этому показателю между животными экспериментальных групп выявлено не было. В дальнейшем (период наблюдения – 20 первых дней жизни) различия в массе тела между животными всех трех экспериментальных групп и контролем сохранялись – масса тела экспериментальных животных в среднем на 20% была меньше, чем у контрольных.

Пренатальные инъекции дексаметазона так же вызывали снижение массы тела крысят в постнатальном периоде. Как видно из рисунка 16, наиболее значительные изменения массы тела были выявлены у крыс, подвергавшихся воздействию дексаметазона на 14-16-е сутки гестации. Резкое снижение массы тела у животных этой группы прослеживалось уже в пренатальном периоде.

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. Анализ динамики развития сенсомоторных характеристик, однако, не выявил столь однозначных результатов. Так, характер проявления *сгибания (флексии) пальцев передних конечностей и экстензии задних конечностей* (по Зарайская и др., 2000), формирующихся в первые дни жизни, не отличался от наблюдаемого у контрольных животных.

Полученные данные показывают, что воздействие гипобарической гипоксии в начале, середине и конце третьей недели гестации приводит к значительному замедлению соматического развития крысят в постнатальном периоде.

Последняя неделя эмбрионального периода у крыс характеризуется наиболее интенсивным ростом плода, что, вероятно, и не позволило выявить зависимость степени выраженности отставания соматического развития новорожденных крысят от сроков воздействия гипоксии в настоящем исследовании.

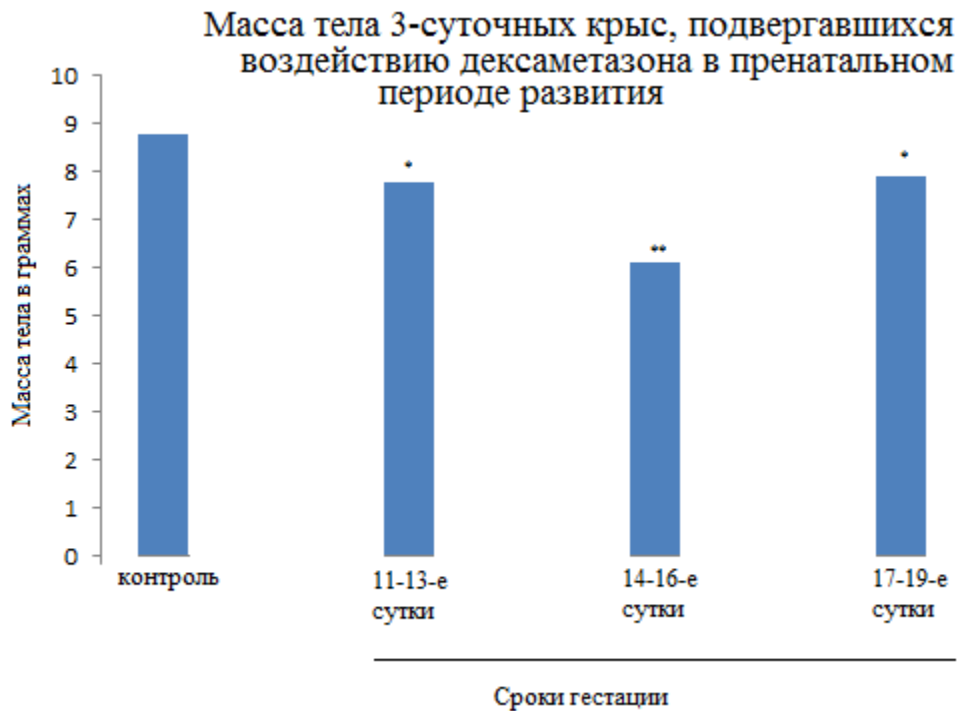


Рис. 16. Влияние введения дексаметазона (80 мг/кг) в различные сроки пренатального онтогенеза на показатели массы тела 3-суточных крыс. ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ достоверно отличаются от контроля.

3.1.3. Развитие сенсомоторных реакций у самцов и самок крыс линии Вистар в раннем постнатальном периоде после действия пренатальной гипоксии или дексаметазона.

В целом, результаты исследования показали, что в раннем постнатальном периоде по всем исследованным показателям сенсомоторного развития крысята экспериментальных групп не различаются между собой, что позволило усреднить данные, полученные при тестировании всех экспериментальных групп. Благодаря этому удалось выявить более четкую общую динамику изменений в развитии сенсомоторных реакций у крыс, подвергшихся воздействию гипоксии или дексаметазона в пренатальном периоде.

Было показано, что возрастная динамика выполнения *переворачивания на горизонтальной поверхности*, выявленная у экспериментальной и контрольной групп, практически совпадала. К 6-м суткам жизни животные всех групп (экспериментальные и контрольные) полностью осуществляли переворачивание со спины на живот, при этом время реакции составляло 1.5 ± 0.1 с.

В тесте «избегания наклонной плоскости (негативный геотропизм)» крысят сажали на наклонную шершавую поверхность головой вниз. Угол наклона плоскости составлял 20° , 30° или 40° . Регистрировали угол и время поворота животных, стремившихся занять нормальное положение головой вверх. У контрольных 3-суточных крысят при наклоне плоскости 20° и 30° угол поворота головы и тела животных в среднем составлял $36.6 \pm 5.6^\circ$. Сходные результаты были получены и при тестировании 3-суточных экспериментальных крысят. Время поворота на 90° у контрольных животных и животных экспериментальной группы соответственно оставляло 47.3 ± 6.3 с и 40.3 ± 5.7 с, на 180° - 59.2 ± 4.8 с и 53.8 ± 7.5 с. Различия между контрольными и экспериментальными животными выявились при тестировании их на плоскости, угол наклона которой составлял 40° . В этом случае наблюдалось резкое (почти двукратное) увеличение угла поворота тела у контрольных 3-суточных крысят по сравнению с пробами, в которых угол наклона плоскости составлял 20° или 30° ($p < 0.01$). У экспериментальных крысят, помещенных на плоскость с наклоном 40° , угол поворота был таким же, как и в пробах при угле наклона плоскости 20° и 30° . По этому показателю (угол поворота при 40°) экспериментальные 3-суточные крысята достоверно отличались от контроля при $p < 0.05$. Время поворота на 90° у контрольных крыс и животных экспериментальной группы при тестировании их на плоскости с наклоном в 40° соответственно оставляло 33.9 ± 6.4 с и 41.7 ± 5.7 с, на 180° - 47.3 ± 5.8 с и 53.4 ± 7.5 с. По мере взросления угол поворота крысят при тестировании постепенно увеличивался при всех величинах наклона плоскости. У контрольных 7-суточных крысят, так же как и у контрольных 3-суточных, паттерны поведения на плоскости с углом 20° и 30° были идентичными, максимальные величины угла поворота наблюдались при наклоне плоскости 40° . Однако у контрольных 7-суточных крысят различия между результатами тестирования при наклоне $20-30^\circ$ и 40° были менее выраженными и не превышали 12%. У экспериментальных 7-суточных крысят этот показатель достигал 37%, т.е. характер их поведения был схожим с наблюдавшимся у контрольных животных в возрасте 3 суток. Важно также отметить, что в возрасте 7 суток различия между контрольными и экспериментальными крысятами в большей степени проявились в тестах, в которых наклон плоскости составлял 20° и 30° . Так, у 7-суточных экспериментальных крысят угол поворота при 20° , 30° и 40° был соответственно на 43%,

32% и 25% меньше, чем у контрольных животных. Таким образом, если в начале первой недели жизни различия между контрольными и экспериментальными животными в наибольшей степени выражены при более интенсивной стимуляции, то в конце этой недели – при менее интенсивной (наклон плоскости – 20-30°). Время поворота на 90° у 7-суточных контрольных крысят и животных экспериментальной группы при тестировании их на плоскости с наклоном в 20-30 ° соответственно составляло 28,7±5,3 с и 57,9 ±4,8 с, на 180 ° - 33,8±4,8 с и 58,3±5,4 с. При тестировании крысят на плоскости с наклоном в 40° были получены следующие результаты; время поворота на 90° соответственно составляло у контроля и животных экспериментальных групп 25,7±6,2 с и 53,3 ±5,7 с; время поворота на 180 °у контроля составляло - 30,5±6,4 с и у животных экспериментальных групп - 56,4±5,2 с. Достоверных различий в поведении контрольных и экспериментальных 9-суточных крысят в тесте «избегания наклонной плоскости (негативный геотропизм)» выявить не удалось.

Различий в поведении 3-суточных контрольных и экспериментальных крысят в тесте *«избегания края (обрыва) плоскости»* обнаружено не было. Контрольные 7-суточные крысята, помещенные на край приподнятой поверхности так, что голова и пальцы передних лап не имели на ней опоры, разворачивали голову и туловище в среднем на 105.4±11.6°, стремясь занять безопасное положение. Время поворота на 45°, 90° и 180° у них составляло соответственно 25.3±2.3, 41.4± 2.7 и 51.1±2.9 с. Экспериментальные 7-суточные крысята в этом тесте в среднем поворачивались на 58.2±6.8° (достоверность различий с контролем при $p < 0.001$), при этом время поворота на 45°, 90° и 180° было следующим – 32.8±1.9 , 50.4±2.4 и 57.7± 3.0 с. В возрасте 9 суток контрольные крысята поворачивались в среднем на 164.0±10.6°, затрачивая на поворот на 45°, 90° и 180°соответственно 9.0±1.0, 13.0±1.1 и 19.0±1.3 с. У 9-суточных экспериментальных крысят угол поворота составлял 138.0±9.1° (достоверность различий с контролем при $p < 0.05$). При этом экспериментальные 9-суточные крысята поворачивались значительно медленнее, чем контрольные животные того же возраста. Время поворота на 45°, 90° и 180° составляло у них, соответственно, 22.0±2.3, 27.0±2.7 и 40.0±3.8 с (достоверность различий с контролем для всех сравнений при $p < 0.05$). Таким образом, в тесте *«избегания края (обрыва) плоскости»* признаки дефектов развития проявлялись существенно дольше (более 9 дней), чем в тесте *«избегания наклонной плоскости (негативный геотропизм)»*.

Как видно из рисунка 17, изменения в развитии сенсомоторных реакций были обнаружены так же и у крыс, подвергавшихся воздействию дексаметазона в пренатальном периоде развития. В течение первых 9 суток жизни величина латентного периода

переворачивания на горизонтальной плоскости у контрольных крыс и животных экспериментальных групп значительно уменьшается. Кроме того, между 3-ми и 9-ми сутками жизни у контрольных крыс достоверно уменьшается время разворота в тестах избегания наклонной плоскости и избегания обрыва. Было обнаружено, что крысы, подвергшиеся воздействию дексаметазона, характеризуются отставанием формирования реакций избегания наклона и избегания обрыва. 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.

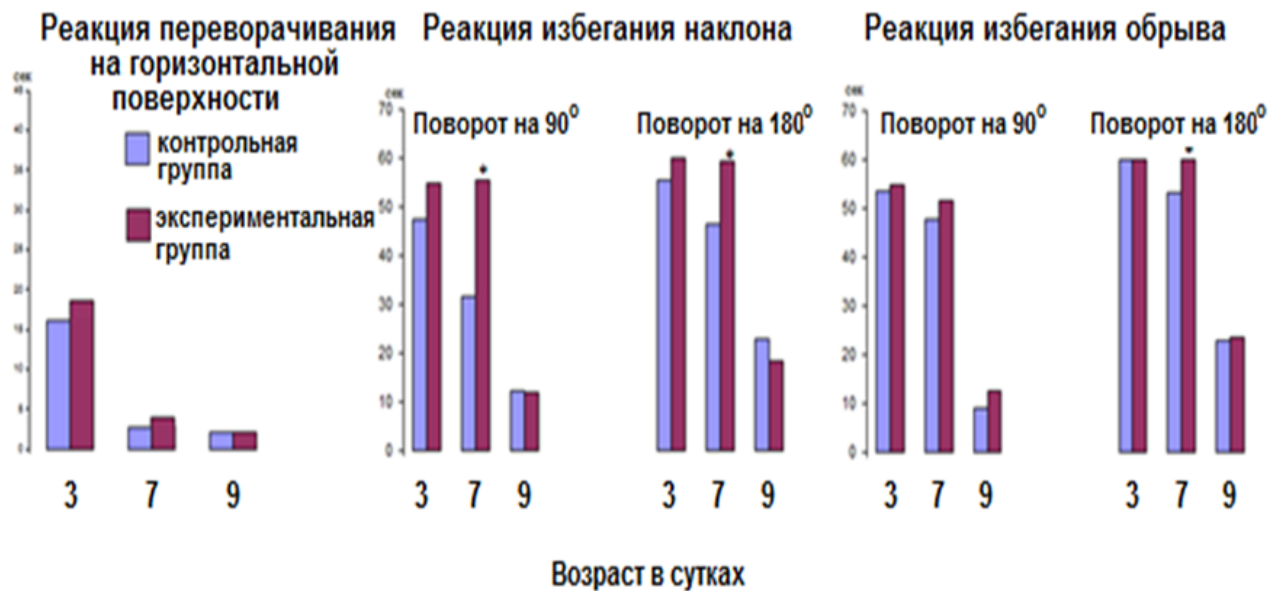


Рис. 17. Влияние введения дексаметазона (80 мг/кг) в течение третьей недели пренатального онтогенеза на показатели развития сенсомоторных реакций. * $p < 0.05$ достоверно отличаются от контроля.

Анализ полученных данных показал, что воздействие пренатальной гипоксии и дексаметазона вне зависимости от сроков ее предъявления приводит к изменению сенсомоторных характеристик животных. Причем эти изменения, как правило, проявляются не сразу после рождения, а только к 7-м суткам постнатального онтогенеза и сохраняются довольно длительное время.

3.2. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками в различные сроки беременности, на выработку рефлексов на запаховые раздражители у их потомков в раннем постнатальном онтогенезе.

Исследования последних лет представили большое количество доказательств о возможности выработки условных рефлексов на запаховые раздражители у незрелорождающихся 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 (интактным и подвергавшимся воздействию пренатальной гипоксии) в возрасте 7-12 суток предъявлялся обонятельный раздражитель (запах мяты). Известно, что у крысят в течение второй недели жизни формируется условная реакция на присутствующие в гнезде запахи в результате положительного подкрепления, связанного, например, с воздействием таких факторов, как тепло, груминг и кормление крысят самкой, а также контакт с сибсами (Leon M, Moltz H. 1971). В возрасте 13 суток тестировали реакцию крысят на предпочтение запаха мяты. Было показано, что 13-суточные контрольные крысята в основном отличались индифферентной реакцией на запах мяты – они проводили в отсеке с запахом мяты в среднем 47.7% времени тестирования. 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 18-20-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 увеличении массы тела было обнаружено у животных, испытавших воздействие дексаметазона на 14-16-е сутки гестации;

3) воздействие гипоксии или дексаметазона и 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 вызывает у крыс снижение способности к обучению уже в раннем постнатальном периоде; действие гипоксии на способность к обучению в раннем постнатальном периоде проявляется при ее экспозиции на 14-16-е сутки гестации.

3.3. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками в различные сроки беременности, на способность их взрослых потомков к выработке и воспроизведению условно-рефлекторной реакции пассивного избегания.

Было изучено влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками в различные сроки беременности, на способность их 1.5-месячного потомства к обучению на примере выработки и воспроизведения условно-рефлекторной реакции пассивного избегания (УРПИ). Опыты по формированию УРПИ поставлены на животных, рожденных интактными самками (контрольная группа) и самками, подвергавшимися воздействию тяжелой гипоксии на 11-13-е, 14-16-е или 17-19-е сутки беременности (экспериментальные группы). УРПИ вырабатывали в установке, состоящей из двух камер - большой (50x50 см) освещенной и маленькой темной (15x15 см) с электрифицированным решетчатым полом. К концу трехдневного периода привыкания, предшествовавшего обучению, у животных всех экспериментальных групп время, проведенное в темной камере, было практически одинаково и составляло в среднем у самцов 159.3 ± 9.7 с, а у самок 166.3 ± 2.3 с. На 4-й экспериментальный день животных помещали в темную камеру и воздействовали на них током. Тестирование на следующий день показало, что у самцов всех опытных групп время пребывания в темной камере достоверно сократилось. Важно также отметить, что по этому показателю достоверных различий между самцами различных групп 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% ($p < 0.01$).

Напротив, у самок, подвергавшихся гипоксии на 11-13-е и 17-19-е сутки гестации, 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 группе самок, испытавших воздействие гипоксии на 13-е сутки, время пребывания в темной камере снижалоь в среднем на 27% по сравнению с фоном. Сопоставление данных, полученных на самцах и самках, выявило также, что самки после воздействия гипоксии на 14-16-е сутки гестации по показателям обучения в тесте УРПИ достоверно превосходили самцов, подвергавшихся указанному воздействию в те же сроки ($p < 0.01$).

3.4.1. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на уровень двигательной активности в тесте «открытого поля» их взрослых потомков.

Была проведена серия опытов, задача которых состояла в том, чтобы выявить влияние пренатальной гипоксии на уровень двигательной активности 90-суточных крыс в тесте «открытого поля». Наиболее выраженные изменения в поведении были выявлены лишь у самцов, перенесших гипоксию на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза (рис. 18). Для них был характерен повышенный уровень локомоторной активности в тесте «открытого поля», которую оценивали по числу пересеченных квадратов. У крыс, подвергавшихся действию гипоксии на 11-13-е и на 17-19-е сутки пренатального онтогенеза, отличий двигательной активности в тесте «открытого поля» по сравнению с контролем не обнаружено. Следует отметить, что по остальным показателям поведения, которые фиксировали в «открытом поле» (вертикальная двигательная активность – число стоек, длительность реакции груминга, время неподвижности – замирание), отличий у экспериментальных животных по сравнению с контролем не обнаружено.

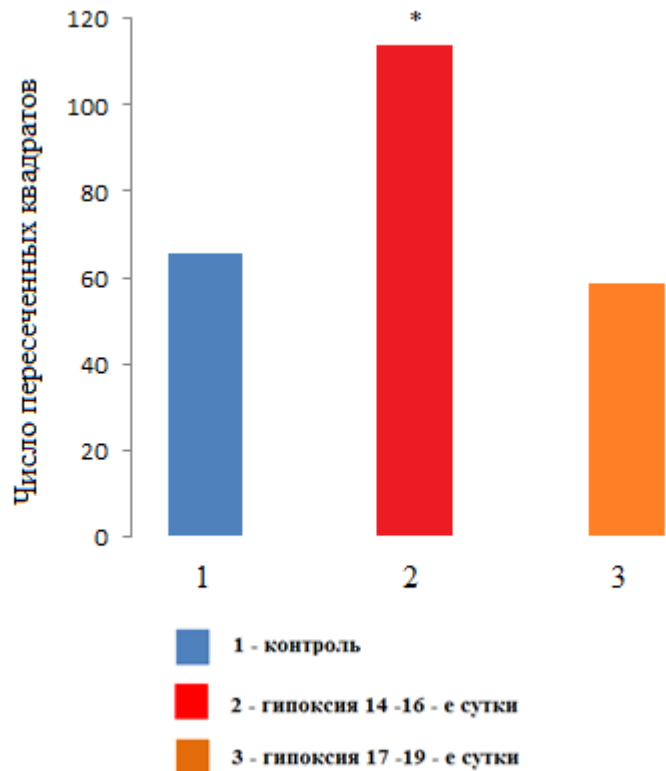


Рис. 18. Уровень двигательной активности самцов крыс, пренесших гипоксическое воздействие на 14-16-е и 17-19е сутки пренатального онтогенеза в тесте «открытого поля». * $p < 0,05$ достоверно отличаются от контроля.

3.4.2. Влияние введения дексаметазона в различные сроки пренатального онтогенеза на уровень двигательной активности в тесте «открытого поля» взрослых крыс.

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% , $p < 0,001$) (Рис. 19). Отличия от контроля сохранялись в течение всех дней тестирования. Введение дексаметазона на 17-19-е сутки пренатального онтогенеза не приносило к изменению поведенческих реакций в тесте «открытого поля». Так же, как и при воздействии пренатальной гипоксии, введение дексаметазона на 14-16-е и 17-19е сутки пренатального онтогенеза не влияло на вертикальную двигательную активность, длительность груминга и замираний у взрослых животных

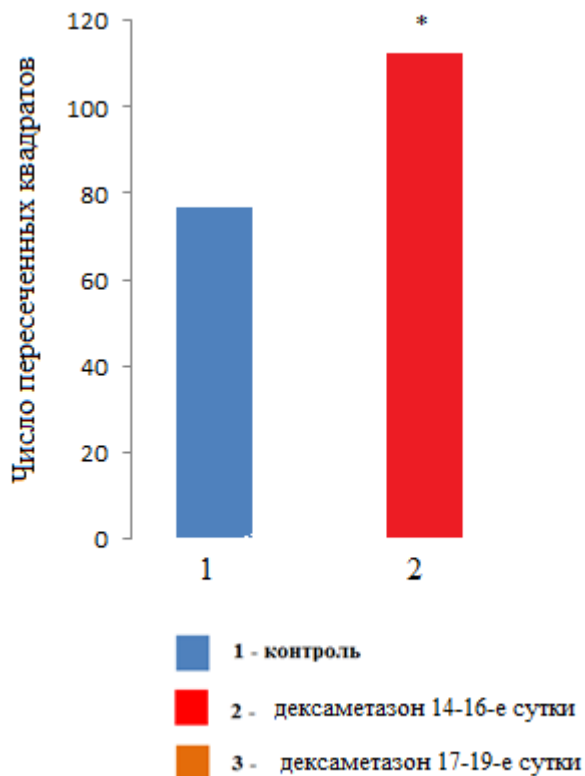


Рис. 19. Влияние введения дексаметазона (80 мг/кг) на 14-16-е и 17-19е сутки пренатального онтогенеза на уровень двигательной активности самцов крыс.

* $p < 0,05$ достоверно отличаются от контроля.

3.5.1. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на поведение их взрослых потомков в приподнятом крестообразном лабиринте.

Приподнятый крестообразный лабиринт наиболее широко применяемый тест при изучении уровня тревожности у грызунов. Тревожность оценивается по времени пребывания в затемненных и освещенных рукавах лабиринта и числу выглядываний и свешиваний с открытых рукавов, числу переходов между рукавами.

У самцов крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии на 14-16-е или на 17-19-е сутки в пренатальном периоде, время пребывания в открытых рукавах лабиринта достоверно не отличалось от такового у животных контрольной группы (рис. 20). Самцы двух экспериментальных групп не отличались от контроля и по таким показателем, как время, проведенное в закрытом и открытом рукавах лабиринта, и число свешиваний. Четвертый показатель – число переходов через центральную платформу лабиринта, не

является основным показателем теста, но может служить для оценки общей двигательной активности животных. Было обнаружено, что последствием воздействия гипоксии на 14-16-е сутки в пренатальном периоде является увеличение числа «переходов» в тесте приподнятого лабиринта. Это подтверждает результаты, полученные в тесте «открытое поле», свидетельствующие о том, что для данной группы характерен повышенный уровень двигательной активности. По остальным показателям поведение взрослых животных, подвергавшихся действию гипоксии в пренатальном онтогенезе, не отличалось от контрольной группы.

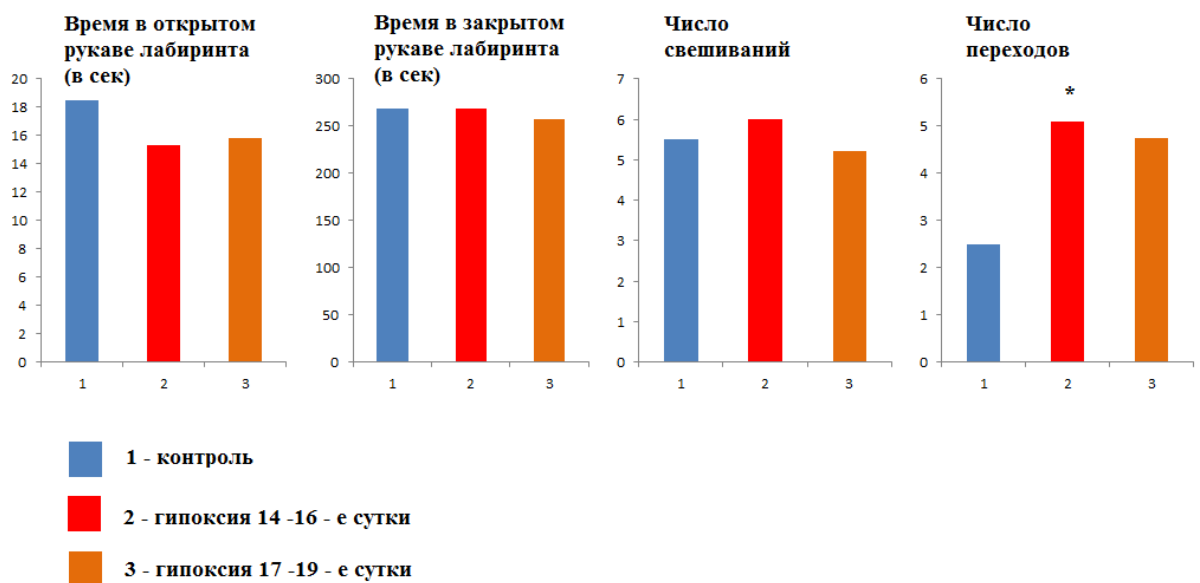


Рис. 20. Изменения поведения самцов крыс, подвергавшихся действию гипоксии на 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального онтогенеза, в приподнятом крестообразном лабиринте.

* $p < 0,05$ достоверно отличаются от контроля.

3.5.2. Влияние введения дексаметазона в пренатальном онтогенезе, на поведение взрослых крыс в приподнятом крестообразном лабиринте.

Для сравнения действия гипоксии и стрессовых гормонов в те же сроки пренатального онтогенеза была проведена серия опытов по влиянию пренатального введения синтетического гормона дексаметазона.

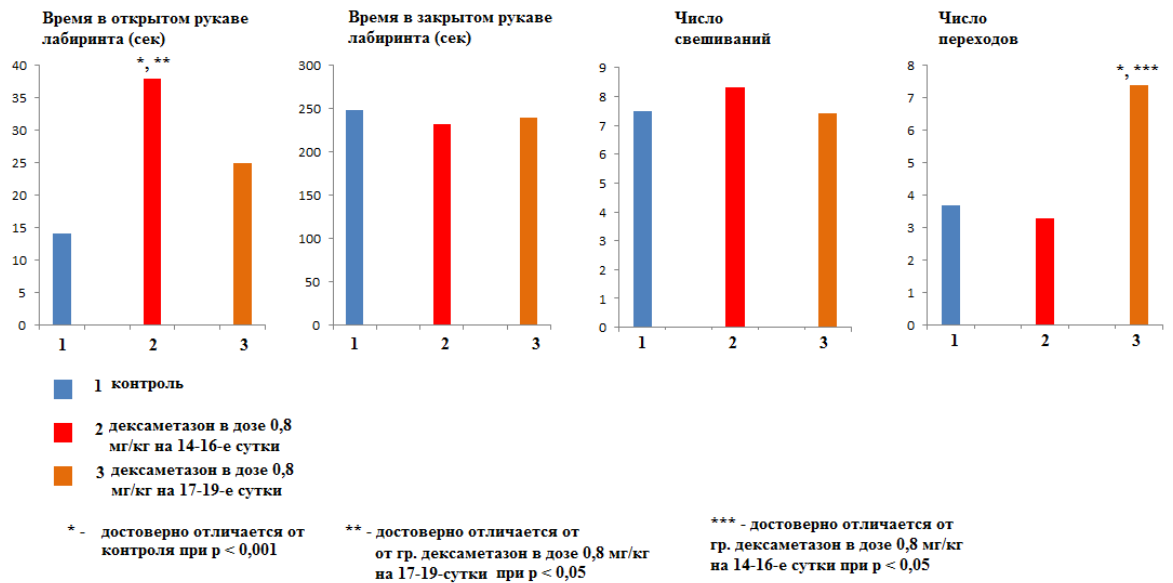


Рис. 21. Влияние введения дексаметазона (80 мг/кг) на 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального онтогенеза на изменения поведения самцов крыс в приподнятом крестообразном лабиринте.

* $p < 0,05$ достоверно отличаются от контроля.

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 (Рис. 21). Эти данные позволяют предполагать, что введение дексаметазона беременным самкам в указанные сроки может вызывать снижение уровня тревожности у их взрослых потомков. Однако этот вывод не столь однозначен, так как число свешиваний в группе крыс, испытавших воздействие дексаметазона на 14-16-е сутки в пренатальном периоде достоверно не изменилось по сравнению с контролем.

Введение дексаметазона беременным крысам на 17-19-е сутки беременности, в двое повышало число переходов через центральную платформу лабиринта, что может свидетельствовать о повышенном уровне двигательной активности у животных данной группы. Однако, результат, полученный по данному показателю, не согласуется с результатами тестирования крыс этой группы в тесте «открытое поле».

3.6.1. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками в различные сроки беременности, на поведение их взрослых потомков в лабиринте Морриса

Одна из задач проводимых нами исследований состояла в изучении влияния гипоксии, перенесенной самками в различные сроки беременности, на способность их 3-месячного потомства к формированию навыка пространственного распознавания в водном лабиринте Морриса. Для выяснения роли гипотермии, как стрессового фактора, влияющего на способность к обучению данного навыка животными контрольных и экспериментальных групп, их тестирование осуществлялось в условиях двух температурных режимов – при низкой и относительно высокой, «комфортной» температуре воды.

Эксперимент 1. При тестировании контрольных и экспериментальных 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. 22). 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. 22А). 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.

В отличие от самцов, 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 в первые 4 дня тестирования, выявлено не было (рис. 22Б).

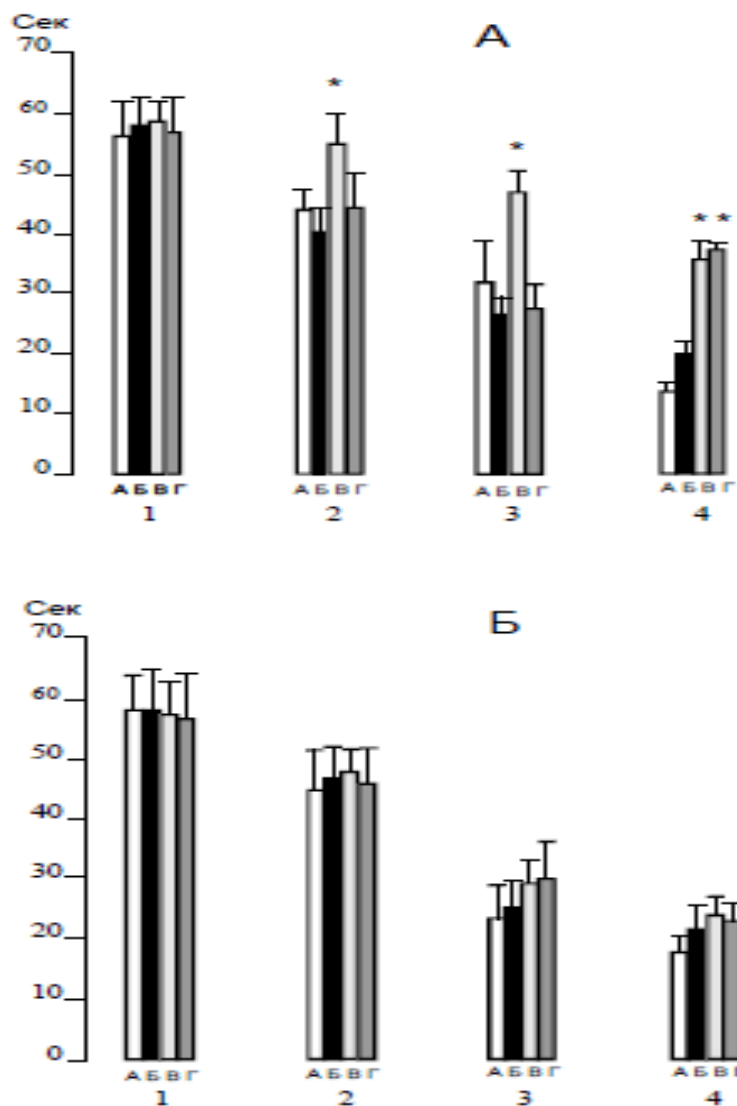


Рис. 22. Динамика обучения в водном лабиринте Морриса самцов (А) и самок (Б) крыс в эксперименте 1.

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 по сравнению с контролем $p < 0.05$

Эксперимент 2. Результаты тестирования самок и самцов экспериментальных и контрольных групп при температуре воды 16-17°C представлены на рис. 23. В этой группе обнаруживается практически полное совпадение динамики латентного периода

достижения платформы у контрольных, и у экспериментальных самцов, испытывавших воздействие гипоксии на 11-13-е сутки периода пренатального развития (рис. 23А). У самцов, испытывавших 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 ($p < 0.05$). У самцов, подвергавшихся воздействию гипоксии на 17-19-е сутки пренатального 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, подвергавшимся воздействию гипоксии, выявлено не было (рис. 23Б).

Выявляемые изменения зависят от срока воздействия гипоксии. В этих опытах была обнаружена еще одна важная особенность: направленность вызываемых пренатальной гипоксией изменений характера обучения по-разному проявляются в зависимости от условий тестирования. В более жестких условиях (в наших опытах при температуре воды 16-17°C), пренатальное гипоксическое воздействие проявляется в улучшении показателей обучения, в более комфортных условиях (при температуре воды 23-24°C) – ухудшении.

Таким образом, показано, что при обучении крыс в водном лабиринте Морриса долгосрочные последствия пренатальной гипоксии обнаруживаются лишь у самцов. Выявляемые нарушения наиболее выражены у животных, испытывавших воздействие гипоксии на 14-16-е сутки периода пренатального развития. Важным обстоятельством является также и то, что направленность выявляемых изменений зависит от условий тестирования. В жестких условиях (в наших опытах при температуре воды 16-17°C), пренатальное гипоксическое воздействие проявляется в улучшении показателей обучения, в менее жестких (при температуре воды 23-24°C) – ухудшении.

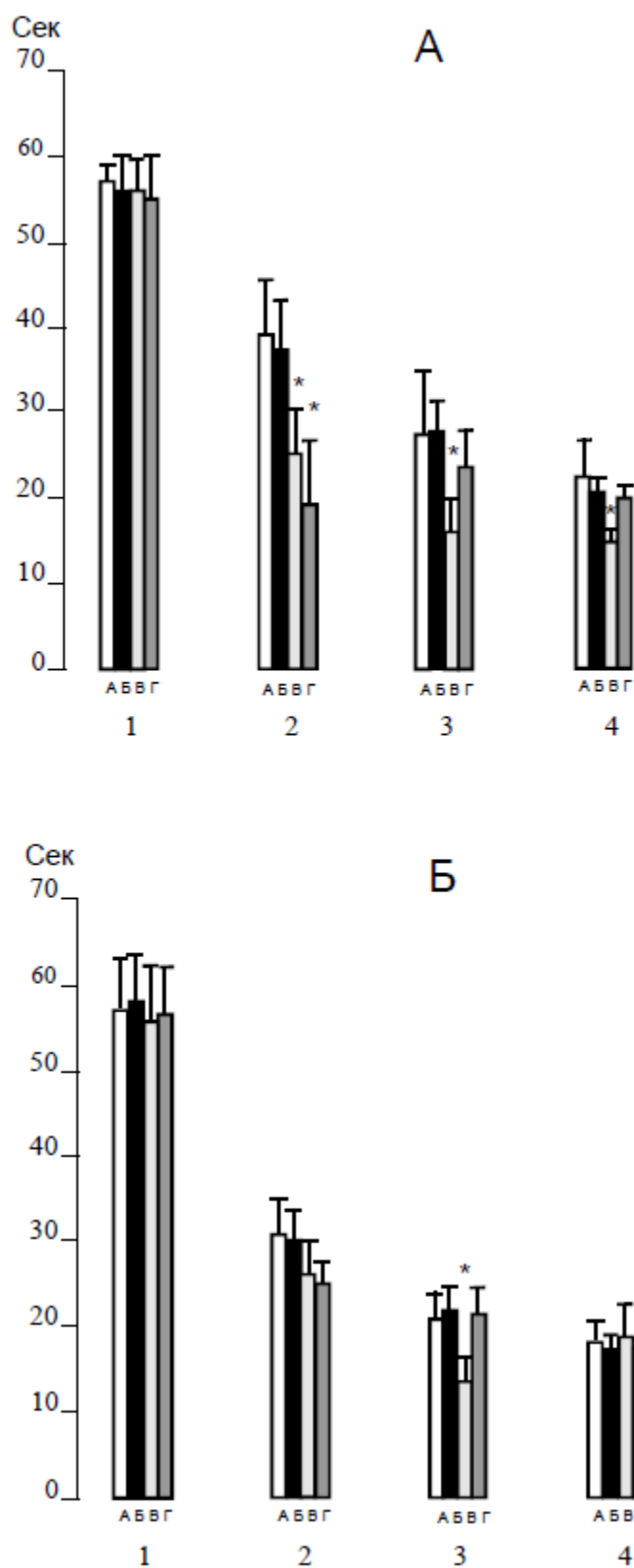


Рис. 23. Динамика обучения в водном лабиринте Морриса самцов (А) и самок (Б) крыс в эксперименте 2.

Обозначения как на рис. 22.

3.6.2. Влияние введения дексаметазона самкам крыс в различные сроки беременности, на поведение их взрослых потомков в лабиринте Морриса

Исследовалось влияние введения дексаметазона самкам на 14-16-е и 17-19-е сутки беременности на поведение их потомства самцов в водном лабиринте Морриса. Было установлено, что нарушение способности к обучению в лабиринте Морриса обнаруживаются у самцов крыс, матери которых получали инъекции дексаметазона на 14-16-е сутки беременности (рис. 24). Инъекции дексаметазона самкам на 17-19-е сутки практически не влияли на способность к обучению их потомства в данном тесте.

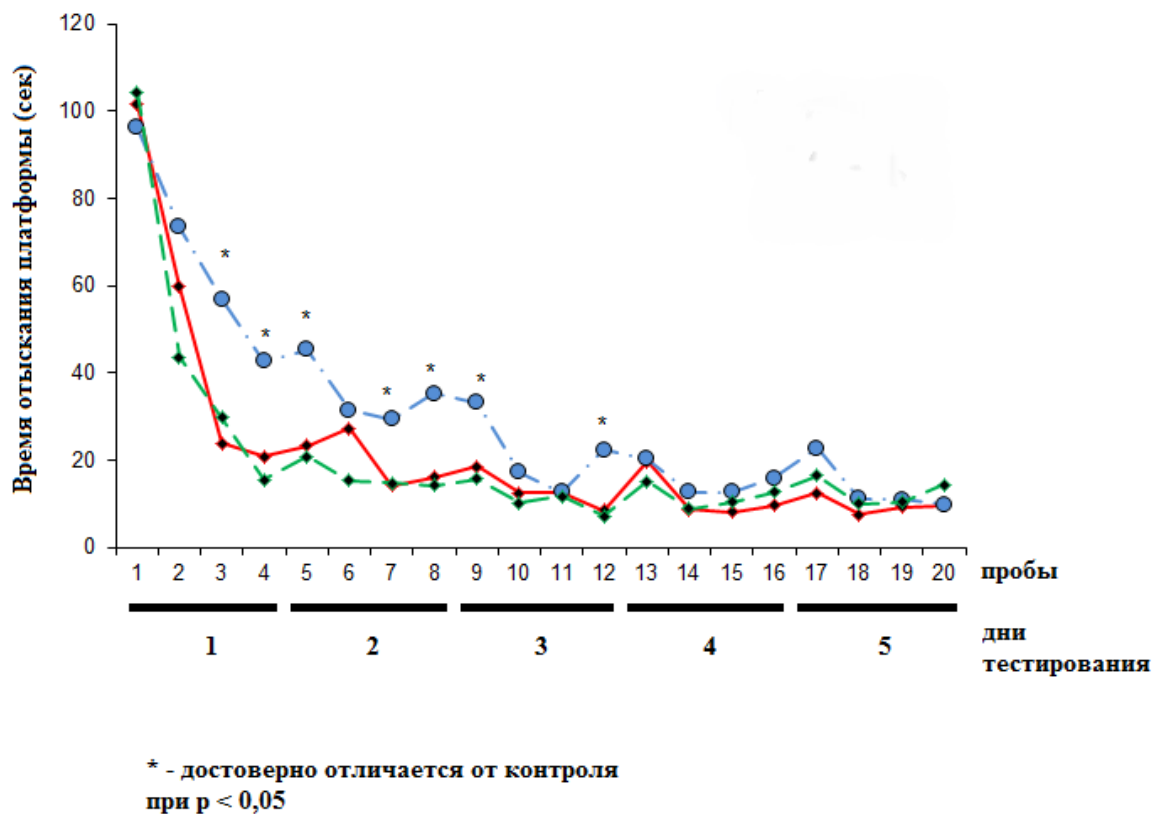


Рис. 24. Влияние введения дексаметазона (0,8 мг/кг) самкам крыс на 14-16-е (синие линии) и 17-19-е (зеленые линии) сутки беременности на обучение их взрослых потомков-самцов в водном лабиринте Морриса по сравнению с контролем (красные линии)

* - достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$).

3.7.1. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на поведение их потомков в лабиринте Морриса (тестирование по протоколу «рабочей памяти»).

Была проведена серия опытов, в которой использовали водный лабиринт Морриса для оценки рабочей памяти у крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии в различные сроки пренатального онтогенеза. Исследовали поведение взрослых самцов крыс линии Вистар. Животные были рождены интактными самками и самками, испытавшими воздействие тяжелой гипобарической гипоксии на 14-16-е и 17-19-е сутки беременности. Тестирование животных проводилось в водном лабиринте Морриса по протоколу, разработанному для выявления специфических нарушений рабочей памяти.

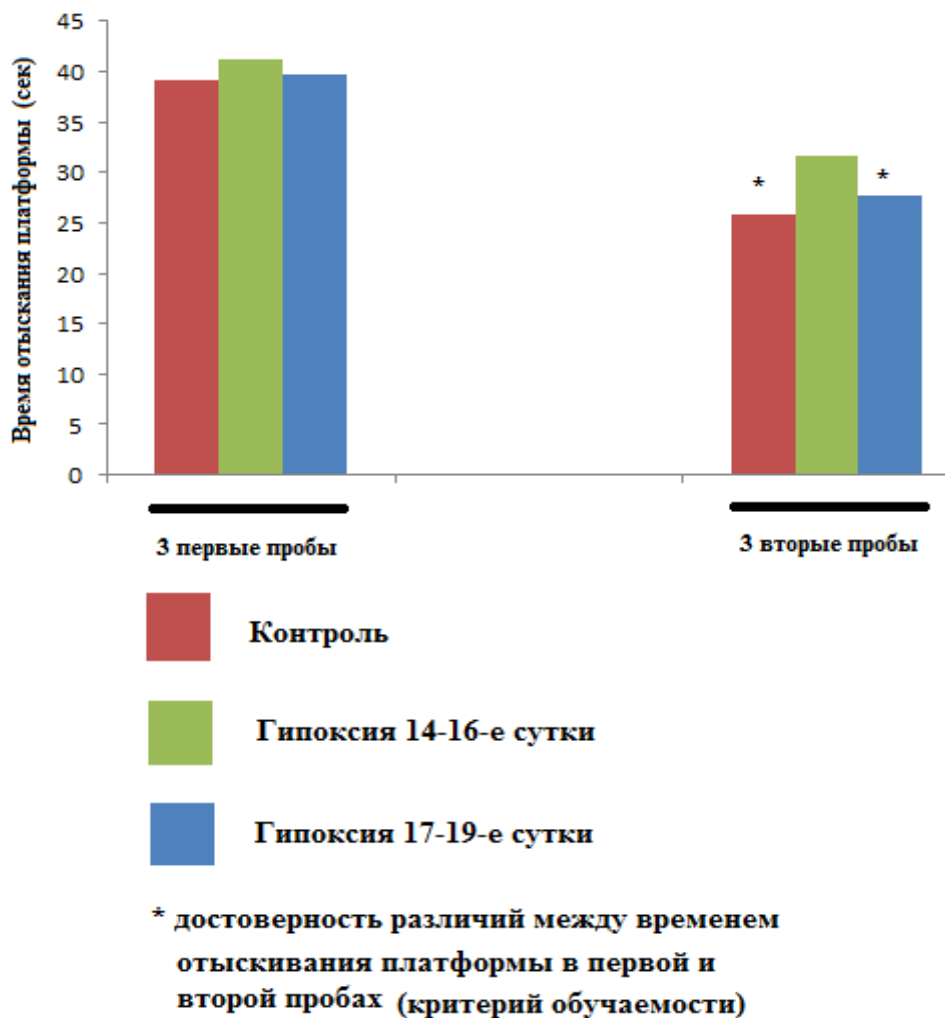


Рис. 25. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками во время беременности, на обучение их потомства в водном лабиринте Морриса. (* достоверные различия между первой и второй робой $p < 0,05$).

Анализ динамики формирования пространственной дифференцировки в водном лабиринте Морриса у самцов контрольной и экспериментальных групп выявил достоверные различия по величине латентного периода между первой и второй пробами у контрольных самцов, и самцов, подвергавшихся воздействию пренатальной гипоксии на 17-19-е сутки гестации (Рис. 25). В группе животных, подвергшихся воздействию гипоксии на 14-16-е сутки пренатального 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.

3.7.2. Влияние введения дексаметазона самкам крыс в различные сроки беременности, на поведение их взрослого потомства в лабиринте Морриса (тестирование по протоколу «рабочей памяти»).

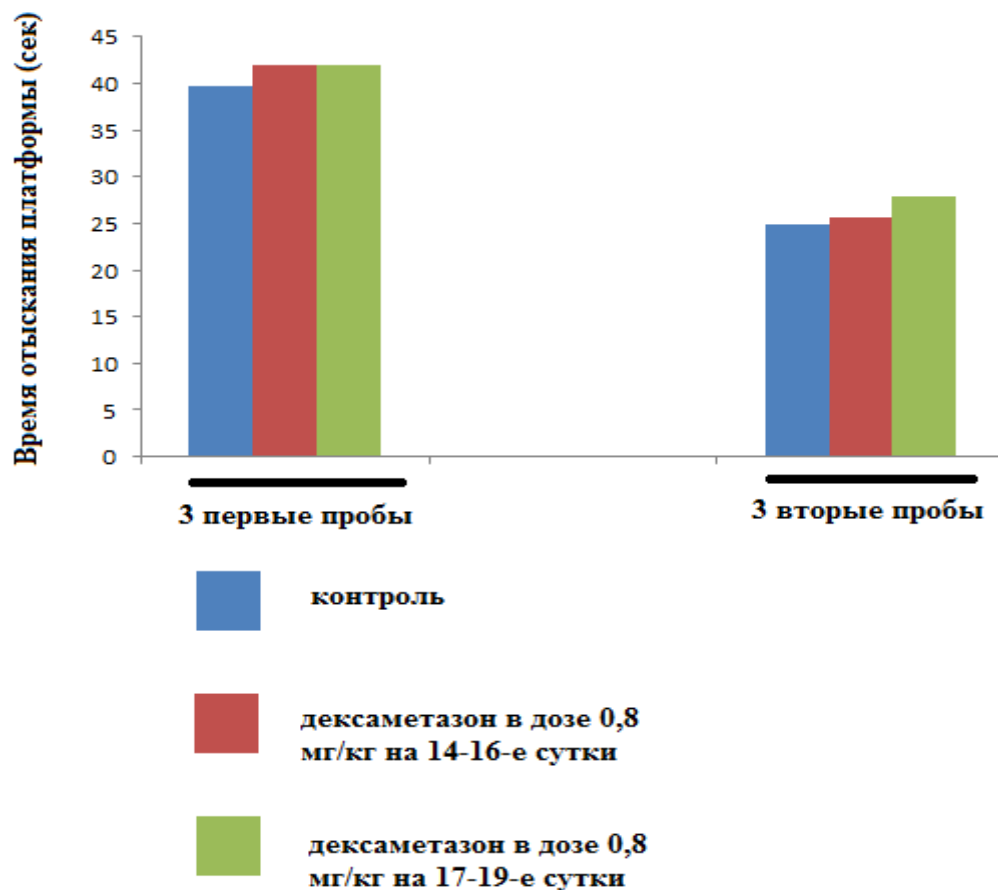


Рис. 26. Влияние дексаметазона, введенного самкам крыс во время беременности, на обучение их потомства в лабиринте Морриса.

Аналогичная серия экспериментов была проведена на крысах, которым вводили синтетический гормон дексаметазон на 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального периода развития.

У самцов крыс, являющихся потомками самок, получавших инъекции дексаметазона на 14-16-е или 17-19-е сутки беременности, нарушений рабочей памяти в тесте «водный лабиринт Морриса» выявлено не было. Так, во время тестирования крысы контрольной группы и животных обеих экспериментальных групп затрачивали на поиски платформы для избегания во второй пробе достоверно меньше времени, чем в первой пробе (p для всех проб <0.05) (Рис. 26). Таким образом введение дексаметазона не вызывало нарушений рабочей памяти.

3.8. Влияние воздействия тяжелой гипоксии и введения дексаметазона в различные сроки пренатального онтогенеза на формирование и динамику угашения обстановочного оборонительного рефлекса и оборонительного условного рефлекса на звук у взрослых самцов крыс.

В этой серии экспериментов исследовали последствия воздействия гипоксии и введения дексаметазона в пренатальном периоде развития на процесс обучения условно рефлекторной реакции пассивного избегания. 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. Испытуемых для каждого исследования разделили на пять групп. Первую экспериментальную группу составили контрольные животные. Во вторую и третью группу вошло потомство самок, подвергшихся воздействию гипоксии на 14-16-е или 17-19-е сутки беременности, в четвертую и пятую – потомство самок, получавших инъекции дексаметазона (0.8 мг/кг) на 14-16-е или 17-19-е сутки гестации.

При выработке обстановочного оборонительного условного рефлекса и оборонительного условного рефлекса было обнаружено, что введение дексаметазона беременным самкам в дозе 0,8 мг/кг на 17-19-е сутки беременности вызывает у их потомков достоверное увеличение времени замирания по сравнению с контролем (Рис. 27). 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.

Достоверных изменений времени замирания при выработке обстановочного оборонительного условного рефлекса и оборонительного условного рефлекса у крыс, подвергшихся воздействию гипоксии в пренатальном периоде, не было выявлено.

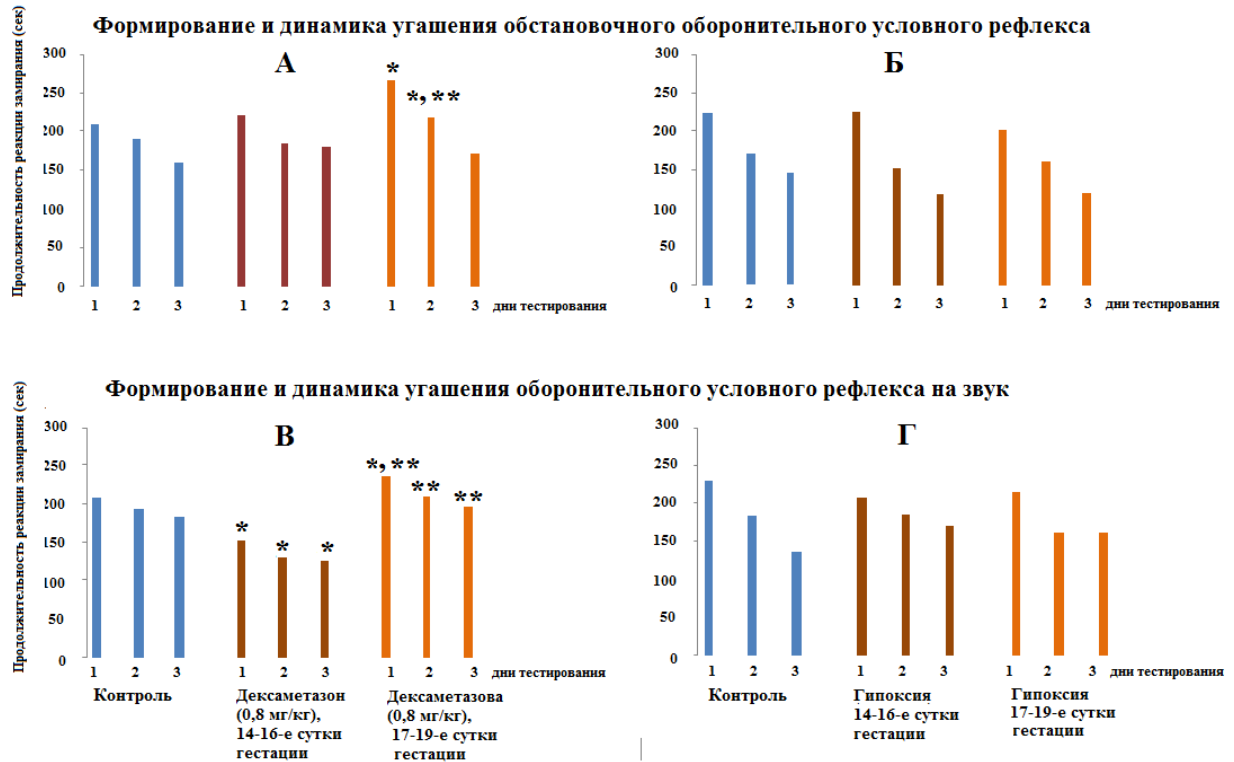


Рис. 27. Влияние введения дексаметазона (А, В) и гипоксии (Б, Г) в пренатальном периоде на формирование и динамику угашения обстановочного оборонительного рефлекса (А, Б) и оборонительного условного рефлекса на звук (В, Г) у взрослых самцов крыс.

*-достоверно отличается от контроля при $p < 0,05$

** - достоверно отличается от показателей группы, подвергавшихся воздействию дексаметазона на 14-16-е сутки гестации при $p < 0,05$

В отличие от гипоксического воздействия пренатальное введение дексаметазона вызывает изменения показателей тревожности и выраженности пассивно-оборонительных реакций у взрослых самцов крыс. Характер этих изменений зависит от сроков воздействия дексаметазона в пренатальном периоде. При введении дексаметазона в начале третьей недели гестации обнаруживается тенденция к снижению уровня тревожности и выраженности пассивно-оборонительных реакций. Противоположная тенденция обнаруживается при введении дексаметазона в конце третьей недели гестации.

3.9. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на функцию гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС).

Стрессовые воздействия различной природы во время беременности вызывают ответную реакцию, как в организме матери, так и в организме плода. При воздействии стрессовых факторов первой активизируется гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальная система. Участие ГГАС в реализации стрессовой реакции опосредуется глюкокортикоидными гормонами, которые вырабатываются надпочечниками матери, проходят через плаценту, и из периферической системы плодово-плацентарной циркуляции легко проникают в организм и структуры мозга плода. Гормоны ГГАС оказывают непосредственное влияние на эмбриогенез, нормальное развитие и рост плода, принимают участие в формировании и созревании всех органов и систем организма. В настоящее время особое внимание уделяется проблеме влияния ГГАС на формирование центральной нервной системы, и ее значению в механизмах развития эмоциональных и поведенческих расстройств, причиной которых является пренатальный стресс. Предполагается, что роль ГГАС в формировании ЦНС проявляется по-разному на разных стадиях развития эмбриона. Были проведены исследования параметров функции гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы у потомков крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии на 14-16- или 17-19-е сутки беременности.

3.9.1. Характеристика стрессореактивности ГГАС у взрослых крыс, перенесших воздействие тяжелой гипоксии в разные сроки пренатального периода.

Исследовали стресс-реактивность 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 антисывороток. 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.

Пренатальная гипоксия не приводила к достоверному снижению базального уровня кортикостерона ни у самцов, ни у самок (рис. 28 и 29). В условиях иммобилизации у

самцов, перенесших гипоксию в пренатальном онтогенезе, не было выявлено достоверных изменений амплитуды стрессового выброса кортикостерона по сравнению с контролем (рис. 28). Однако было обнаружено, что пренатальная гипоксия значительно модифицирует реактивность ГГАС на иммобилизационный стресс у самок (рис. 29). 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. Однако в контрольной группе наблюдалось снижение уровня кортикостерона к 24-часовому сроку. У крыс, перенесших гипоксию на 14-16-е сутки через 24 часа после начала иммобилизации уровень кортикостерона был еще ниже, чем у контрольных животных. В группе самок, являющихся потомками крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии на 17-19-сутки беременности, при иммобилизации наблюдалось резкая активация ГГАС, со значительным подъемом уровня кортикостерона уже к 20 мин. В дальнейшем, в этой

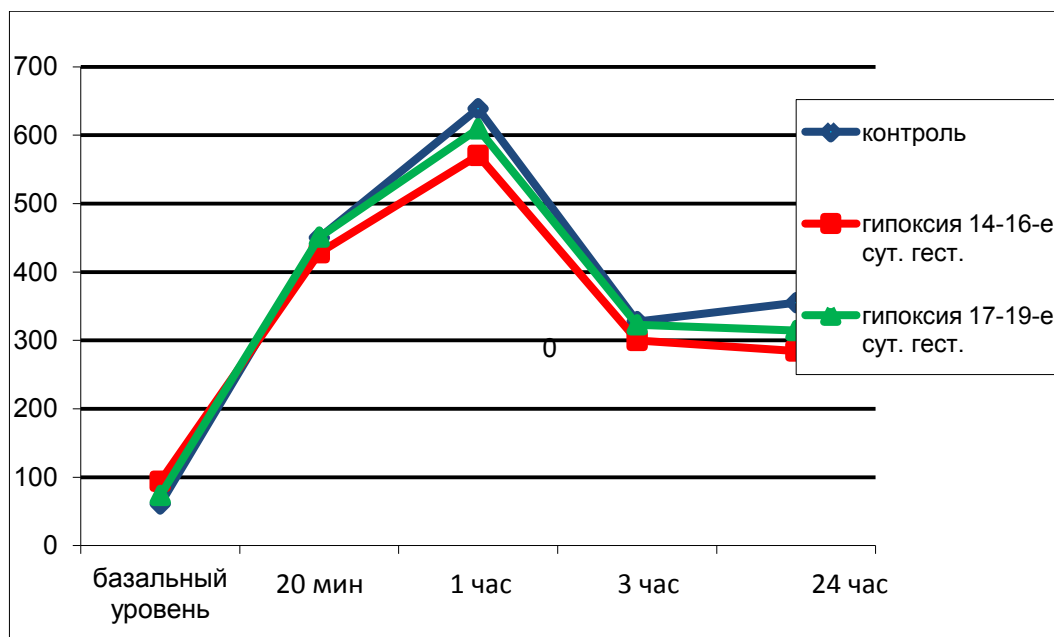


Рис. 28. Уровень кортикостерона в крови (нано моль/л) взрослых крыс-самцов, подвергавшиеся воздействию гипоксии соответственно на 14-16- и 17-20-е сутки гестации, до и после иммобилизационного стресса

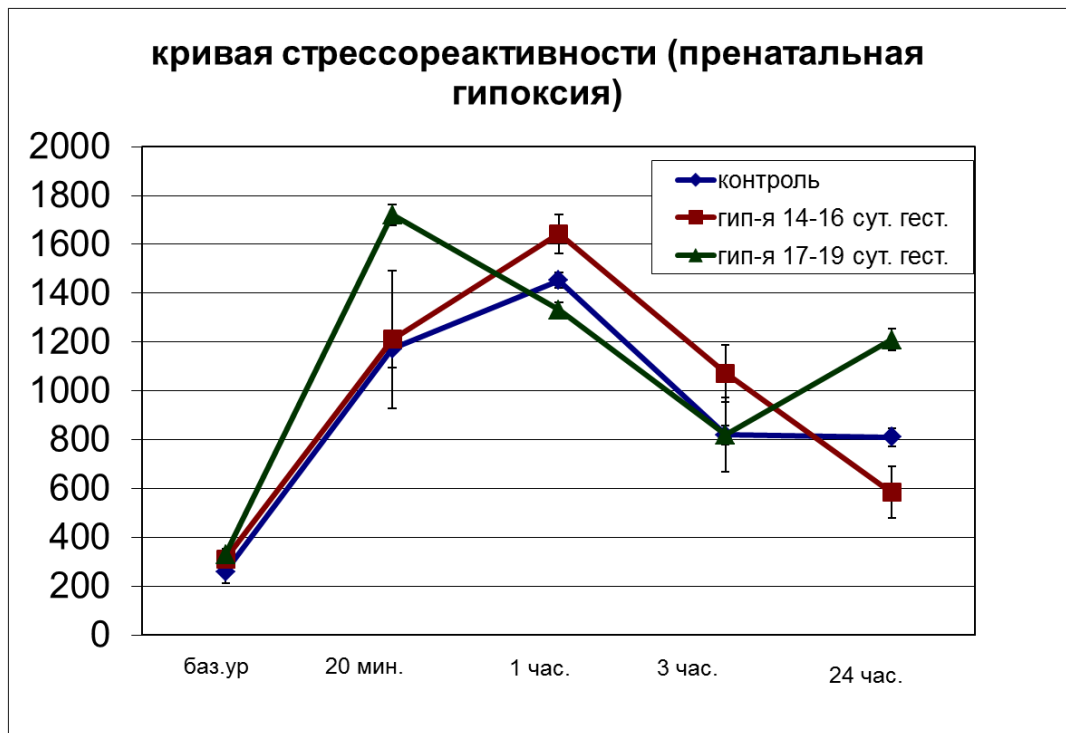


Рис. 29. Уровень кортикостерона в крови (наномоль/л) взрослых крыс-самок, подвергавшиеся воздействию гипоксии соответственно на 14-16- и 17-20-е сутки гестации, до и после иммобилизационного стресса.

группе, так же как и в контрольной, наблюдалось снижение уровня кортикостерона, но через сутки уровень кортикостерона в крови крыс этой группы значительно превышал контрольный.

Таким образом, пренатальная гипоксия, усиливает стрессореактивность самок, но не самцов. При этом гипоксия, пережитая самками крыс на 14-16-е сутки гестации не нарушает запуск механизмов регуляции по принципу отрицательной обратной связи, в то время как гипоксия на 17-19-е сутки гестации модифицирует эти механизмы.

3.9.2.1. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на экспрессию глюко- и минералокортикоидных рецепторов в неокортексе и гиппокампе крыс их взрослых потомков.

Пренатальный стресс может быть причиной стойкого повышения уровня глюкокортикоидов у плода, следствием чего являются повреждения или нарушения развития мозга. Физиологическое действие гормонов стресса проявляется через их взаимодействие с их рецептором. Поэтому при изучении механизмов длительного модифицирующего влияния стресса на развитие мозга первостепенное значение имеет

оценка их родства с рецепторами или количества функционально активных рецепторов в определенных структурах мозга. Стероидные гормоны оказывают эффект, находясь внутри клетки, где они связываются с минералокортикоидными (МР) и глюкокортикоидными (ГР) рецепторами, которые, в свою очередь, являются лиганд-зависимыми транскрипционными факторами (Meaney, Szyf et al. 2007; Grace et al., 2011; Almeida et al., 2000; De Kloet E.R. et al, 1998; Rogalska J. 2010).

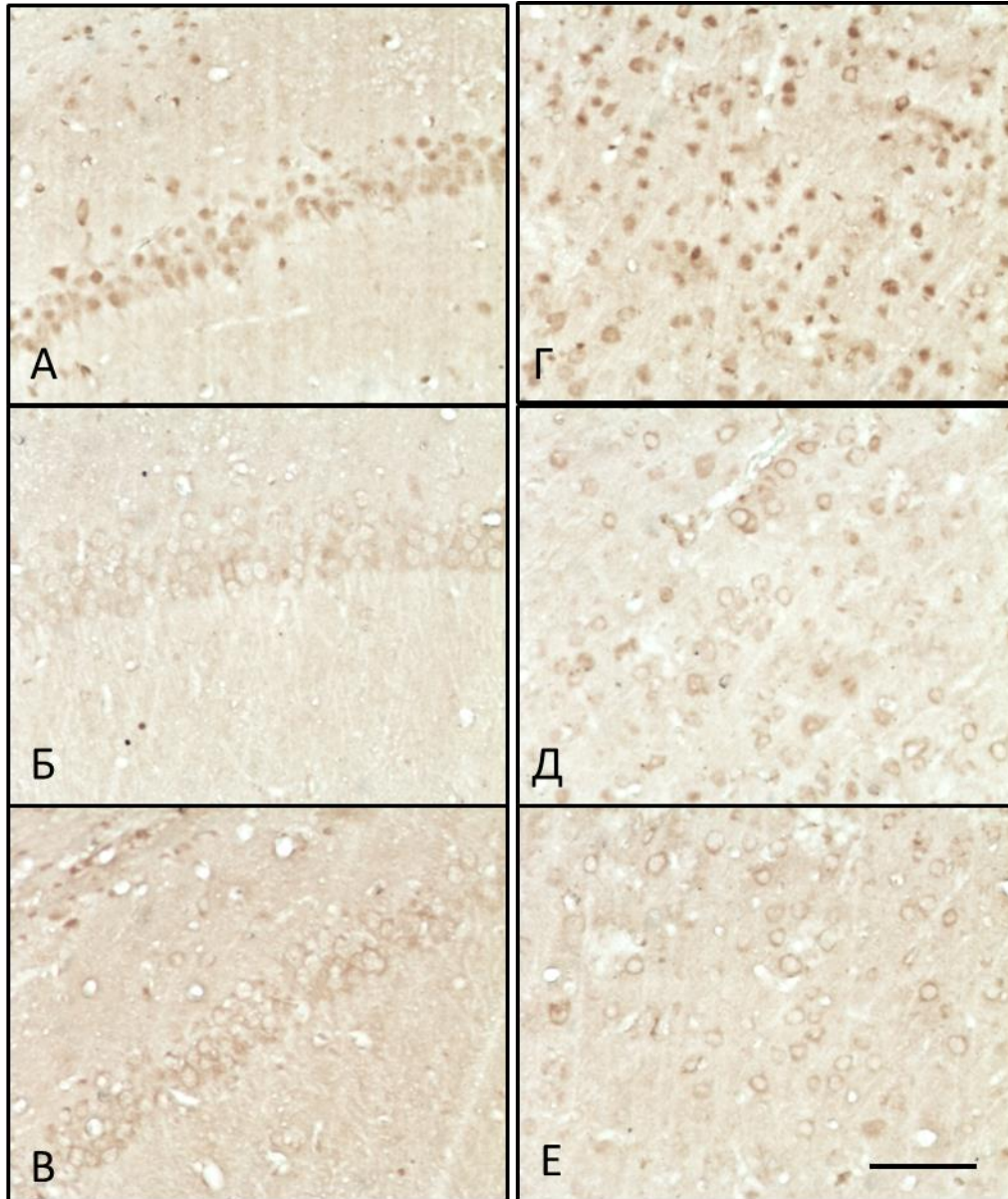


Рис. 30. Репрезентативные микрофотографии изменения иммунореактивности глюкокортикоидных рецепторов в области СА1 гиппокампа (А, Б, В) и неокортексе (5-й слой) (Г, Д, Е) взрослых контрольных крыс и крыс, подвергавшихся гипоксии на 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального онтогенеза. Маркер, 100 мкм.

А, Г – контроль;

Б, Д – гипоксия на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза;

В, Е – гипоксия на 17-19-е сутки пренатального онтогенеза.

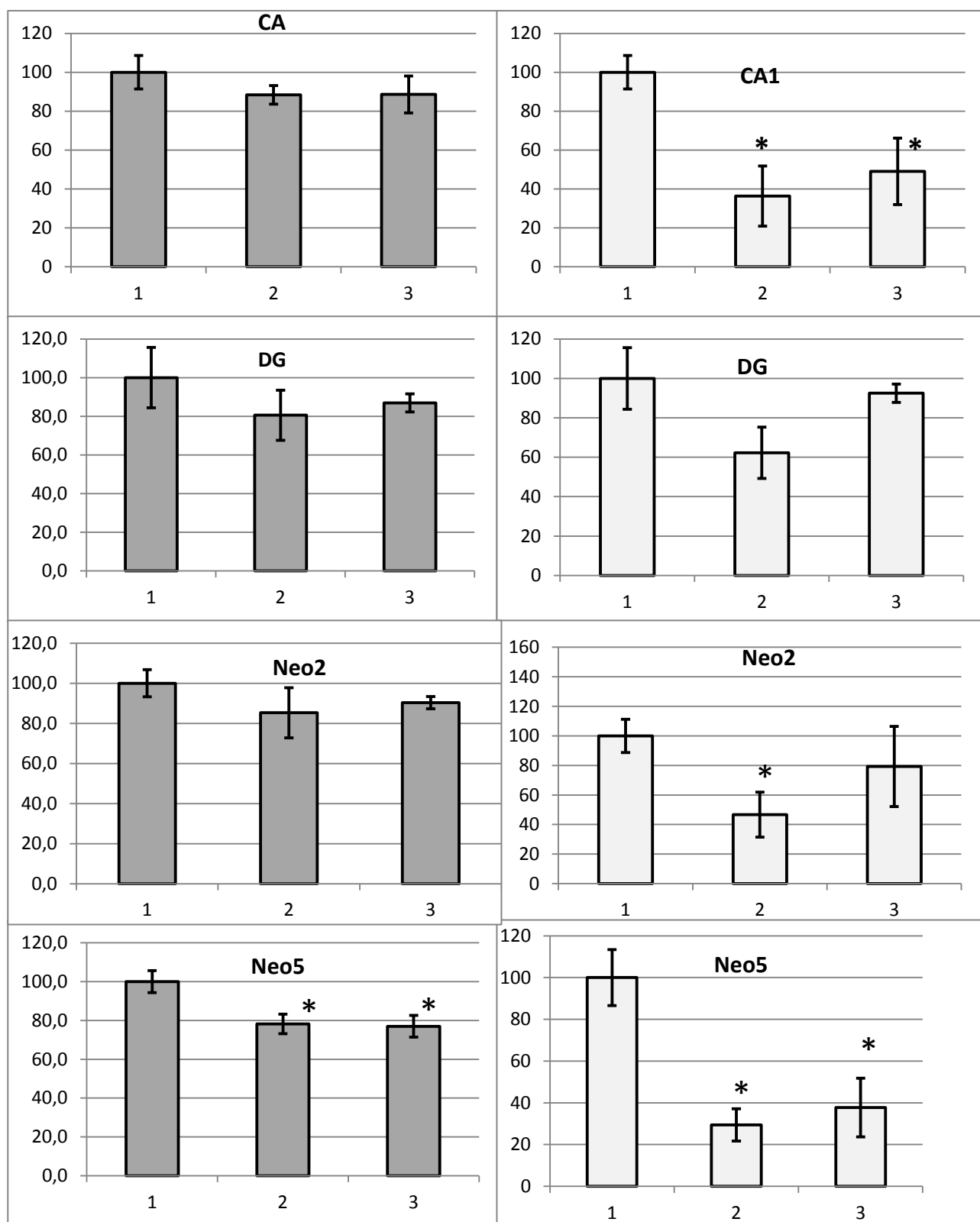


Рис. 31. Изменения экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в области CA1 и зубчатой извилине (DG) гиппокампа, 2-м и 5-м слоях неокортекса (Neo2 и Neo5) взрослых крыс самцов, подвергавшихся воздействию тяжелой гипоксии на 14-16-е (2) и 17-19-е (3) сутки пренатального развития по сравнению с контрольными животными (1) в процентах.

Темно серые столбики – общее количество иммунопозитивных клеток; Светлые столбики – количество интенсивно иммунопозитивных клеток; (* достоверные отличия от контроля – $p < 0,05$)

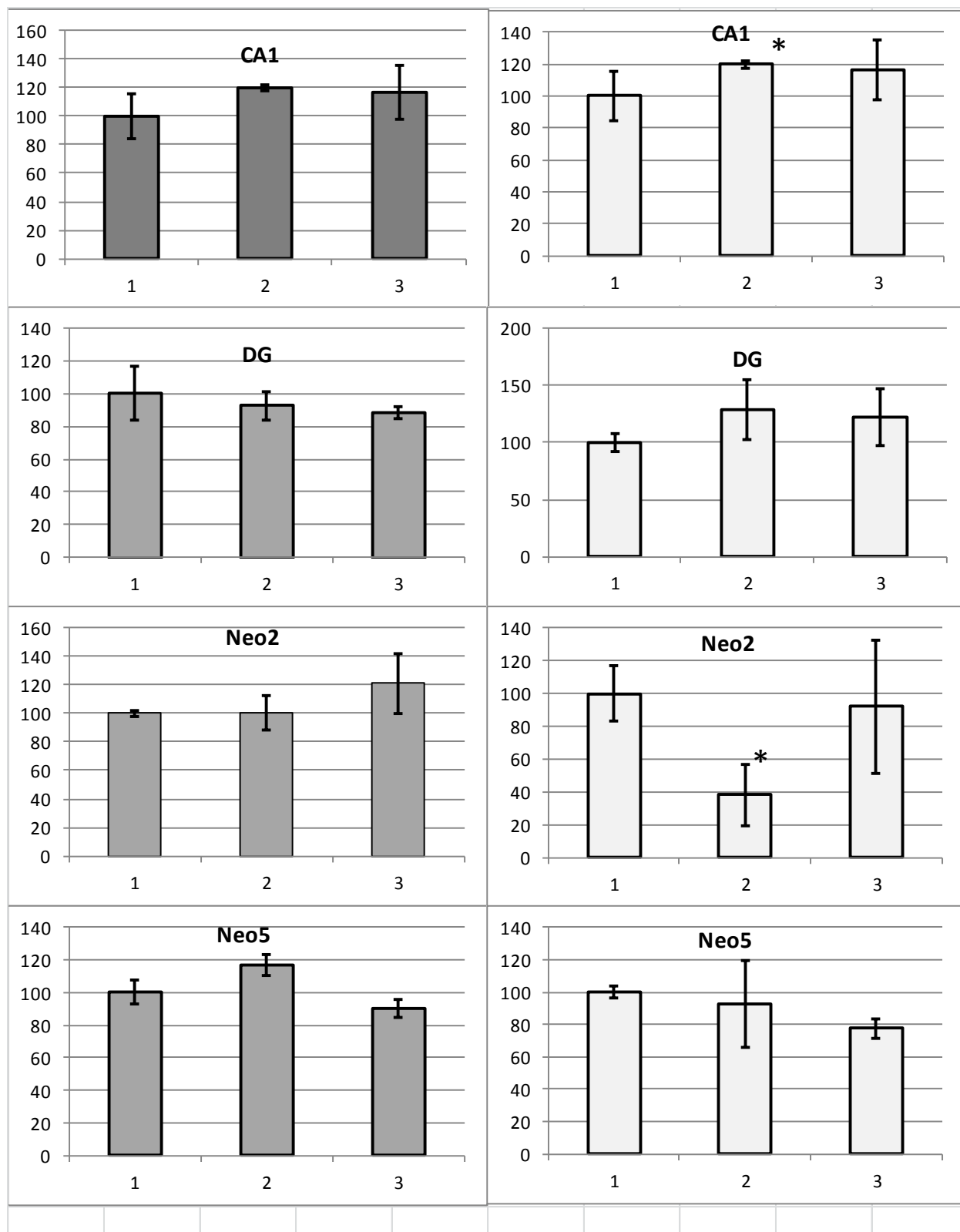


Рис. 32. Рис. Изменения экспрессии минералокортикоидных рецепторов в области CA1 и зубчатой извилине (DG) гиппокампа, 2-м и 5-м слоях неокортекса (Neo2 и Neo5) взрослых крыс самцов, подвергавшихся воздействию тяжелой гипоксии на 14-16-е (2) и 17-19-е (3) сутки пренатального развития по сравнению с контрольными животными (1) в процентах. Темно серые столбики – общее количество иммунопозитивных клеток; Светлые столбики – количество интенсивно иммунопозитивных клеток; (* достоверно отличаются от контроля – $p < 0,05$)

В наших исследованиях изучали изменения количества иммунопозитивных клеток к глюко- и минералокортикоидным рецепторам в клетках области СА1 и зубчатой извилине гиппокампа, а также во 2-м и 5-м слоях неокортекса взрослых крыс самцов (Рис. 30-32).

Тяжелая гипоксия, предъявляемая животным на последней неделе пренатального развития, не приводит к значительным изменениям общего числа экспрессирующих ГР клеток (Рис. 31). Достоверные изменения наблюдаются только в пятом слое неокортекса (уменьшение экспрессии глюкокортикоидных рецепторов во 5-м слое на 21,8% и 23,2%, (соответственно гипоксия на 14-16е и 17-19-е сутки пренатального развития). Значительные изменения наблюдались при подсчете интенсивно иммунореактивных клеток к глюкокортикоидным рецепторам – гипоксия на 14-16 сутки пренатального развития приводила в дальнейшем к снижению интенсивно иммунореактивных клеток на 55-65 % в области СА1 гиппокампа и 2-м и 5-м слоях неокортекса. Гипоксия на 17-19 сутки беременности приводила к значительным изменениям количества интенсивно иммунореактивных только в области СА1 гиппокампа и 5-м слое неокортекса (снижение на 50,9% и 62,3% соответственно) (Рис. 31).

Общее число иммунопозитивных клеток к минералокортикоидным рецепторам под действием пренатальной гипоксии также изменялось незначительно, достоверные изменения обнаружены только в области СА1 гиппокампа взрослых крыс (Рис. 32). Основные изменения количества интенсивно иммунопозитивных клеток обнаружены в областях СА1 и неокортексе (Рис. 32).

3.9.2.2. Влияние введения дексаметазона самкам крыс в различные сроки беременности, на экспрессию глюко- и минералокортикоидных рецепторов в неокортексе и гиппокампе крыс их взрослых потомков.

В работе изучали также характер вовлечения экстрагипоталамических кортикостероидных рецепторов в механизмы повреждения мозга, индуцируемые введением синтетического гормона дексаметазона самкам в различные периоды пренатального онтогенеза (Рис. 33- 35).

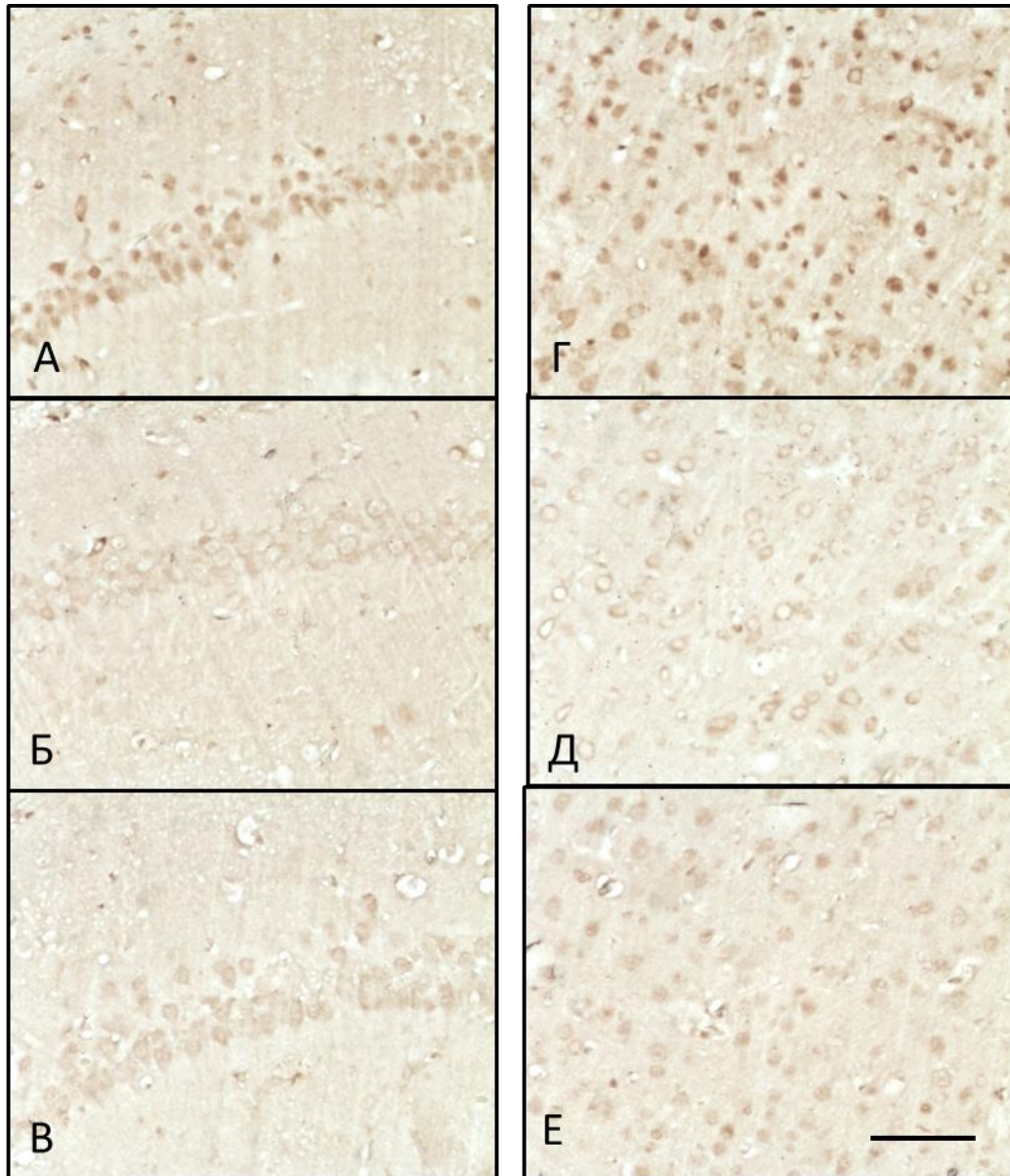


Рис. 33. Репрезентативные микрофотографии изменения иммунореактивности глюкокортикоидных рецепторов в области СА1 гиппокампа (А, Б, В) и неокортексе (5-й слой) (Г, Д, Е) взрослых контрольных крыс и крыс, после введения дексаметазона (80 мг/кг) на 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального онтогенеза. Маркер, 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.

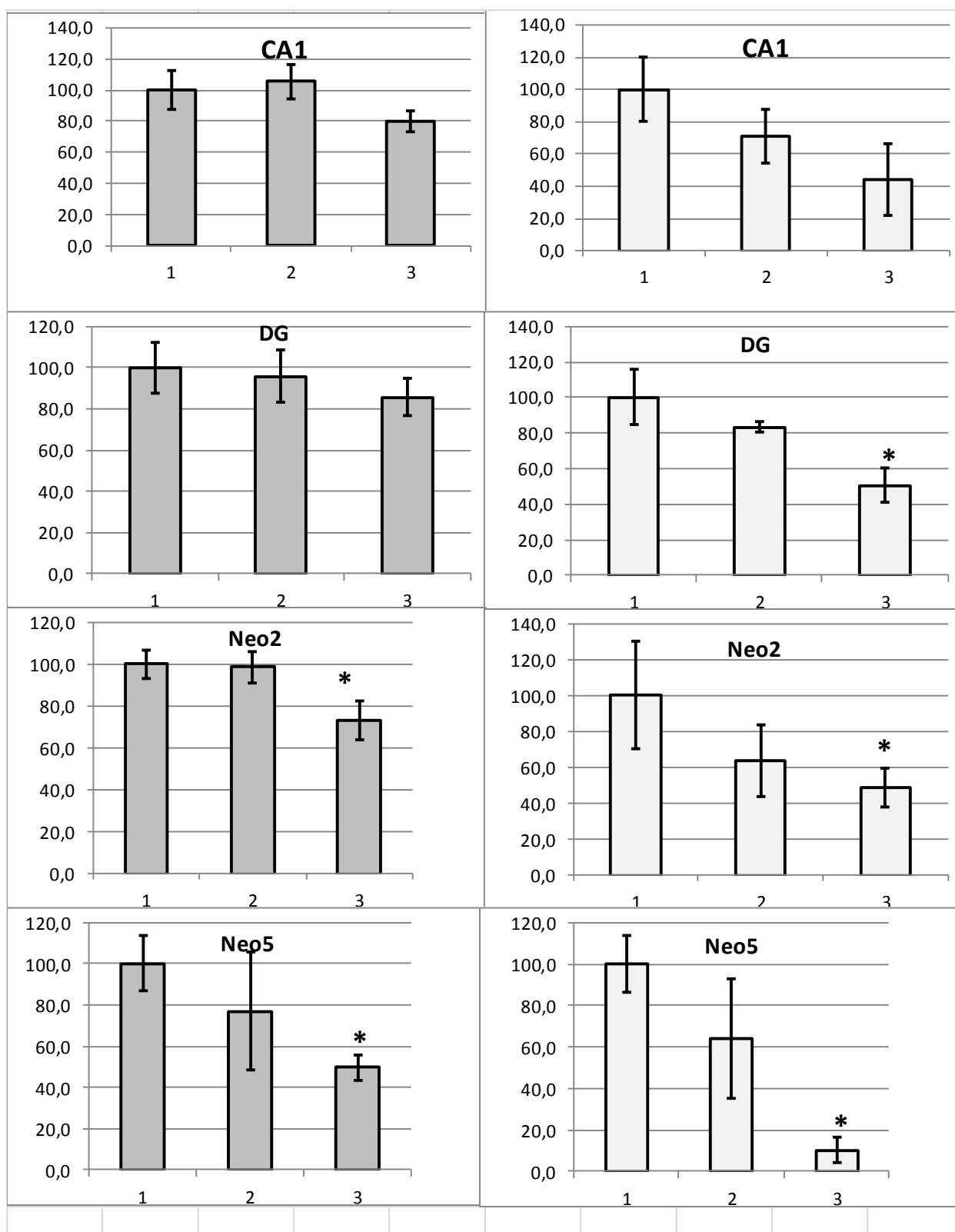


Рис. 34. Изменения экспрессии глюкокортикоидных рецепторов области CA1, зубчатой извилины гиппокампа (DG) и 2-м и 5-м слоях неокортекса (Neo2 и Neo5) взрослых крыс самцов, подвергавшихся воздействию дексаметазона на 14-16-е (2) и 17-19-е (3) сутки пренатального развития по сравнению с контрольными животными (1).

Темно серые столбики – общее количество иммунопозитивных клеток; Светлые столбики – количество интенсивно иммунопозитивных клеток; (*достоверные отличия от контроля – $p < 0,05$)

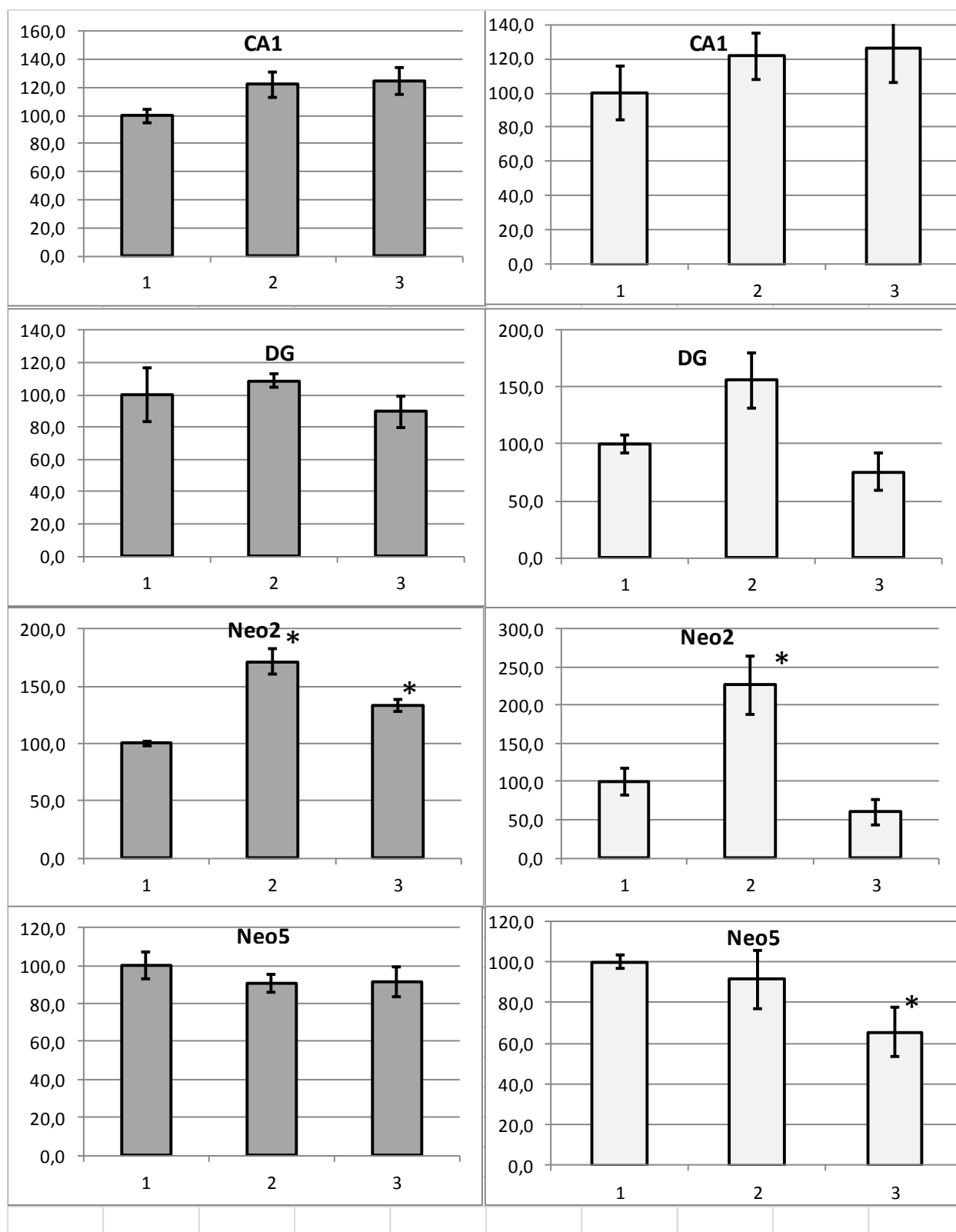


Рис. 35. Изменения экспрессии минералокортикоидных рецепторов области CA1, зубчатой извилины гиппокампа (DG) и 2-м и 5-м слоях неокортекса (Neo2 и Neo5) взрослых крыс самцов, подвергавшихся воздействию дексаметазона на 14-16-е (2) и 17-19-е (3) сутки пренатального развития по сравнению с контрольными животными (1).

Темно серые столбики – общее количество иммунопозитивных клеток; Светлые столбики – количество интенсивно иммунопозитивных клеток; (* достоверные отличия от контроля – $p < 0,05$)

Введение синтетического гормона дексаметазона в конце 3-ей недели беременности приводит к достоверному изменению общего числа иммунопозитивных клеток к глюко- и минералокортикоидным рецепторам в неокортексе взрослых крыс. В гиппокампе эти изменения менее выражены (Рис. 34, 35).

У животных переживших введение дексаметазона на 17-19-е сутки пренатального онтогенеза наблюдаются достоверное снижение количества интенсивно иммунореактивных клеток к глюкокортикоидным рецепторам во всех исследованных областях мозга. Введение дексаметазона на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза приводило к увеличению иммунореактивности минералокортикоидных рецепторов в неокортексе взрослых крыс (Рис. 34, 35). Тенденция к уменьшению интенсивно иммунореактивных клеток к глюкокортикоидным рецепторам, сопровождается повышением иммунореактивности клеток к минералокортикоидным рецепторам.

Характер воздействия глюкокортикоидов на конкретную клетку определяется концентрацией гормона, наличием и соотношением типов рецепторов, с которыми связывается гормон. Существующие в настоящее время данные позволяют сделать вывод, что соотношение ГР/МР имеет большое значение для реализации физиологического эффекта глюкокортикоидов на клетки-мишени. Разнонаправленные изменения в уровне экспрессии ГР и МР в структурах мозга, чувствительных к действию стресса, могут приводить к сдвигу баланса между данными рецепторами.

Результаты анализа влияния гипоксии или введения дексаметазона в пренатальном периоде развития на изменения соотношения ГР/МР в исследованных структурах мозга представлены на рисунке 36.

Как правило, пренатальная гипоксия и введение дексаметазона влияют на соотношение интенсивно иммунореактивных клеток. 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 СА1 гиппокампа и во 5-м слое неокортекса. При анализе отношения ГР/МР видно, что в области СА1 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.

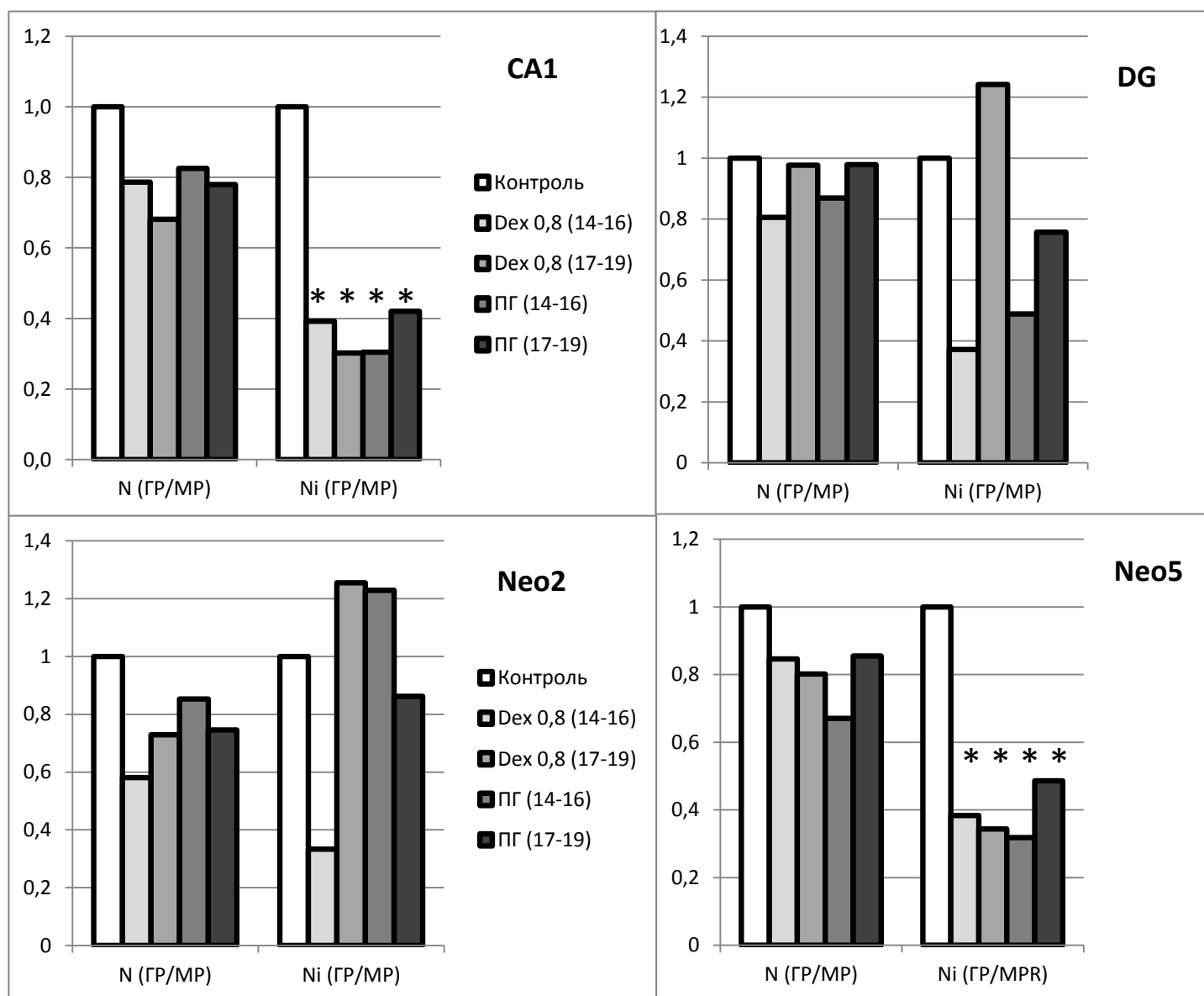


Рис. 36. Изменения отношения иммунопозитивных клеток к глюкокортикоидным рецепторам к иммунопозитивным клеткам к минералокортикоидным рецепторам в областях СА1 и зубчатой извилине гиппокампа, во 2-м и 5-м слоях неокортекса после введения дексаметазона или воздействия тяжелой гипоксии на 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального развития.

3.10. Состояние фосфоинозитидной системы мозга крыс, подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии или дексаметазона 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). Показано, в частности, что одним из последствий действия гипоксии являются стойкие модификации фосфоинозитидной системы, которая, как известно, контролирует метаболизм и функциональную активность нервных клеток, в том числе пролиферацию, рост, программируемую гибель, нейротрансдукцию и др. (Eichberg J., et al. 1965, O'Neill C. 2008 a,b).

В связи с обнаруженными нами и другими авторами нарушениями способности к обучению важно было особое внимание уделить состоянию фосфоинозитидной системы не только в неокортексе, но и в гиппокампе крыс, переживших пренатальную гипоксию.

Одной из центральных задач нашей работы явилось исследование изменений активности фосфоинозитидной внутриклеточной регуляторной системы и модуляции чувствительности IP₃-рецепторов в наиболее чувствительных к гипоксии образованиях мозга (неокортекс и гиппокамп) крыс, подвергавшихся тяжелой гипобарической гипоксии на 14-16 и 17-19 сутки гестации.

Исследования влияния пренатальной гипоксии и дексаметазона на фосфоинозитидную систему внутриклеточной регуляции мозга крыс проводили по следующим направлениям:

1. изучали уровень содержания полифосфоинозитидов (фосфатидилинозитол-5-фосфатов и фосфатидил-4,5-дифосфатов) в гиппокампе и неокортексе контрольных и опытных крыс в возрасте 14 и 90 суток;
2. оценивали способность фосфоинозитидной системы коры головного мозга крыс в возрасте 15 и 90 суток реагировать на действие глутамата *in vitro*;
3. оценивали активность IP₃-R в области CA1 гиппокампа у 14-и и 90-суточных крыс, подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии и дексаметазона в период гестации.

3.10.1. Содержание фосфатидилинозитол-4,5-дифосфатов, фосфатидилинозитол-4-фосфатов и фосфатидилинозитолов в неокортексе и гиппокампе 14-ти и 90-суточных крыс.

Методом бумажной хроматографии разделяли и определяли количество различных компонентов фосфоинозитидов по содержанию фосфора в неокортексе и гиппокампе 14- и 90 суточных крыс самцов.

При определении уровня содержания полифосфоинозитидов в мозге контрольных животных обнаружено, что у контрольных 14-суточных крыс уровень содержания трифосфоинозитидов (фосфатидилинозитол-4,5-дифосфаты, ТФИ) значительно выше, чем у взрослых ($0.224 \pm 0,021$ и $0.134 \pm 0,007$ мкгР/мг белка ткани мозга, соответственно) (Табл. 7). Так же достоверно отличается уровень содержания дифосфоинозитидов (фосфатидилинозитол-4-фосфаты, ДФИ). Содержание полифосфоинозитидов (ТФИ и ДФИ) в гиппокампе у 14-суточных крыс было выше, чем в неокортексе (Рис. 37). У взрослых животных эта разница была меньше. Содержание монофосфоинозитидов (фосфатидилинозитолы, МФИ) не зависит от возраста и исследуемой области мозга.

	14-суточные			90-суточные		
	ТФИ мкгР/мг белка	ДФИ мкгР/мг белка	МФИ мкгР/мг белка	ТФИ мкгР/мг белка	ДФИ мкгР/мг белка	МФИ мкгР/мг белка
НЕОКОРТЕКС	0,255 $\pm 0,069$	0,224 $\pm 0,0115$	0,720 $\pm 0,0471$	0,151 $\pm 0,0092$ ##	0,134 $\pm 0,0077$ ##	0,680 $\pm 0,0459$
ГИППОКАМП	0,512 $\pm 0,0211$ **	0,288 $\pm 0,0215$ **	0,740 $\pm 0,0466$	0,174 $\pm 0,0139$ * ##	0,171 $\pm 0,0053$ * ##	0,712 $\pm 0,0387$

Таблица 7: Содержание фосфатидилинозитол-4,5-дифосфатов (ТФИ), фосфатидилинозитол-4-фосфатов (ДФИ) и фосфатидилинозитолов (МФИ) в неокортексе и гиппокампе мозга крыс.

Статистическая достоверность:

* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ гиппокамп по отношению к неокортексу;

- $p < 0.01$ взрослые животные по отношению к 14-суточным.

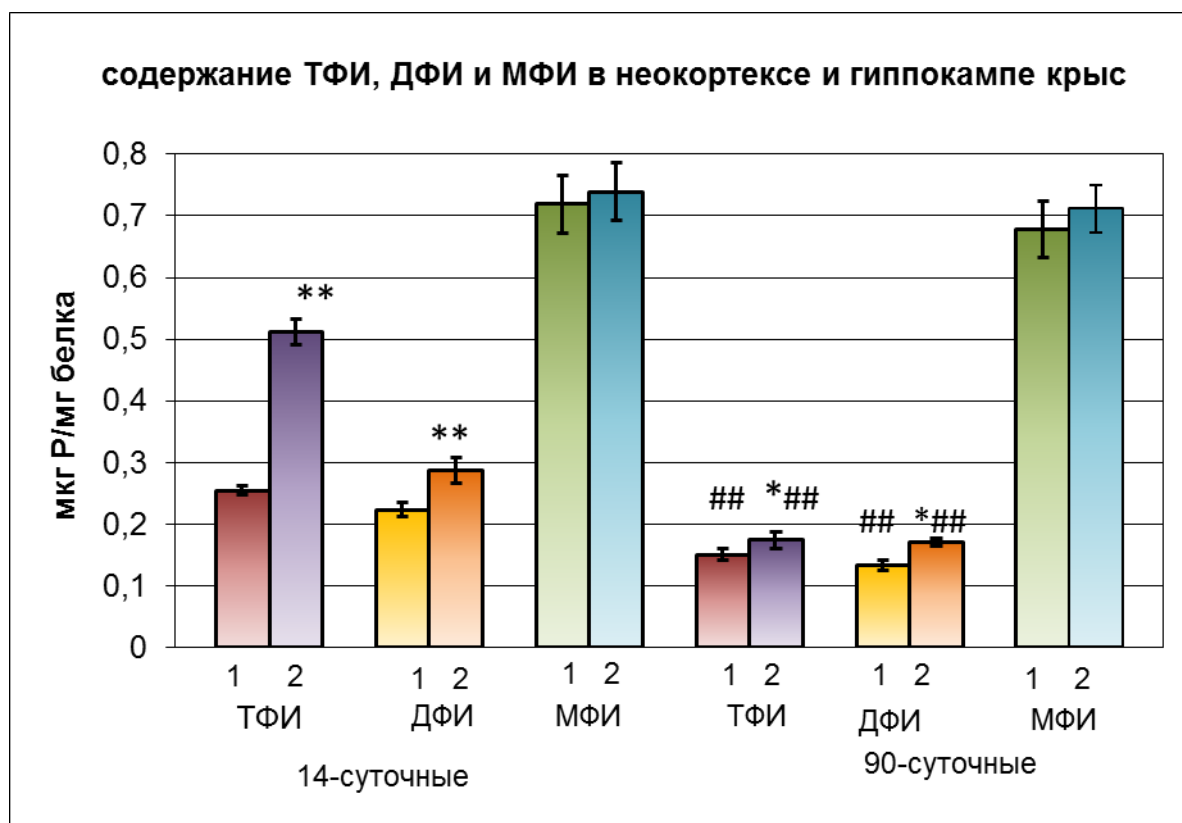


Рис. 37. Содержание фосфатидилинозитол-4,5-дифосфатов (ТФИ), фосфатидилинозитол-4-фосфатов (ДФИ) и фосфатидилинозитолов (МФИ) в неокортексе и гиппокампе 14-ти и 90-суточных крыс. 1. – неокортекс; 2 – гиппокамп.

Статистическая достоверность:

* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ гиппокамп по отношению к неокортексу;

- $p < 0.01$ взрослые животные по отношению к 14-суточным.

3.10.2.1. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на уровень содержания фосфоинозитидов в мозге их потомков.

Тяжелая гипоксия, предъявляемая на 14-16-е сутки гестации, приводит к повышению уровня содержания фосфатидилинозитол-4,5-дифосфатов и фосфатидилинозитол-4-фосфатов в гиппокампе и неокортексе 14-суточных крыс (Рис. 38). Содержание фосфатидилинозитолов в мозге экспериментальных животных не отличалось от контрольного уровня. При этом изменения содержания ТФИ и ДФИ в гиппокампе были более выражены, чем в неокортексе.

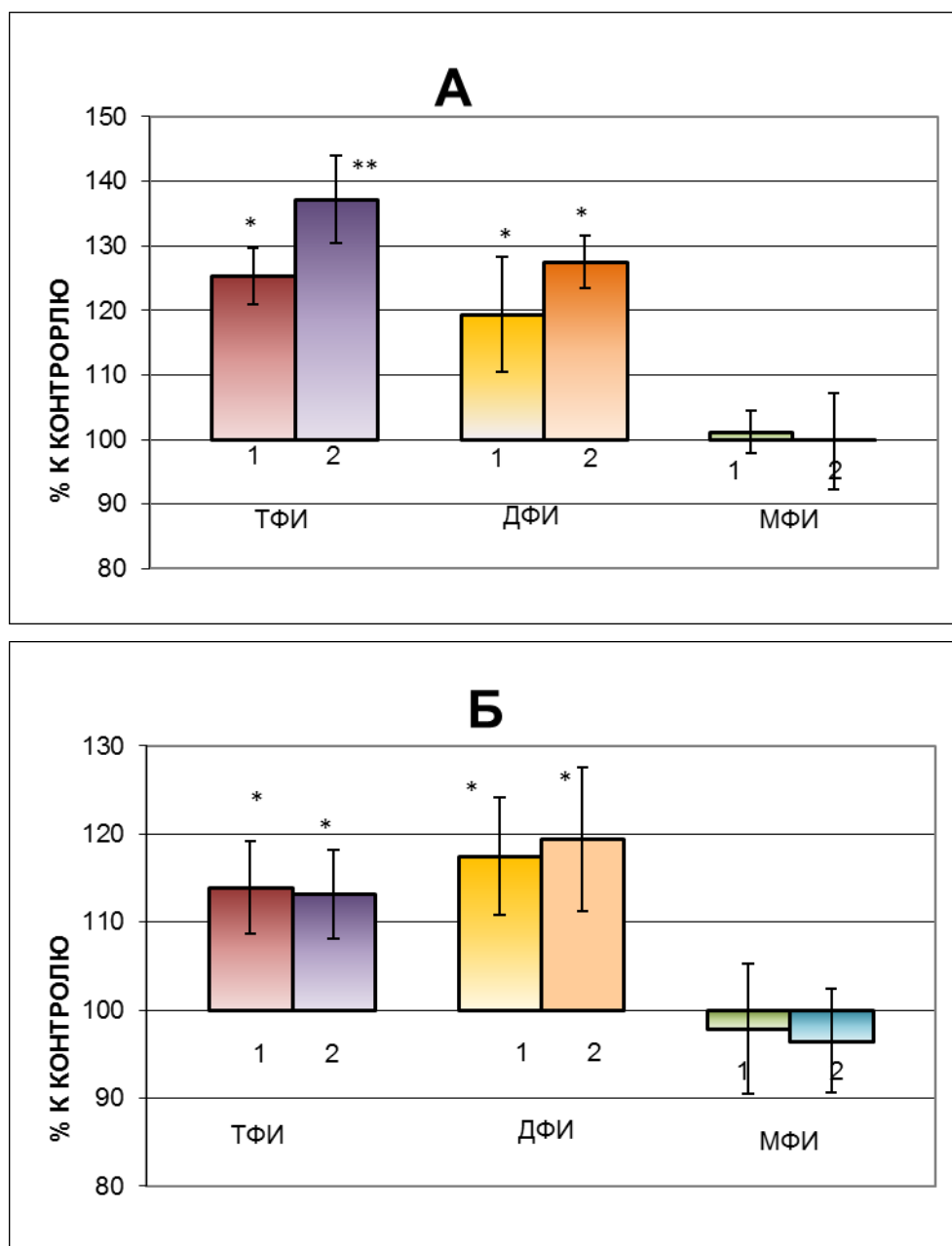


Рис. 38. Изменения содержания компонентов фосфоинозитидов (в % к контрольному уровню) в неокортексе (1) и гиппокампе (2) 14-суточных крыс, переживших тяжелую гипоксию на 14-16-е сутки (А) и 17-19-е сутки гестации (Б).

(* достоверные отличия от контроля - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$)

У взрослых (90-суточных) животных, перенесших пренатальную гипоксию на 14-16-е сутки гестации, уровень содержания ТФИ и ДФИ хотя и в меньшей степени, но оставался выше контрольных значений в исследуемых образованиях мозга (Рис. 39). При этом не наблюдалось различий между неокортексом и гиппокампом.

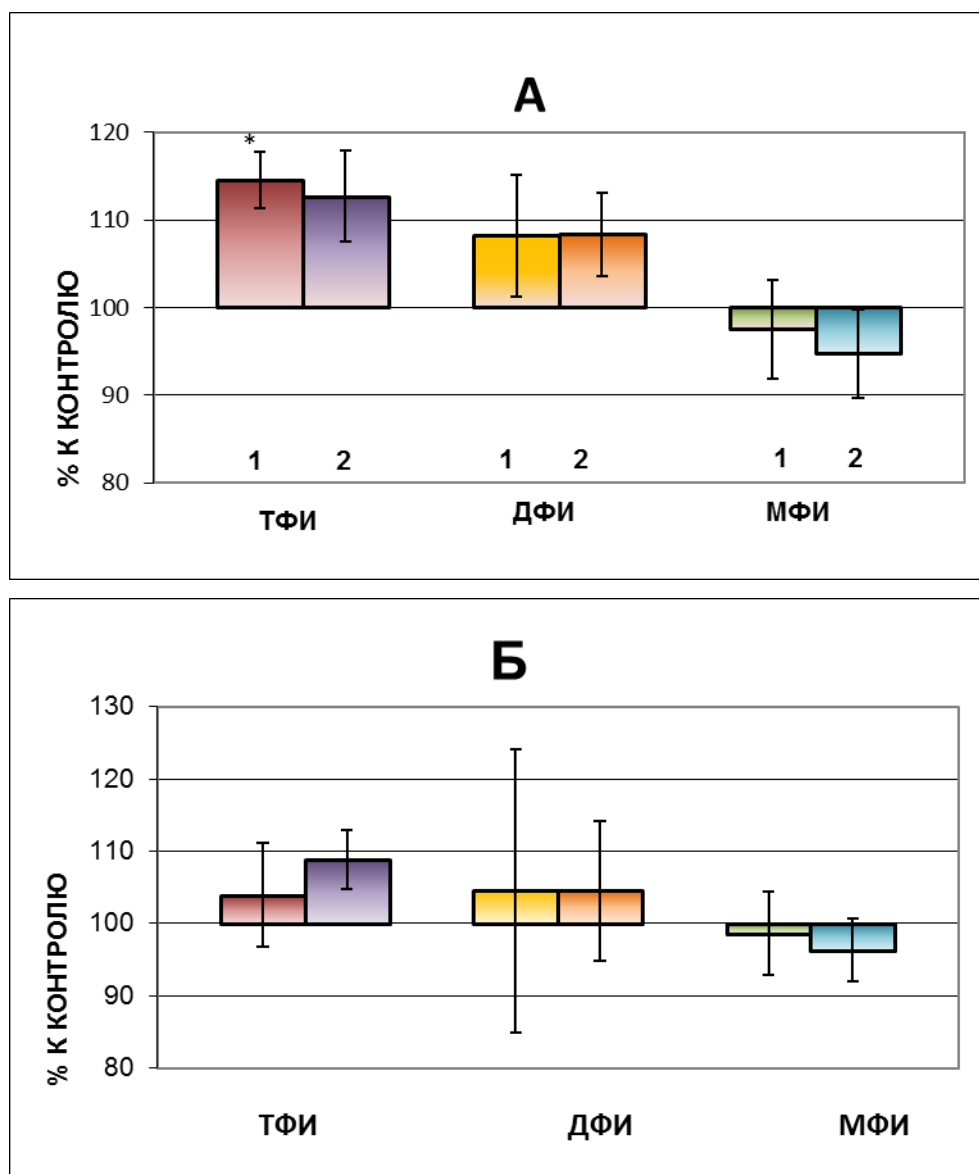


Рис. 39. Изменения содержания фосфатидиллинозит-4,5-дифосфатов (ТФИ), фосфатидилинозитол-4-фосфатов (ДФИ) и фосфатидилинозитолов (МФИ) в неокортексе (1) и гиппокампе (2) 90-суточных крыс, перенесших гипоксию на 14-16-е (А) и 17-19-е (Б) сутки гестации. (*достоверные отличия от контроля - $p < 0,05$).

Тяжелая гипоксия, перенесенная крысами на 17-19-е сутки гестации увеличивает содержание ПФФИ мозга только в первые недели после рождения. У взрослых животных не наблюдалось достоверных различий в уровне содержания ПФФИ в исследованных образованиях мозга.

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 гипоксия 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 потомков, но в меньшей степени.

3.10.2.2. Влияние введения дексаметазона самка крыс в различные сроки беременности на уровень содержания фосфоинозитидов в мозге их взрослых потомков.

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 (Рис. 40). Уровень содержания ТФИ в гиппокампе и коре взрослых крыс после пренатального введения дексаметазона на 17-19-е сутки гестации также выше контрольного уровня, но в меньшей степени (на 24,1 и 13,8 % соответственно).

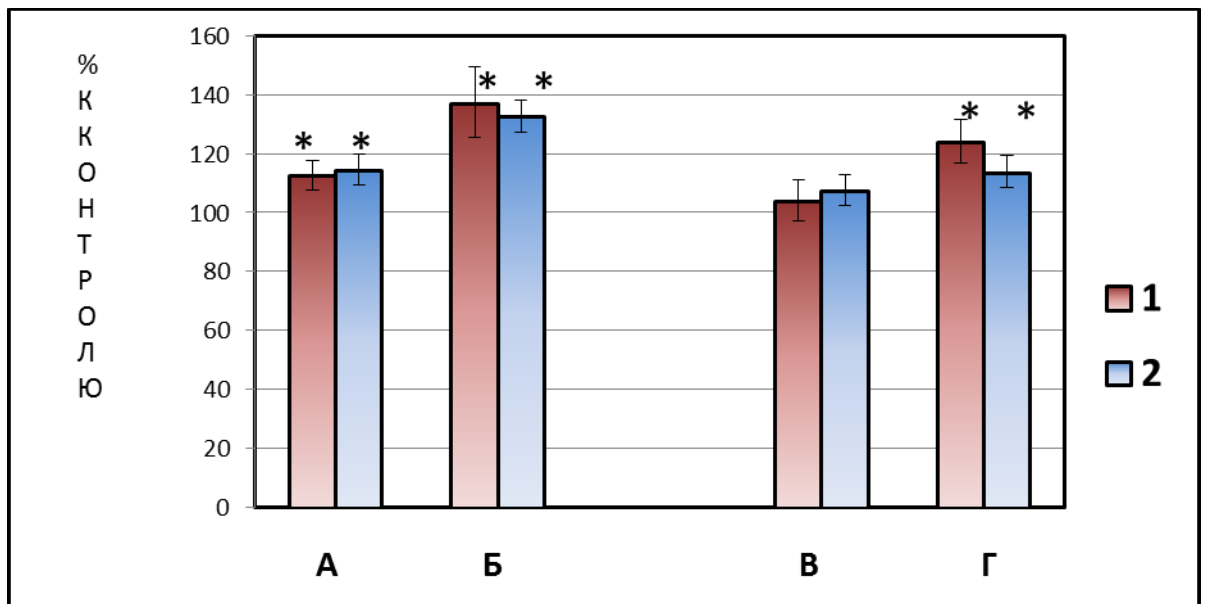


Рис. 40. Изменения содержания ТФИ в гиппокампе (1) и неокортексе (2) крыс подвергавшихся действию пренатальной гипоксии на 14-16-е (А); 17-19-е (В) сутки гестации и введение дексаметазона (0.8 мг/кг) на 14-16-е (Б); 17-19-е (Г) сутки гестации (*достоверные отличия от контроля - $p < 0,05$).

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.

3.10.3. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на фосфоинозитидный ответ при аппликации глутамата на переживающие срезы мозга их взрослых потомков.

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 фосфоинозитидного 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, который регистрировали по относительному увеличению количества инзитолтрифосфатов по сравнению с базальным уровнем (без добавления глутамата), в отличие от срезов взрослых животных (Рис. 41),

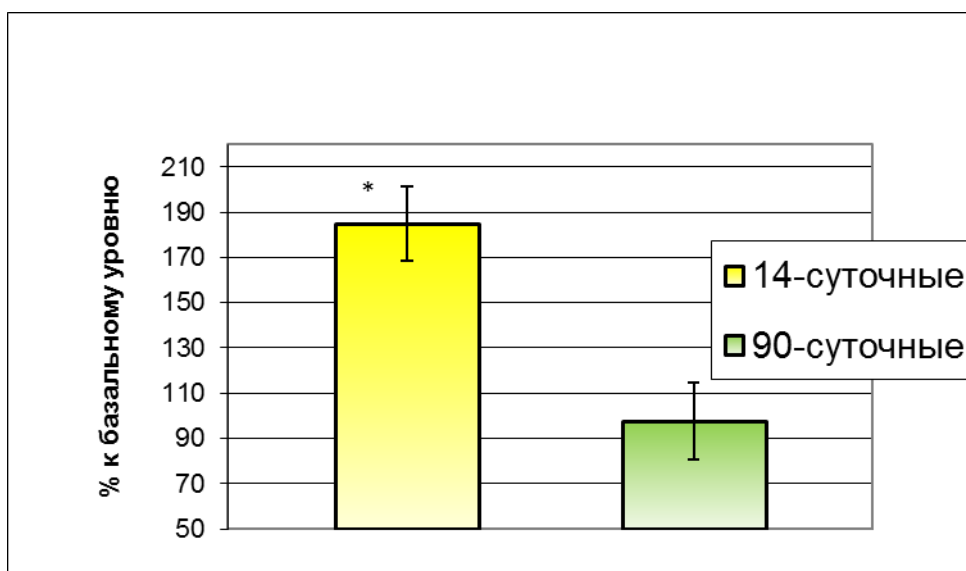


Рис. 41. Изменение уровня инозитолтрифосфатов (в процентах к базальному уровню – без аппликации глутамата) в переживающих срезах мозга 14-ти и 90-суточных крыс в ответ на аппликацию глутамата (50 мкМ).

* - достоверные отличия от контроля ($p < 0.05$)

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, чем в контрольной группе (уровень инозитфосфатов незначительно превышает базальный), а у взрослых крыс он не отличается от контроля (рис. 42).

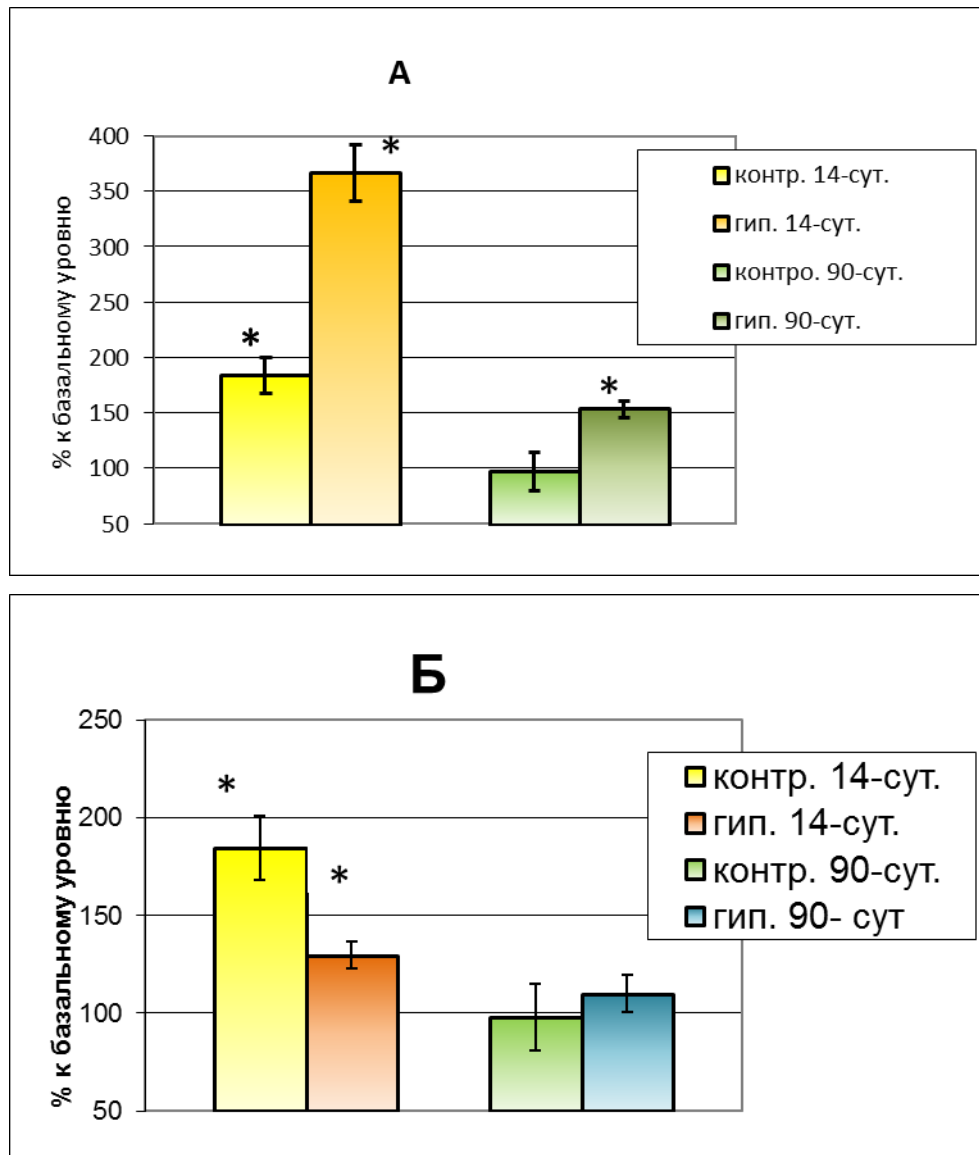


Рис. 42. Изменение уровня инозитолтрифосфатов (в процентах к базальному уровню – без аппликации глутамата) в переживающих срезах мозга 14-ти и 90-суточных крыс, подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии на 14-16-е (А) и 17-19-е (Б) сутки гестации в ответ на аппликацию глутамата (50 мкМ). * - достоверные отличия от контроля ($p < 0.05$)

Обнаруженные нами длительные изменения активности фосфоинозитидной системы мозга, крыс переживших тяжелую гипобарическую гипоксию в третьем триместре беременности могут лежать в основе нарушений функциональной активности нейронов мозга. Таким образом, гипоксия, перенесенная на 14-16-е 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.

3.10.4. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на активность метаботропных глутаматных рецепторов мозга их потомков.

Выше показано, что 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 (ImGluR), 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 поддержание 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 (DHPPG, 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.

Обнаружено, что в срезах мозга контрольных 14-суточных и 90-суточных крыс парная аппликация DHPPG вызывает различные смещения уровня связанного кальция (Ca-c-ответы). В срезах 14-суточных крысят первая аппликация агониста вызывала небольшое, но достоверное стойкое снижение уровня Ca-c, а повторная – его повышение, превосходящее исходное значение (Рис. 43). В срезах 90-суточных животных оба кальциевого- ответа были негативными (Рис. 44).

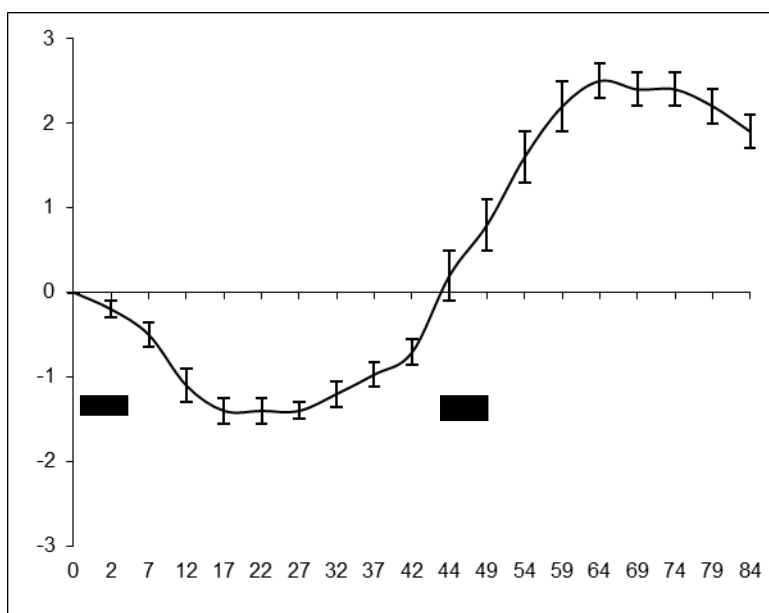


Рис. 43. Кальциевые ответы на двукратную аппликацию DHPG (2 мин, 100 мкМ) в срезах контрольных 14-Суточных крыс. Представлена динамика средних значений для каждого измерения (с 5-мин интервалом) \pm стандартная ошибка среднего, по оси абсцисс – изменения связанного кальция (Ca-c) в %, $n=9$.

Черные прямоугольники указывают периоды аппликации агониста DHPG.

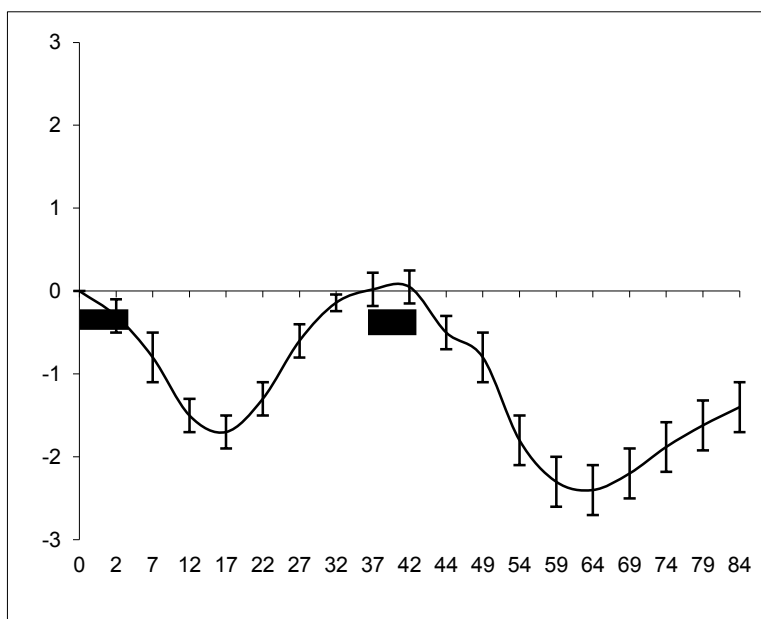


Рис. 44. Кальциевые ответы на двукратную аппликацию DHPG (2 мин, 100 мкМ) в срезах 90-суточных контрольных крыс ($n=10$). Обозначения те же, что на Рис. 43.

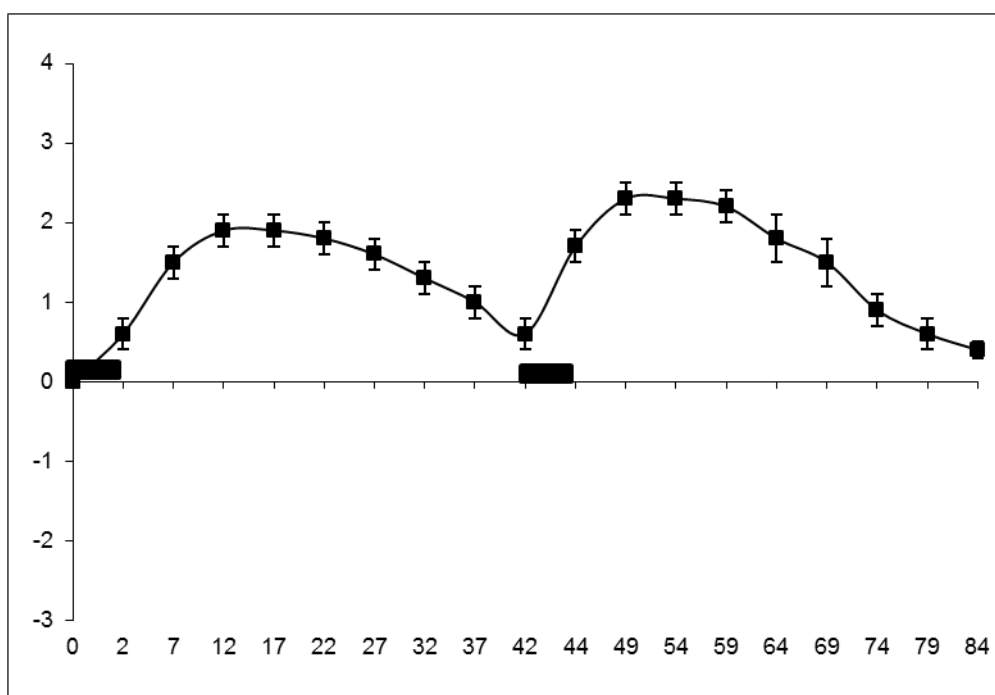


Рис. 45. Кальциевые ответы на двукратную аппликацию DHPG (2 мин, 100 мкМ) в срезах 14-суточных крыс, подвергавшихся пренатальной гипоксии на 14-16-е сутки гестации (n=12). Обозначения те же, что на рис. 43.

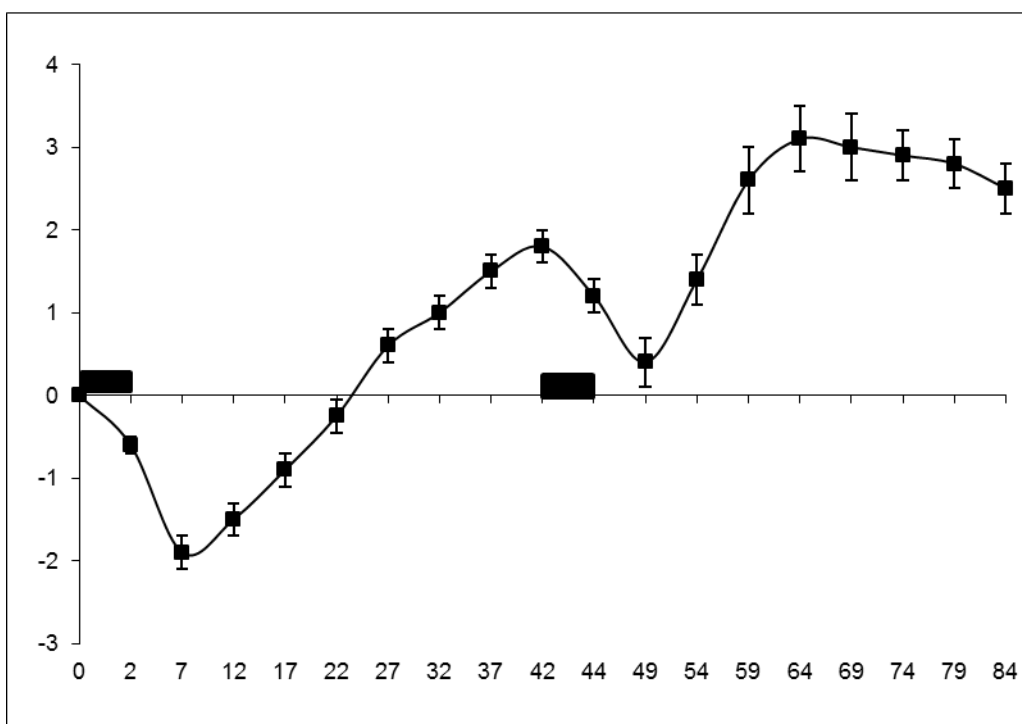


Рис. 46. Кальциевые ответы на двукратную аппликацию DHPG (2 мин, 100 мкМ) в срезах 90-суточных крыс, подвергавшихся пренатальной гипоксии на 14-16-е сутки гестации (n=10). Обозначения те же, что на рис. 43.

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. 45), а с возрастом в начале каждого из них проявлялся кратковременный негативный компонент (Рис.46). Таким образом было отмечено, что кальциевые ответы на DHPG представлены очевидно противоположно направленными сдвигами (снижение и повышение уровня Ca^{2+}). 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 высвобождению Ca^{2+} .

3.10.5. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на активность IP3 рецепторного комплекса в гиппокампе их потомков.

На начальных этапах работы были обнаружены существенные изменения метаболизма полифосфоинозитидов в неокортексе и гиппокампе при действии глутамата у крыс различного возраста, перенесших тяжелую гипобарическую гипоксию в разные сроки пренатального развития. Активация ПФИ системы приводят к высвобождению кальция из внутриклеточных запасов. Этот процесс опосредуется активацией IP3 рецепторного комплекса (IP3R1), расположенного на мембранах эндоплазматического ретикулума (O'Neill C.2008 a, b, 2008; Eichberg and Dawson, 1965).

Было проведено исследование модуляции чувствительности IP3-рецепторов в гиппокампе крыс, подвергавшихся тяжелой гипобарической гипоксии на 14-16-е и 17-19-е сутки гестации.

3.10.5.1. Иммуногистохимическое детектирование инозитол-3-фосфатного рецептора в CA1 области гиппокампа 14-и и 90-суточных крыс.

Наибольшая иммунореактивность IP3R-1 наблюдается в области CA1 гиппокампа, в то время как в областях CA3 и DG иммунореактивность довольно умеренная (Nicolay, Hertle, 2007). Поэтому в своей работе мы в основном оценивали уровень иммунореактивности IP3R-1 в области CA1 гиппокампа 14-суточных и зрелых животных.

В проведенных экспериментах IP3R-1 иммунореактивность была обнаружена в области CA1 гиппокампа, 14-ти и 90-суточных контрольных крыс (рис. 47), что хорошо согласуется с литературными данными (Sharp et al., 1999; Hertle D.N., Yeckel M.F. 2007; Nicolay N.H., et all. 2007). При анализе изображений отмечено ярко выраженное различие в количестве интенсивно иммунореактивных нейронов у животных этих двух возрастных групп. У 14-ти суточных крыс в области CA-1 $28.3 \pm 9.1\%$ от общего количества нейронов обладали четко выраженной интенсивной окраской для IP3R-1, в то время как в соответствующей области мозга взрослых животных количество таких нейронов составляло $79.5 \pm 12.1\%$ ($p < 0.05$, $n = 7$ каждой группы). Кроме того, было выявлено, что нейроны молодых животных имеют наиболее интенсивную окраску в соме и проксимальных отделах аксонов с уменьшением ее в дистальном направлении вдоль аксона. В противоположность этому, аксоны нейронов взрослых животных были окрашены относительно однородно вдоль своей длины.

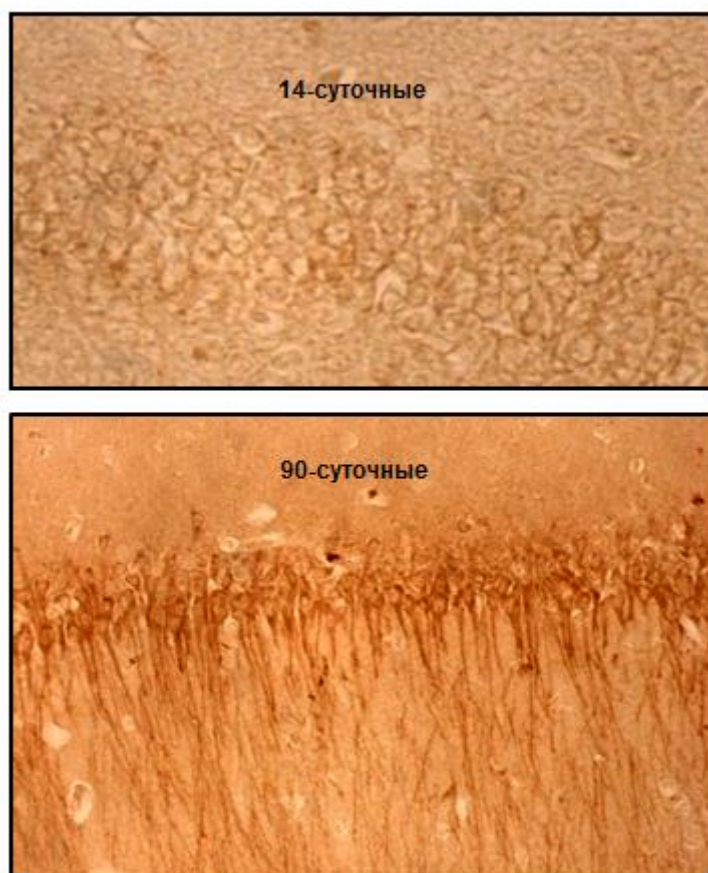


Рис. 47. Микрофотографии иммунопозитивных IP3R1 клеток в области CA1 гиппокампа 14-суточных и 90-суточных контрольных крыс.

3.10.5.2. Влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками крыс в различные сроки беременности, на иммунореактивность нейронов к IP3R-1 в области CA1 гиппокампа их потомков.

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 гестации (на 112,2% и 61,9 % соответственно). (рис. 48, 49).

У взрослых 90-суточных животных также наблюдается повышенное число интенсивно иммунореактивных 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 гестации), причем, для группы с предъявлением гипоксии на 17-19-е сутки, это различие являлось достоверным (Рис. 50).

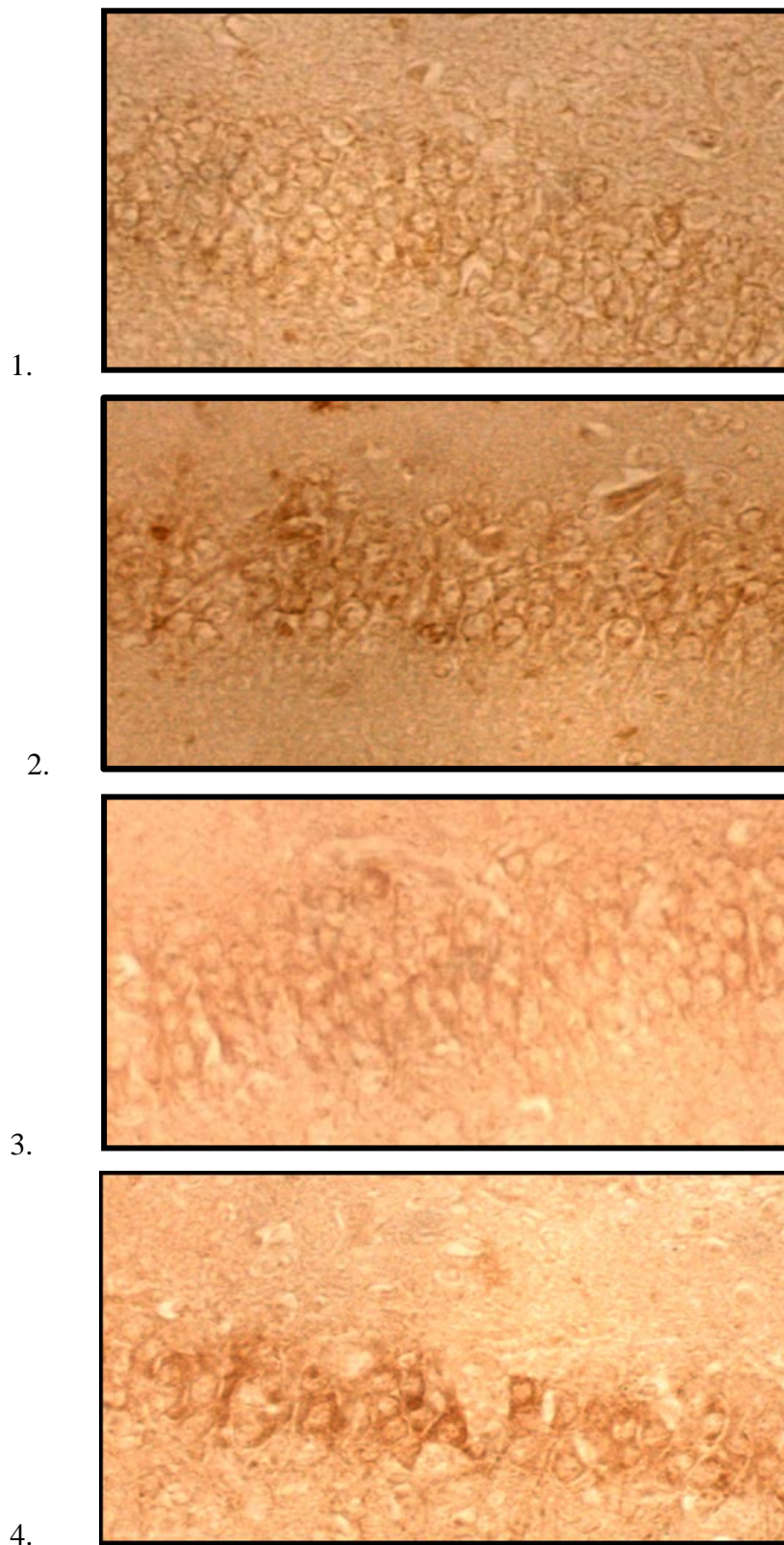


Рис. 48. Микрофотографии иммунопозитивных клеток IP3R1 области CA1 гиппокампа 14-суточных крыс (1 – контроль; 2 – пренатальная гипоксия на 14-16-е сутки гестации; 3- контроль; 4 – Пренатальная гипоксия на 17-19-е сутки гестации).

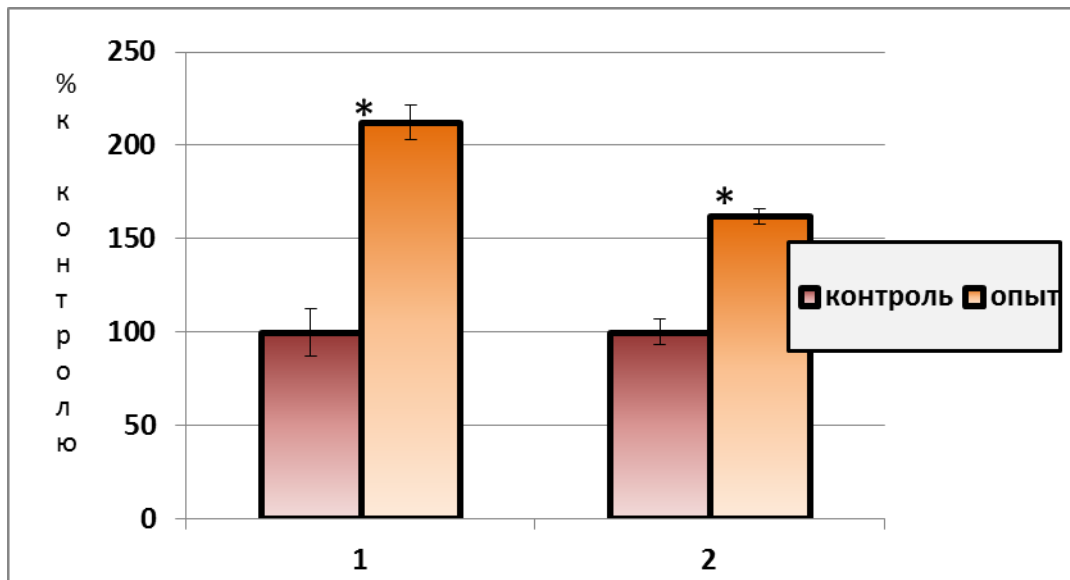


Рис. 49. Изменения количества интенсивно окрашенных иммунопозитивных клеток IP3R-1 в гиппокампе 14- суточных крыс, подвергавшихся действию пренатальной гипоксии на 14-16-е (1) и 17-19-е (2) сутки гестации по сравнению с контролем (* $p < 0,05$)

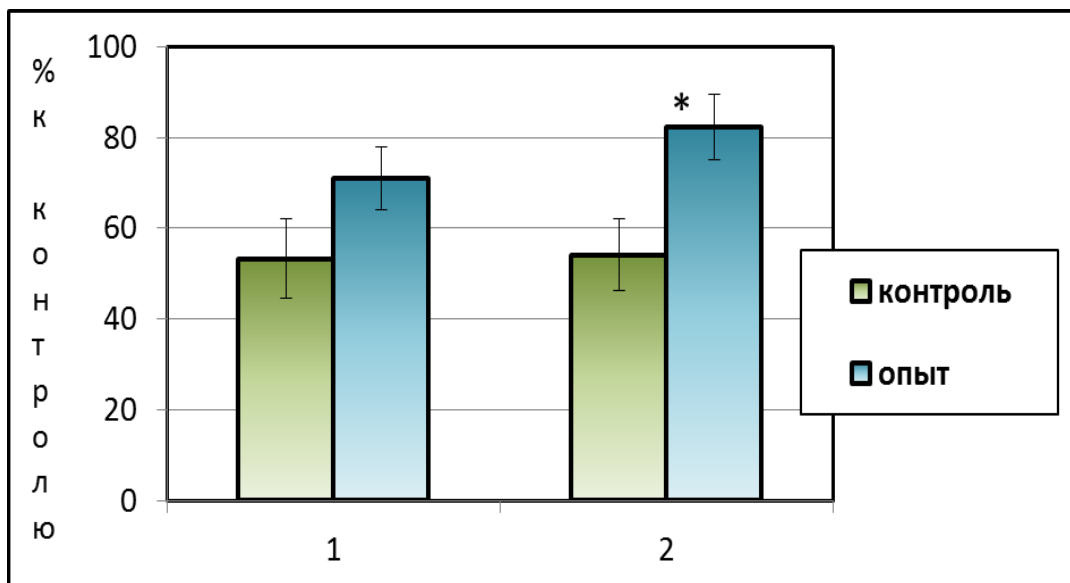


Рис. 50. Изменения количества интенсивно окрашенных иммунопозитивных клеток IP3R-1 в гиппокампе 90- суточных крыс, подвергавшихся действию пренатальной гипоксии на 14-16-е (1) и 17-19-е (2) сутки гестации по сравнению с контролем. (* $p < 0,05$)

3.10.5.3. Влияние введения дексаметазона самкам крыс в различные сроки беременности, на иммунореактивность нейронов к IP3R-1 в области CA1 гиппокампа их взрослых потомков.

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 клеток в гиппокампе у всех групп экспериментальных животных. У взрослых 90-суточных животных обнаружено повышенное число интенсивно иммунореактивных 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 (Рис. 51). Таким образом, введение дексаметазона приводило к таким же нарушениям экспрессии IP3R1 в нейронах области CA1 гиппокампа, как и пренатальная тяжелая гипобарическая гипоксия.

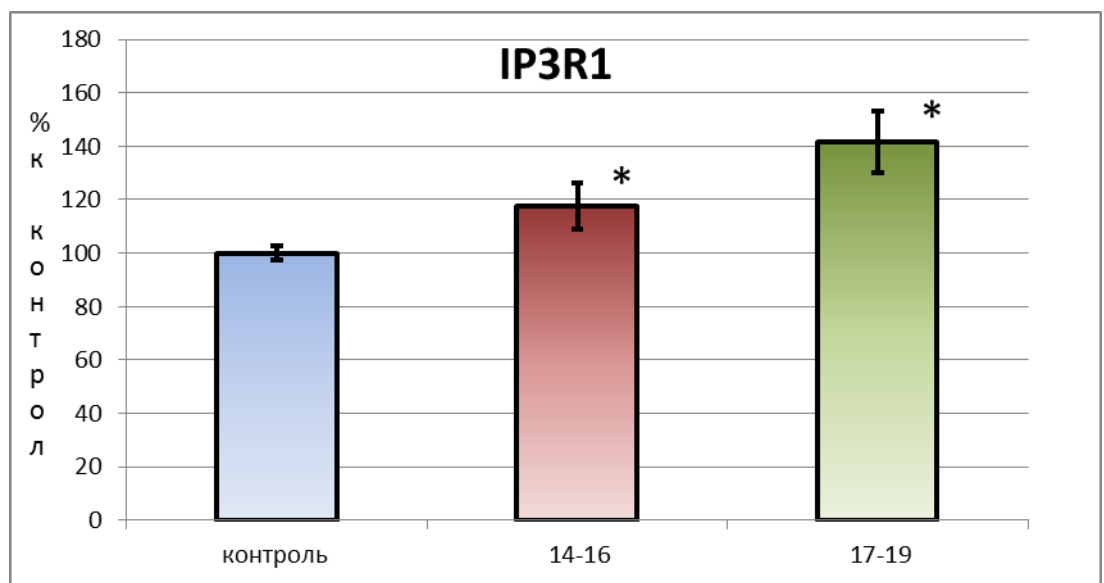


Рис. 51. Количество интенсивно иммунореактивных клеток к IP3R-1 в гиппокампе 90-суточных крыс, подвергавшихся действию пренатальной гипоксии на 14-16-е (1) и 17-19-е (2) сутки гестации. (* $p < 0,05$)

3.11. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на уровень перекисного окисления липидов в неокортексе и гиппокампе крыс.

Причиной повреждения клеточных мембран является оксидативный стресс. Свободно радикальные процессы обуславливают развитие патологических процессов в

клетках, однако, при определенных условиях, они способны инициировать эволюционно сложившиеся и генетически детерминированные мобилизующие механизмы приспособительных реакций нервных клеток, направленные на повышение их устойчивости к повреждающему действию неблагоприятных факторов среды.

Об активности процессов перекисного окисления судили по содержанию в тканях мозга диеновых и триеновых конъюгатов, продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБКАП) и оснований Шиффа. Степень окисленности мембран оценивали по коэффициенту Клейна. Изменения уровней компонентов системы перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли 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.

Было проведено сравнение между уровнями интенсивности процессов ПОЛ у интактных 14-ти и 90-суточных крыс. Результаты исследования представлены в виде гистограмм на рисунке 52. Из представленных данных видно, что коэффициент Клейна у 14-суточных животных в среднем на 45% выше, чем у взрослых крыс. Полученные данные свидетельствуют о том, что в раннем постнатальном онтогенезе для мозга крыс характерен повышенный уровень ненасыщенных жирных кислот. Различия в уровне ПОЛ в мозге ювенильных и взрослых крыс в наибольшей степени проявились при определении триеновых конъюгатов и ТБКАП. Было установлено, что уровень вторичных продуктов ПОЛ в неокортексе и в гиппокампе 14-суточных крыс в среднем на 150% (при всех сравнениях $p < 0,05$) выше по сравнению с таковым у взрослых животных. В меньшей степени, но похожие по направленности различия обнаружили при сопоставлении других исследованных компонентов системы ПОЛ у 14-суточных крыс и взрослых животных. Таким образом, процессы ПОЛ у интактных ювенильных крыс протекают более интенсивно, чем у интактных взрослых животных.

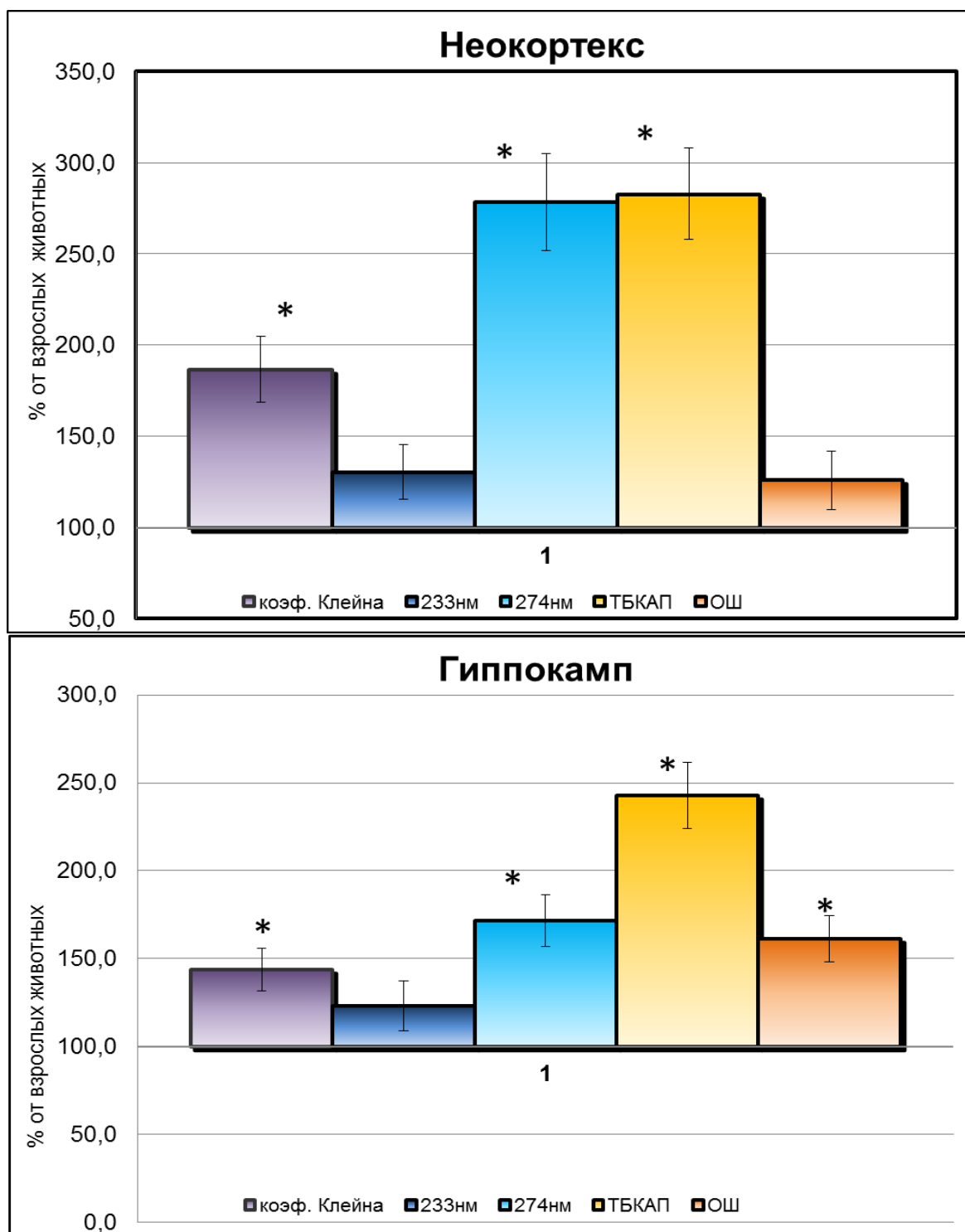


Рис. 52. Относительные по сравнению с взрослыми животными уровни продуктов перекисного окисления липидов (коэффициент Клейна, диеновые конъюгаты, триеновые конъюгаты, активные продукты тиобарбитуровой кислоты, основания Шиффа) в неокортексе и гиппокампе 14-суточных крыс. Уровень содержания ПОЛ в гиппокампе контрольных 90-суточных крыс принимали за 100 %. (*-статистически достоверные отличия между 14- и 90-суточными животными $p < 0,05$)

Пренатальная гипоксия, предъявляемая крысам в последний триместр беременности, вызывает изменения системы перекисного окисления липидов в структурах головного мозга наиболее чувствительных к гипоксическим воздействиям (гиппокамп, неокортекс).

В результате гипоксического воздействия на 14-16-е сутки гестации у 14-суточных крыс изменяется степень окисленности липидов мембран гиппокампа на 26,2 % по сравнению с контролем. Пренатальное воздействие гипоксии значительно увеличивало содержание диеновых и триеновых конъюгатов, что отражает изменения качественного состава мембран.

Первичными продуктами ПОЛ являются липоперекиси (ROOH), в подавляющем большинстве случаев с конъюгированными двойными связями, а также диалкилперекиси (ROOR), перкислоты (RCO-OOH), перэфиры (RCO-OOR) и др. В результате распада первичных продуктов образуются более устойчивые вторичные (Behn et al., 2007). Конечными продуктами ПОЛ выступают низшие альдегиды и кетоны, которые далее легко вступают в ферментативные и неферментативные реакции с веществами, содержащими аминогруппы – белками, аминокислотами, нуклеиновыми кислотами и аминофосфолипидами с образованием оснований Шиффа (Журавлев А.И. 1993).

В настоящей работе динамика вторичных продуктов ПОЛ оценивалась по содержанию ТБКАП, а конечных по содержанию оснований Шиффа. У 14-суточных крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии на 14-16-е сутки пренатального развития, уровень вторичных продуктов ПОЛ в неокортексе практически не отличался от контрольного (Рис. 53). Однако в гиппокампе этих животных мы обнаружили повышение уровня диеновых и триеновых конъюгатов на 30 и 18%, соответственно и конечных продуктов ПОЛ - оснований Шиффа на 18% от контрольных значений, принятых за 100% (Рис. 54). При всех сравнениях $p < 0,05$).

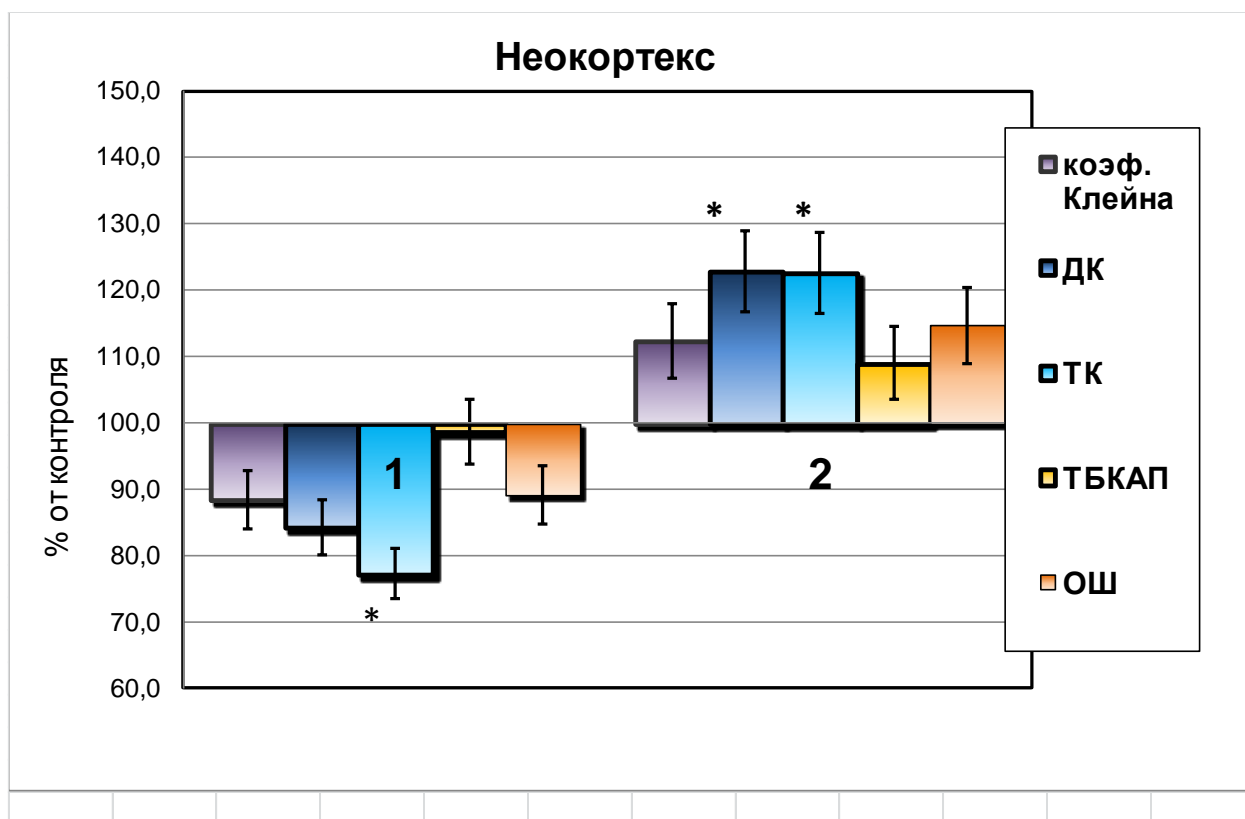


Рис. 53. Динамика изменения содержания продуктов ПОЛ в неокортексе 14-суточных крыс, подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии на 14-16-е (1) и 17-19-е (2) сутки гестации (коэффициент Клейна, диеновые конъюгаты, триеновые конъюгаты, активные продукты тиобарбитуровой кислоты, основания Шиффа. Уровень содержания ПОЛ в неокортексе контрольных 14-суточных крыс принимали за 100 %.

(* - статистически достоверные отличия между контрольными и опытными животными, $p < 0,05$).

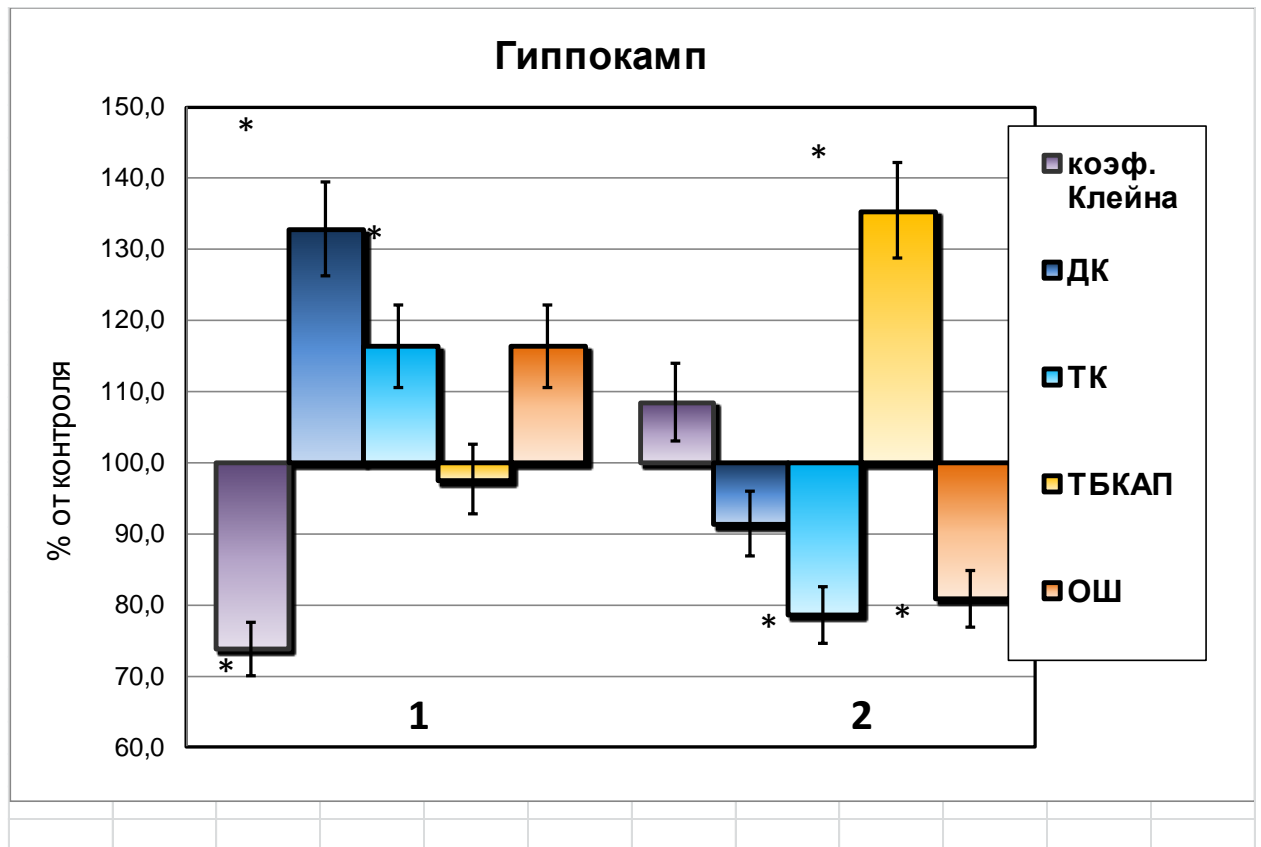


Рис. 54. Динамика изменения содержания продуктов ПОЛ в гиппокампе 14-суточных крыс, подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии на 14-16-е (1) и 17-19-е (2) сутки гестации (коэффициент Клейна, диеновые конъюгаты, триеновые конъюгаты, активные продукты тиобарбитуровой кислоты, основания Шиффа. Уровень содержания ПОЛ в гиппокампе контрольных 14-суточных крыс принимали за 100 %. (*-статистически достоверные отличия между контрольными и опытными животными $p < 0,05$)

Пренатальная гипоксия, предъявляемая крысам на 14-16-е сутки беременности, вызывает у взрослых крыс долгосрочные изменения системы перекисного окисления липидов в структурах головного мозга наиболее чувствительных к гипоксическим воздействиям (гиппокамп, неокортекс). Эти изменения носят различный характер в гиппокампе и неокортексе (Рис. 55, 56). В отличие от гиппокампа в неокортексе обнаружено снижение уровня коэффциент Клейна - показателя окисленности липидов мембран на (35 %), диеновых конъюгатов (на 32,5%) и конечных подуктов – оснований Шиффа (на 41%). В то же время содержание триеновых конъюгатов и ТБКАП в неокортексе значительно превышало контрольные уровни (179,7 и 161,6 % соответственно). В гиппокампе взрослых крыс, перенесших гипоксию на 14-16-е сутки

гестации содержание всех продуктов перекисного окисления липидов выше контрольных значений.

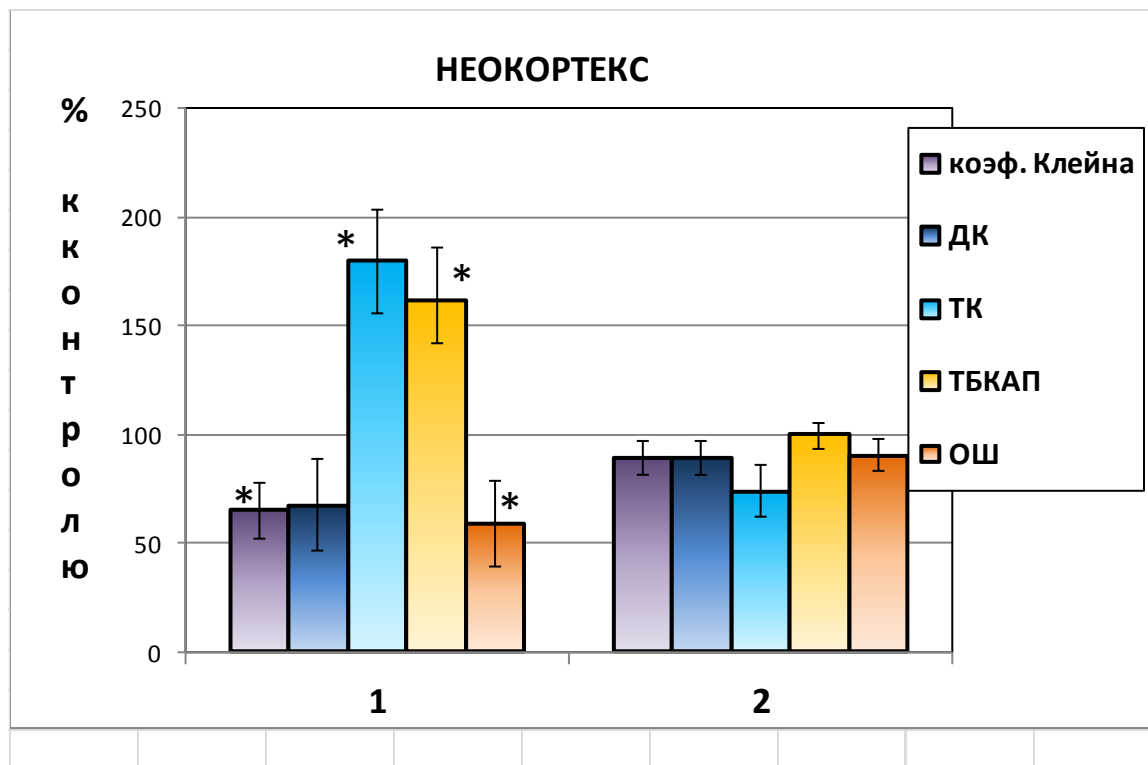


Рис. 55. Динамика изменения содержания продуктов ПОЛ в неокортексе 90-суточных крыс, подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии на 14-16-е (1) и 17-19-е (2) сутки гестации (коэффициент Клейна, диеновые конъюгаты, триеновые конъюгаты, активные продукты тиобарбитуровой кислоты, основания Шиффа). Уровень содержания ПОЛ в гиппокампе контрольных 90-суточных крыс принимали за 100 %. (*-статистически достоверные отличия между контрольными и опытными животными $p < 0,05$)

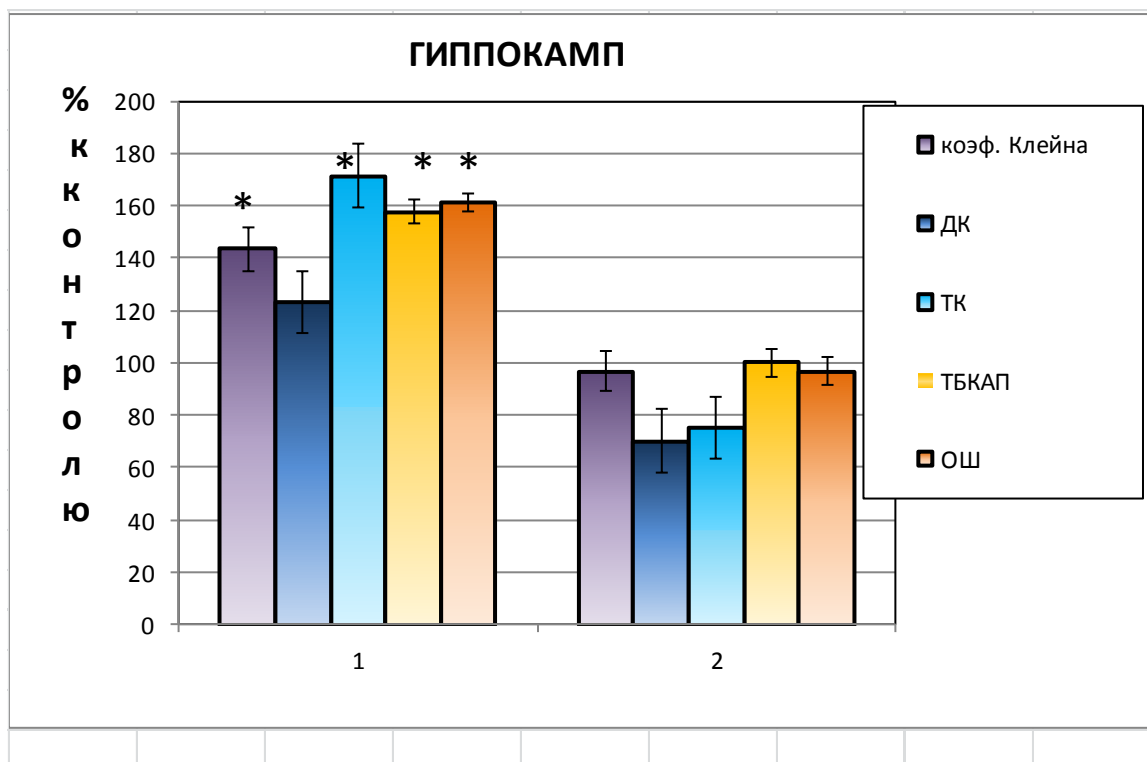


Рис. 56. Динамика изменения содержания продуктов ПОЛ в гиппокампе 90-суточных крыс, подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии на 14-16-е (1) и 17-19-е (2) сутки гестации (коэффициент Клейна, диеновые конъюгаты, триеновые конъюгаты, активные продукты тиобарбитуровой кислоты, основания Шиффа). Уровень содержания ПОЛ в гиппокампе 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. Достоверные изменения уровня ПОЛ были обнаружены в гиппокампе 14-суточных крыс по двум показателям, а именно снижение триеновых конъюгатов и повышение продуктов ТБКАП (Рис. 56).

Таким образом, тяжелая гипобарическая гипоксия, предъявляемая на 14-16-е сутки гестации, индуцирует выраженную длительную активацию процессов перекисного окисления липидов в гиппокампе и неокортексе крыс, вовлекаемых, в механизмы структурно-функционального повреждения чувствительных к кислородному голоданию образований мозга.

3.12. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на уровень пептидных антиоксидантов в гиппокампе крыс.

При гипоксии важную роль в адаптации нейронов мозга к недостатку кислорода играет соотношение активностей про- и антиоксидантных системы. Особую роль в повреждении нейронов мозга при гипоксии играет окисдательный стресс, связанный с гиперпродукцией активных форм кислорода. Повышенная уязвимость для окисдательного стресса незрелого мозга по сравнению со зрелым объясняется двумя причинами: для незрелого мозга характерна низкая активность системы антиоксидантной защиты и высокое содержание свободных ионов железа. Антиоксидантная защита клеток обеспечивается несколькими ферментами, включая супероксиддисмутазу (SOD), которая присутствует в виде Cu,Zn-SOD в цитоплазме и Mn-SOD в митохондриях, а также тиоредоксинами 1 и 2.

Представлялось интересным сопоставить данные относительно изменений экспрессии пептидных антиоксидантов в гиппокампе крыс, полученные с использованием такой же модели гипобарической гипоксии.

3.12.1. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на уровень пептидного антиоксиданта тиоредоксина-1 в гиппокампе крыс в различные периоды постнатального онтогенеза.

Одним из ключевых эндогенных антиоксидантов является цитозольный тиоредоксин-1.

В гиппокампе у крысят, перенесших гипоксию в пренатальном периоде, исследовали уровень экспрессии антиоксидантного белка тиоредоксина-1 на 3- и 14-сутки после рождения, а также по достижению ими взрослого возраста (85-90 дней после рождения). В качестве контроля к каждой из трёх групп использовались крысы такого же возраста, не подвергавшиеся пренатальной гипоксии. Уровень экспрессии Trx-1 определяли в структурах гиппокампа иммуноцитохимическим методом. Иммунореактивность к тиоредоксину-1 оценивалась по двум критериям: общему количеству иммунореактивных к тиоредоксину-1 нейронов и числу интенсивно экспрессирующих его нейронов.

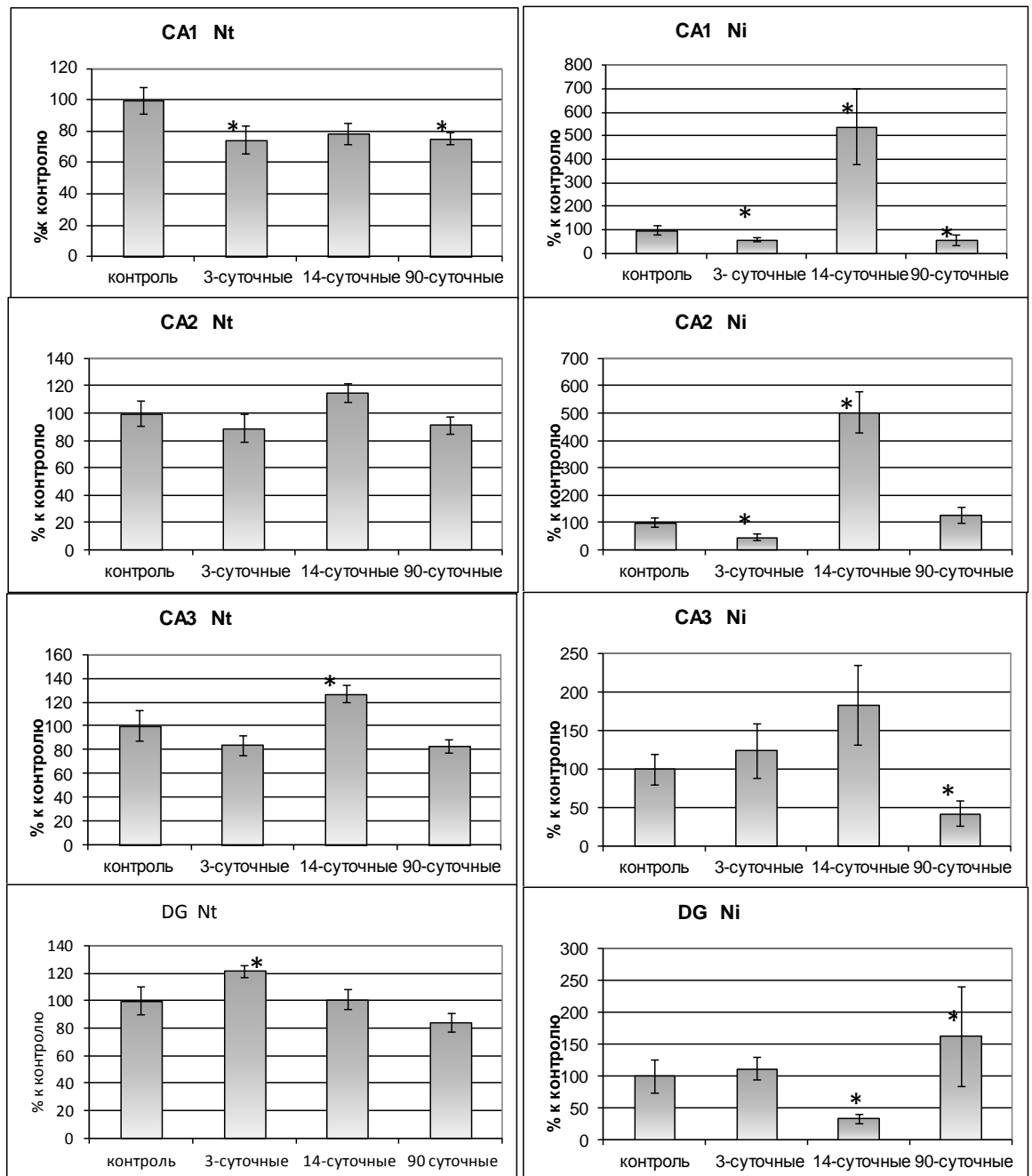


Рис. 57. Изменения общего числа (Nt) и интенсивно иммунореактивных к Trx-1- клеток (Ni) в различных образованиях гиппокампа у 3-, 14- и 90- сутокных крыс, перенесших тяжелую гипобарическую гипоксию на 14-16 сутки гестации в процентах к контролю. Статистическая достоверность (* $P < 0.05$)

На 3-и сутки жизни у переживших пренатальную гипоксию крысят отмечалось статистически достоверное (Рис. 58. $P < 0.05$) снижение общего числа экспрессирующих Trx-1 клеток (Nt) в области CA1 ($Nt = 74 \pm 9\%$) и числа интенсивно экспрессирующих Trx-1 клеток (Ni) в области CA2 ($Ni = 47 \pm 13\%$) по сравнению с контрольными крысятами того же возраста (рис. 1-3). На уровне статистически недостоверной, но устойчивой тенденции ($0.05 < P < 0.1$) отмечалось также снижение Ni в CA1 ($Ni = 60 \pm 8\%$), и повышение Nt в DG ($Nt = 122 \pm 4\%$). В остальных случаях (Nt в CA2 и CA3, Ni в CA3 и DG) показатели

экспрессии мало отличались от контрольных (рис. 1-3). На 14-е сутки отмечалось статистически достоверное ($P < 0,01$) снижение Ni в DG ($Ni = 34 \pm 7\%$) и повышение Ni в CA2 ($Ni = 505 \pm 74\%$) (рис. 3). При этом на уровне тенденции ($0,05 < P < 0,1$) отмечалось снижение Nt в CA1 ($Nt = 79 \pm 7\%$) и повышение Nt в CA3 ($Nt = 127 \pm 7\%$) (рис. 57).

В гиппокампе взрослых крыс (80 – 90-е сутки жизни) статистически достоверно снижены по отношению к контролю были Nt в CA1 ($Nt = 75 \pm 4\%$; $P < 0,01$) и Ni в CA3 ($Ni = 43 \pm 17\%$; $P < 0,05$) (рис.). На уровне тенденции ($0,05 < P < 0,1$) отмечалось также снижение Nt в DG ($Nt = 84 \pm 7\%$). В CA2 как Nt , так и Ni практически не отличались от контроля (рис. 57).

Иммуноцитохимическое исследование показало, что перенесённая в пренатальном периоде (14 – 16-е сутки) развития гипоксия существенно модифицирует уровень экспрессии Trx-1 в нейронах гиппокампа крыс в постнатальном онтогенезе. Степень и направленность изменений иммунореактивности Trx-1 в различных областях гиппокампа различны и зависят от срока постнатального онтогенеза.

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) иммунореактивности Trx-1 на 3-и сутки жизни, затем её заметного повышения к 14-м суткам после рождения (Рис. 58). Во взрослом состоянии вновь наблюдается снижение иммунореактивности. Эта тенденция, однако, более или менее прослеживается только в областях Аммонова рога (CA1, CA2, CA3), но не в зубчатой извилине (DG), где наблюдается иная динамика, притом различная для общего числа иммунопозитивных клеток и интенсивно окрашенных клеток.

В отличие от гипоксии, предъявляемой на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза, гипоксическое воздействие на 17-19-е сутки гестации не приводило к значимым изменениям уровня иммунореактивности тиоредоксина 1.

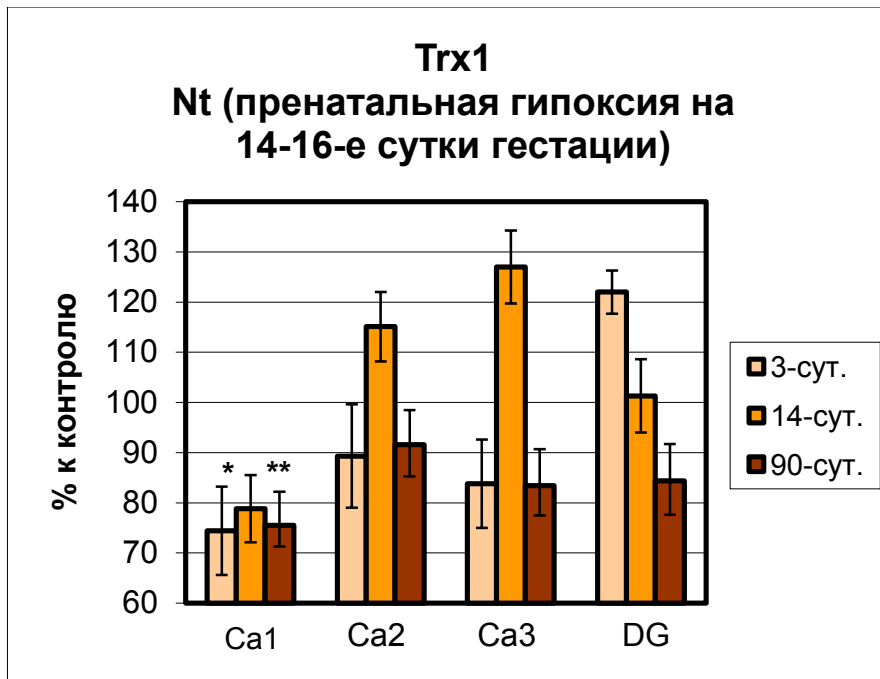


Рис. 58. Изменения общего числа Trx-1-иммунореактивных клеток (Nt) в различных образованиях гиппокампа крыс у 3-, 14- и 90- суточных крыс, перенесших тяжелую гипобарическую гипоксию на 14-16 сутки гестации в процентах к контролю. Статистическая достоверность ($p < 0.05$): * - по сравнению с контролем.

3.12.2. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на уровень пептидных антиоксидантов (тиоредоксина-2 и супероксиддисмутаза) в нейронах гиппокампа крыс, достигших взрослого возраста.

Обнаружено, что гипоксия, предъявляемая в пренатальном онтогенезе (на 14-16-е сутки гестации) значительно модифицирует экспрессию исследованных пептидных антиоксидантов (тиоредоксин-2 (Trx2), Cu, Zn-супероксиддисмутаза (Cu, Zn-SOD) Mn-супероксиддисмутаза (Mn-SOD) в гиппокампе взрослых крыс.

Общее количество иммунореактивных клеток (Nt) Cu, Zn-SOD в гиппокампе крыс, подвергавшихся пренатальной гипоксии составляло по сравнению с контролем 85% в CA1, 86 % в CA2, 88% в CA3 областях гиппокампа и 106% в зубчатой извилине (рис. 59).

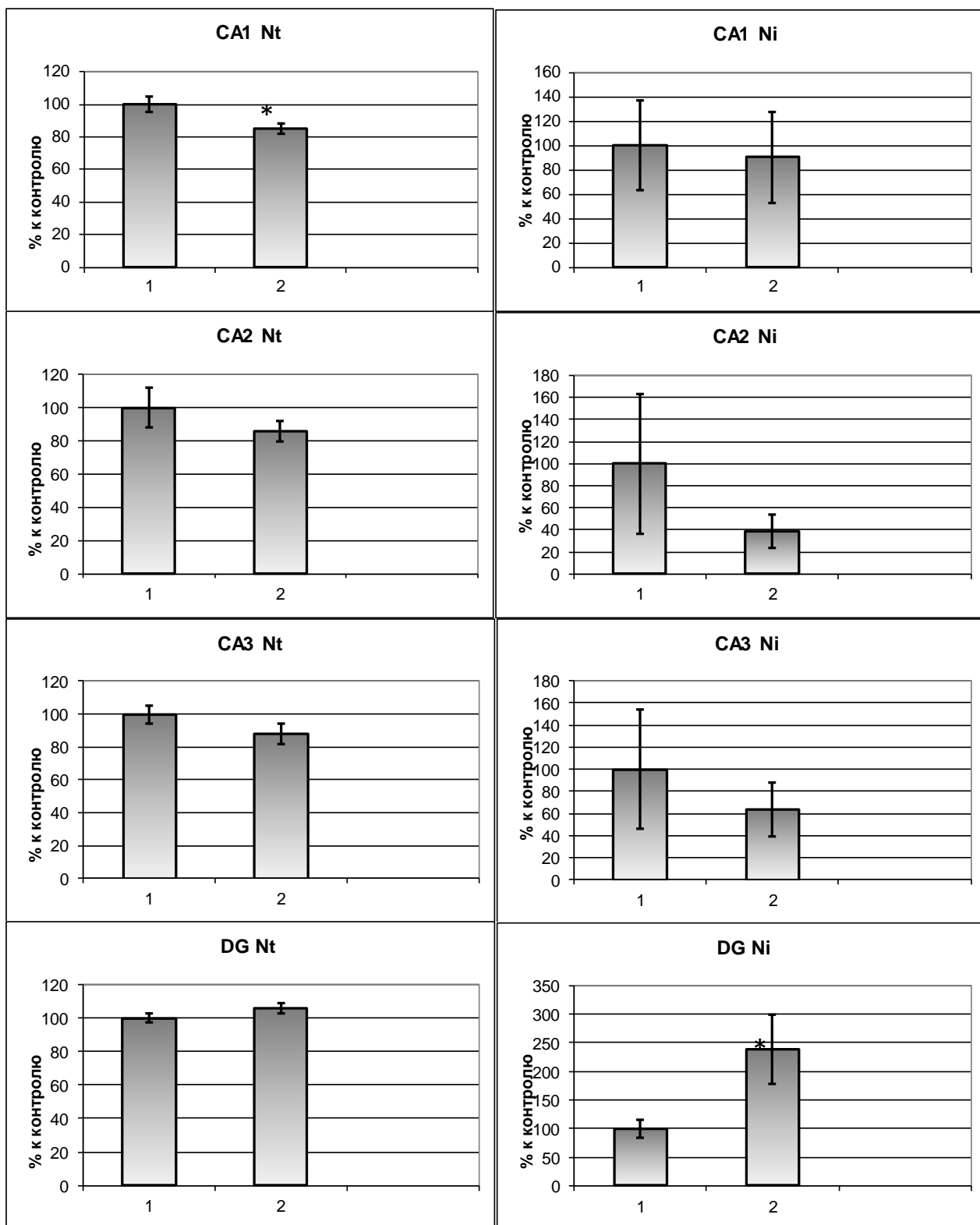


Рис. 59. Изменения общего числа (Nt) и интенсивно иммунореактивных к Cu, Zn-SOD клеток (Ni) в различных образованиях гиппокампа у 90-суточных крыс (2), перенесших тяжелую гипобарическую гипоксию на 14-16 сутки гестации в процентах к контролю (1). Статистическая достоверность (*P<0.05)

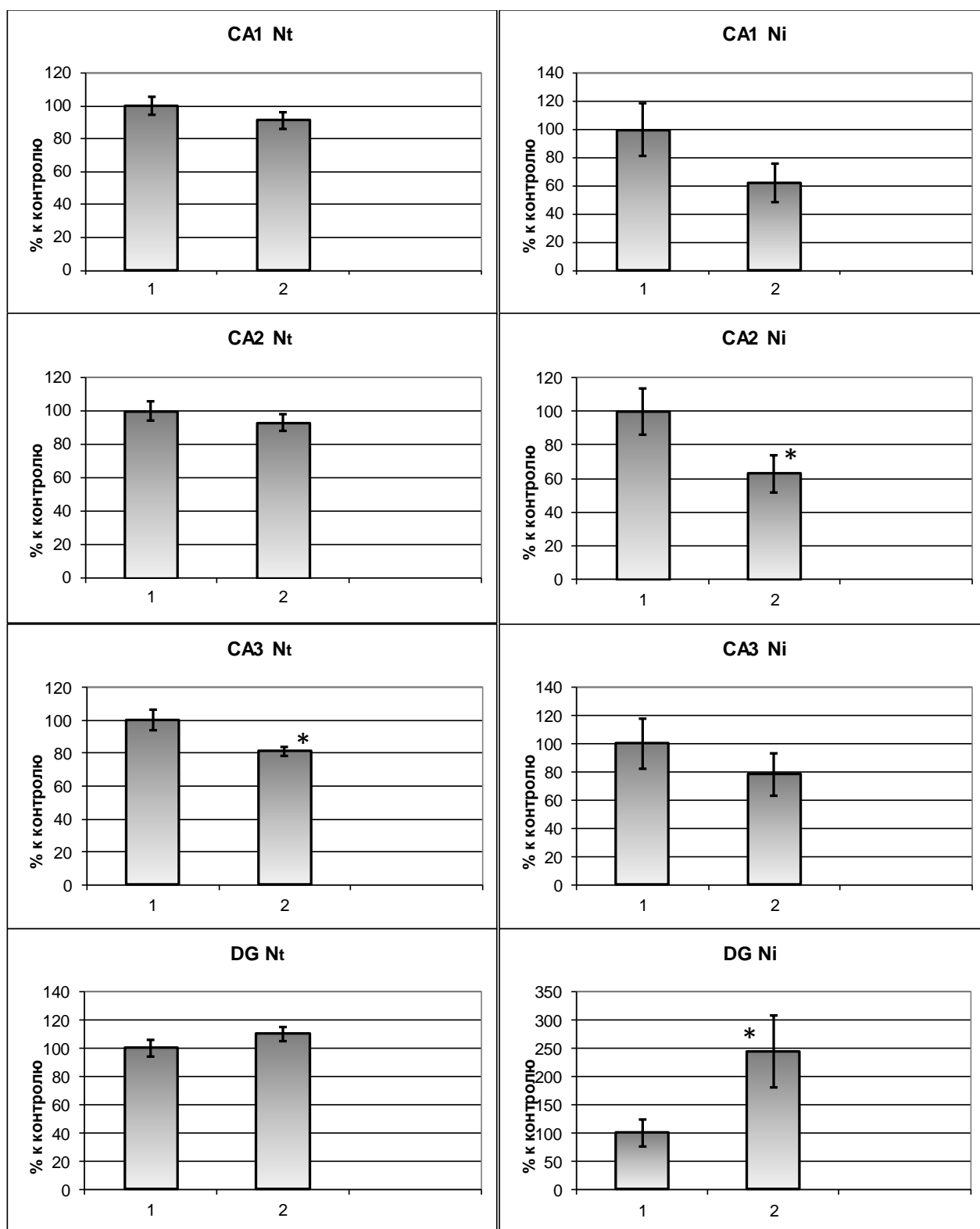


Рис. 60. Изменения общего числа (Nt) и интенсивно иммунореактивных к Mn-SOD клеток (Ni) в различных образованиях гиппокампа у 90-суточных крыс (2), перенесших тяжелую гипобарическую гипоксию на 14-16 суток гестации в процентах к контролю (1). Статистическая достоверность (* $P < 0.05$)

Число интенсивно иммунореактивных к Cu, Zn-SOD нейронов (Ni) составляло по отношению к контролю соответственно: 90% в CA1, 39% в CA2, 64% в CA3 и 238 в DG. Таким образом, можно отметить, что общая тенденция влияния пренатальной гипоксии на экспрессию Cu, Zn-SOD приводит к ее уменьшению, кроме двух случаев: Ni в DG ($p=0,04$) и Nt в CA1 ($p=0,03$) области гиппокампа достоверно выше контрольных значений.

Общее число Mn-SOD иммунопозитивных клеток опытных крыс достоверно не отличались от контроля (Рис. 60). Однако, вызванные пренатальной гипоксией изменения количества интенсивно окрашенных нейронов (Ni) гиппокампа по направленности модификацию экспрессии Cu, Zn-SOD, и составляли соответственно 62% в CA1, 63% в CA2 ($p=0,045$), 78% в CA3 ($p=0,01$) и 244% в DG ($p=0,04$) (рис. 60).

Общее число Trx-2 иммунопозитивных клеток (Nt) в гиппокампе крыс, подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии на 14-16-е сутки гестации составляло 116% в CA1, 93% в CA2, 70% ($p=0,03$) в CA3 и 106 % в DG по сравнению с контролем (рис. 61). Количество интенсивно иммунореактивных к Trx-2 нейронов (Ni) гиппокампа в отличие от других исследованных пептидных антиоксидантов значительно превышало контрольный уровень и составляло соответственно 200% в CA1, 122% в CA2, 720% ($p=0,04$) в CA3 и 1000 ($p=0,014$) в DG (рис. 61).

Таким образом, тяжелая гипобарическая гипоксия, предъявляемая животным на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза, вызывает длительную модификацию экспрессии протестированных антиоксидантов. Наибольшие изменения наблюдаются в областях Аммонова рога (CA1, CA2, CA3), но не в зубчатой извилине (DG) (Рис. 62). Направленность изменений зависит от типа антиоксиданта и области гиппокампа. Более значимы изменения количества интенсивно иммунопозитивных клеток. Однако направленность и степень изменений очень неоднородны и, скорее всего, отражают индивидуальные особенности животных.

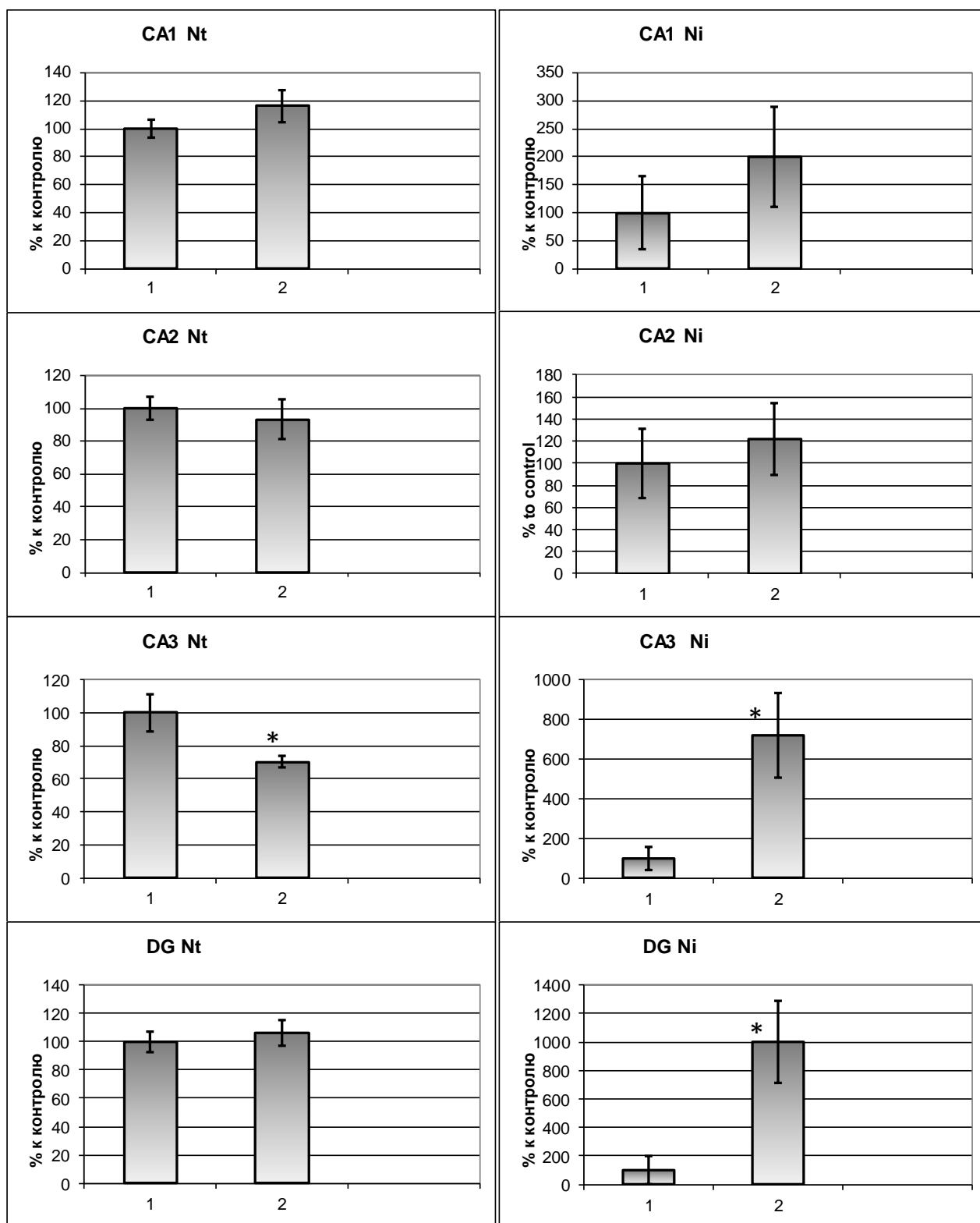


Рис. 61. Изменения общего числа (Nt) и интенсивно окрашенных (Ni) Trx-2 иммунореактивных клеток в различных образованиях гиппокампа у 90-суточных крыс (2), перенесших тяжелую гипобарическую гипоксию на 14-16 сутки гестации в процентах к контролю (1). Статистическая достоверность (* $P < 0.05$)

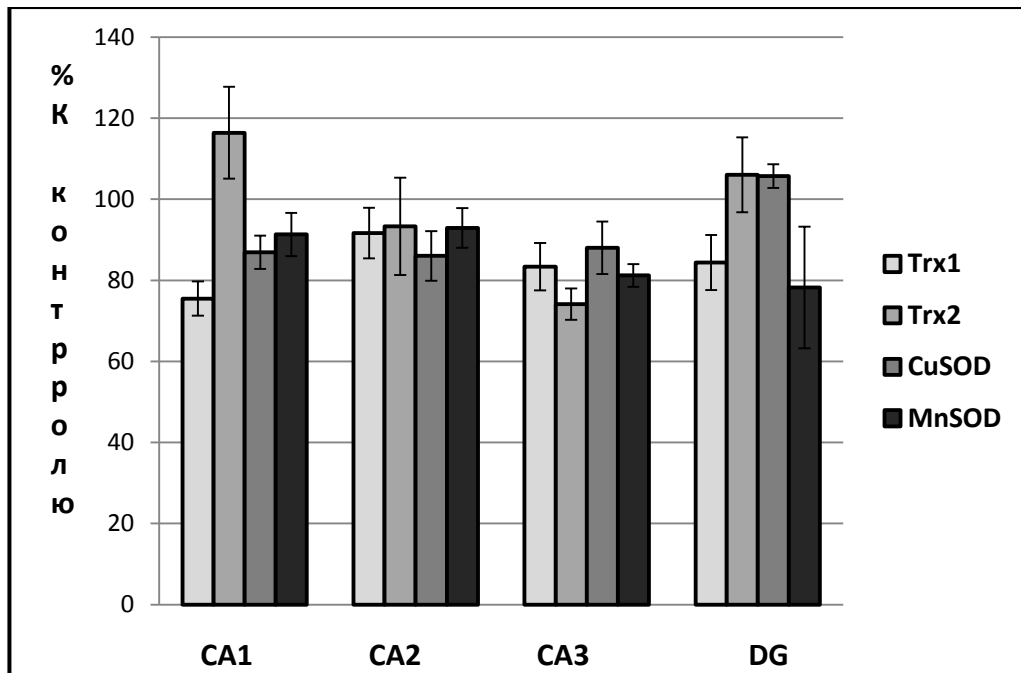


Рис. 62. Уровень общего количество иммунопозитивных клеток к Trx1, Trx2, Cu-Zn-SOD, Mn-SOD в гиппокампе крыс, перенесших тяжелую гипобарическую гипоксию на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза, по сравнению с контролем. (Суммарный рисунок).

3.13. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии и дексаметазона на уровень апоптоза у крыс в раннем постнатальном онтогенезе.

Процессы апоптоза в развивающемся мозге (при нормальных физиологических условиях) происходят в основном во время внутриутробного развития, в начале постнатального периода наблюдается снижение уровня апоптоза, достигающего минимальных значений во взрослом мозге (Vexler and Ferriero, 2001; Marks and Berg, 1999).

Проводилась детекция поврежденных по типу апоптоза нейронов в мозге 20-суточных эмбрионов подвергавшихся пренатальной гипоксии и действию дексаметазона на 14-11116-е сутки развития, с применением TUNEL метода. Этот метод позволяет выявлять «ранние» апоптотические клетки с фрагментацией ДНК, у которых еще слабо выражены морфологические изменения, характерные для апоптоза (Sandrs and Wride, 1996).

У животных, подвергавшихся гипоксии на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза, обнаружено достоверное увеличение TUNEL-позитивных клеток в неокортексе.

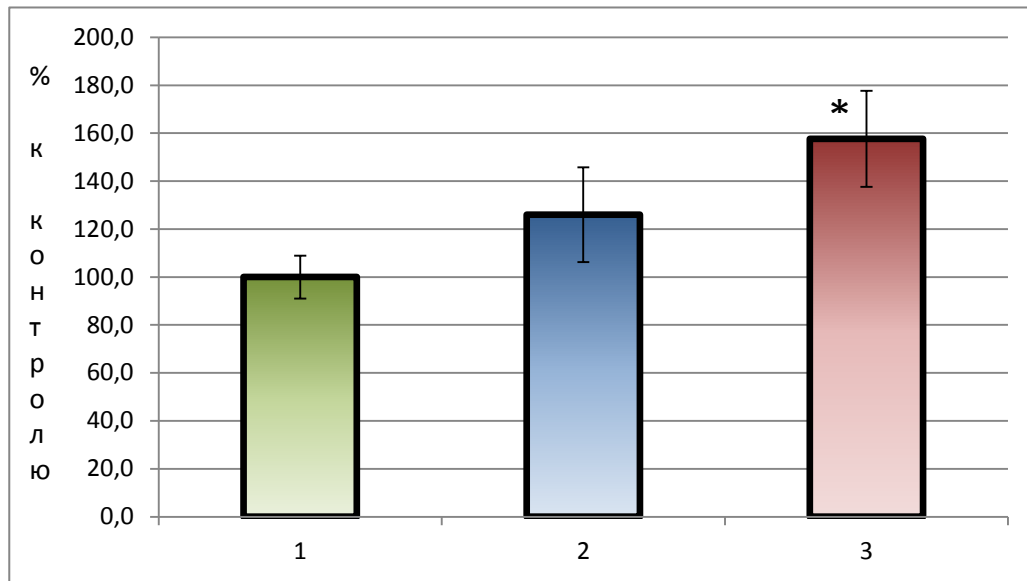


Рис. 63. Количество иммунопозитивных TUNEL-клеток в неокортексе 20-суточных эмбрионов крыс подвергавшихся действию дексаметазона (2) и тяжелой гипоксии (3) на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза по сравнению с контролем (1). Статистическая достоверность (* $P < 0.05$).

Исследования фрагментации ДНК с помощью электрофореза показали, что в мозге животных контрольной группы, на 20е сутки пренатального и 7е сутки постнатального развития выявлено развитие апоптотических процессов, проявляющихся в наличии на электрофореграмме фрагментов ДНК размером 250 пар оснований (20е и 7е сутки) и 1500 пар оснований (7е сутки) (Рис. 64, 1). Интенсивность апоптотических процессов на 7е сутки постнатального развития выше, чем на 20е сутки пренатального развития (Рис. 64, б), что согласуется с данными литературы.

В мозге животных, переживших тяжелую гипоксию на 14-16е сутки пренатального развития, к 20-м суткам наблюдается интенсификация апоптотических процессов по сравнению с контролем (увеличение количества фрагментов ДНК размером 250 пар оснований, появление фрагментов ДНК большей молекулярной массы) (Рис. 64, 4). К 7м суткам постнатального развития в данной группе животных апоптотические процессы не детектируются, что, возможно, указывает на торможение процесса созревания мозга по сравнению нормой (Рис. 64, 8). У потомков крыс, подвергавшихся действию гипоксии на 17-19-е сутки, процессы апоптоза усиливаются по сравнению с контролем на 7-е сутки постнатального онтогенеза, но практически «заторможены» в пренатальном периоде. У крыс, подвергавшихся действию дексаметазона в пренатальном периоде, апоптотические процессы в исследованные сроки практически не детектируются.

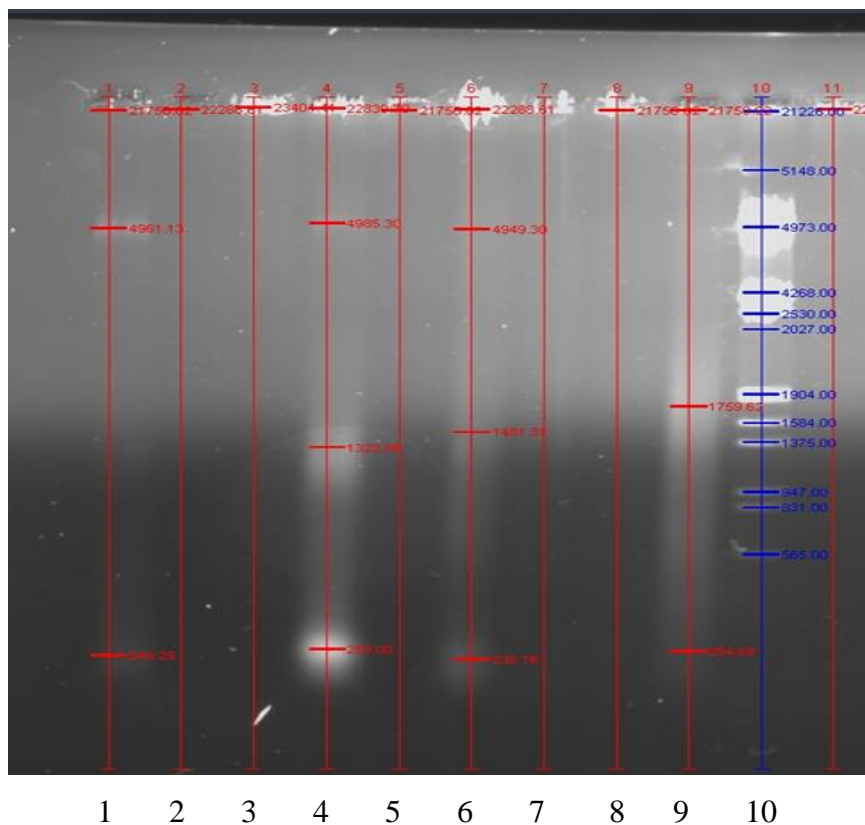


Рис. 64. Электрофорез фрагментов ДНК.

Электрофореграмма (1-5) 20-суточные эмбрионы 1. Контроль; 2. дексаметазон на 14-16-е сутки онтогенеза; 3. дексаметазон на 17-19-е сутки; 4. пренатальная гипоксия на 14-16-е сутки онтогенеза; 5. пренатальная гипоксия на 17-19-е сутки.

(6-9) 7-суточные крысы: 6. Контроль; 7. дексаметазон на 14-16-е сутки онтогенеза; 8. пренатальная гипоксия на 14-16-е сутки онтогенеза; 9. пренатальная гипоксия на 17-19-е сутки.

10 маркер молекулярных масс

Представленные в этой главе результаты убедительно свидетельствуют о том, что тяжелая гипобарическая гипоксия и введение дексаметазона в пренатальном периоде развития приводят к длительным нарушениям соматического развития, формирования сенсомоторных реакций, поведения и способности к обучению крыс в постнатальном онтогенезе. Все эти нарушения обусловлены вызванными этими повреждающими факторами изменениями нейроэндокринной регуляции, активности систем внутриклеточной регуляции (кальциевой и фосфоинозитидной), соотношения про- и антиоксидантных систем мозга крыс. Степень и направленность изменений зависят от типа и сроков применяемых воздействий.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе проводили модельные эксперименты, в которых самок крыс подвергали воздействию гипоксии или синтетического гормона дексаметазона в последней трети беременности и изучали последующее постнатальное развитие их потомства.

Гипоксическая экспозиция (соответствующая подъему на высоту 11 км над уровнем моря) или инъекции дексаметазона проводились в первой или второй половине периода основного органогенеза или в период раннего гистогенеза, а именно на 11-13-е, 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального онтогенеза. Оценивались ближайшие и отдаленные последствия пренатальной гипоксии. Влияние пренатальной гипоксии и введения дексаметазона проявлялись на самых ранних этапах постнатального развития.

Эффекты перинатальной гипоксии не всегда соответствуют степени ее тяжести. Для развития организма первостепенное значение имеют сроки онтогенеза, в которые произошла экспозиция гипоксии. В течение пренатального и раннего постнатального онтогенеза выделяют несколько критических периодов, когда организм становится особенно восприимчивым к неблагоприятным внешним воздействиям (Кассиль и др., 2000; Golan et al., 2006). Нарушения, обусловленные действием повреждающих факторов во время раннего онтогенеза, могут приводить к возникновению не только грубых дефектов развития (врожденные аномалии – уродства), но и вызывать функциональные расстройства деятельности клеток, органов и систем всего организма.

Исследования последних лет показали, что лечение матерей дексаметазоном в период беременности может приводить к нарушениям в развитии новорожденных к возникновению нервно-психических заболеваний в дальнейшей жизни. Несмотря на это дексаметазон до сих пор применяется в клинической практике при лечении беременных женщин. Согласно нашим исследованиям и данным литературы пренатально введенный дексаметазон влияет как на физиологические функции, так и на поведение животных. При этом характерны задержка роста и снижение массы мозга, долгосрочные изменения нервозности поведения, двигательной активности, активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (Weinstock, 2001; Welberg et al., 2001; Neal et al., 2004; Kapoor et al., 2007; Braun et al., 2009). Обнаружены нарушения способности к обучению и памяти в различных тестах, которые авторы связывают с нарушениями развития гиппокампа (Brabham et al., 2000; Kamphuis et al., 2003; Kreider et al., 2005; Hauser et al., 2009). Степень и направленность нарушений при применении дексаметазона зависят от дозы и перинатального периода введения препарата (Kreider et al., 2005a, б, 2006).

Поведение человека и животных зависит от степени зрелости, состояния и особенностей центральной нервной системы (ЦНС). Ничто так четко не характеризует уровень развития живого организма, как морфологические и функциональные особенности нервной системы. Последовательное описание динамики морфофункционального состояния мозга в ходе онтогенеза составляет необходимый этап анализа факторов, влияющих на развитие поведения.

Основная задача первого этапа настоящего исследования заключалась в том, чтобы изучить влияние пренатальной гипоксии и дексаметазона на соматическое и сенсомоторное развитие, поведение и способность к обучению крыс в раннем постнатальном онтогенезе. Оценка развития крыс первого месяца жизни осуществлялась на основе применения процедуры тестирования с использованием, так называемой батареи тестов (Зарайская и др., 2000).

В результатах этих исследований было сделано заключение о том, что соматическое и сенсомоторное развитие крысят, матери которых подвергались воздействию тяжелой гипобарической гипоксии или дексаметазона во время беременности в значительной мере замедленно. 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). Здесь особенно важно отметить, что влияние и гипоксии и дексаметазона на соматическое и моторное развитие крысят в первые дни жизни, не зависело от сроков ее экспозиции в пренатальном онтогенезе. То есть отставание в развитии одинаково проявлялось при воздействии гипоксии в конце второй и в начале и конце третьей недели беременности. Нами не было обнаружено достоверных различий между показателями соматического развития потомков крыс, подвергавшихся воздействию тяжелой гипобарической гипоксии на 11-13-е, 14-16-е или 17-19-е сутки беременности, но оно в значительной мере было замедлено. Так масса тела экспериментальных крысят на 3-е сутки жизни в среднем была на 20-25% меньше, чем у контрольных животных. Различия в массе сохранялись и в более старшем возрасте. Можно предполагать, что данный возрастной интервал соответствует критическому периоду в развитии плода. В настоящее время проблема новорожденных детей с низкой и экстремально низкой массой тела является одной из ключевых в неонатологии и педиатрии в целом (Пальчик и Шабалов, 2001). Эти дети составляют группу риска для формирования различных хронических заболеваний, включая бронхолегочную дисплазию, лейкомаляцию, ретинопатию, которые со временем могут привести к инвалидности. Очень часто у этих детей встречается диабет 2 типа. В формировании сахарного диабета ключевую роль играет стресс.

В нашем исследовании наиболее значительное отставание в увеличении массы тела было обнаружено у животных, испытавших воздействие дексаметазона на 14-16-е сутки гестации. Действие дексаметазона, который оказывает столь значительное влияние на темп роста крысят в пренатальном периоде, опосредуется через связывание с глюкокортикоидными рецепторами. Эти данные хорошо согласуются с представлением о ведущей роли глюкокортикоидов и ГГАС в механизмах формирования нарушений развития.

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. Похожая тенденция задержки развития у новорожденных грызунов, подвергавшихся пре- или перинатальной гипоксии по сравнению с контрольной группой показана и для других сенсомоторных рефлексов (Lubics et al., 2005; (Grojean et al., 2003; Lubics et al., 2005; Ten et al., 2003; Golan et al., 2004).

В наших исследованиях обнаружено, что действие гипоксии и дексаметазона в пренатальном периоде вызывает задержку проявления ряда рефлекторных реакций, например реакции избегания наклонной плоскости. Так, оценивая угол поворота крысят, помещенных на наклонную плоскость, обнаружено, что на 7-е сутки жизни перенесшие гипоксию крысята достоверно отличаются от контрольных. В возрасте 9 суток различий по этому показателю между экспериментальными и контрольными животными мы не обнаруживали. То есть и у контрольных и экспериментальных крысят формирование данной рефлекторной реакции завершилось. Важно, что экспериментальные 7- и 9-суточные крысята поворачивались значительно медленнее, чем контрольные животные того же возраста, что может свидетельствовать об ослаблении двигательной активности у подвергавшихся воздействию пренатальной гипоксии и дексаметазона крысят. На это указывают также результаты тестирования реакции удержания на канате. Этот эффект оказался достаточно стойким и сохранялся по меньшей мере до 14 дня жизни. Сходные симптомы, т.е. ослабление двигательной активности, часто наблюдаются и у детей, перенесших перенатальную гипоксию (Айламазян, 2014).

Анализ динамики развития сенсомоторных характеристик, однако, 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.

Обусловленные действием гипоксии и дексаметазона нарушения сенсомоторных реакций обнаруживаются не сразу после рождения крысят, а лишь на второй недели жизни. У крысят, подвергавшихся воздействию гипоксии в различные сроки пренатального онтогенеза, выявлено существенное отставание в развитии реакции «избегания наклонной плоскости» и в тесте «избегания края (обрыва) плоскости», который помогает новорожденным ориентироваться на краю открытого пространства. Важно отметить, что нарушения проявляются в увеличении времени реакции. При этом признаки дефектов развития, вызванные воздействием гипоксии в различные сроки пренатального онтогенеза, проявлялись достаточно долго (до 9-го дня). Похожие результаты были показаны в исследованиях с применением и других форм гипоксического воздействия в пре- и перинатальном периоде развития. Рефлекс «избегания края (обрыва) плоскости», значительно замедляется у животных, перенесших пре- или перинатальную гипоксию (Ten et al., 2003). Несмотря на задержку в развитии, важно отметить, что со временем происходит полное становление всех сенсомоторных характеристик поведения.

Таким образом, эффект пренатальной гипоксии на соматическое состояние, рефлекторную активность крысят в первые дни жизни не зависел от сроков ее воздействия. Иные результаты были получены при исследовании влияния пренатальной гипоксии на способность к обучению крыс раннего возраста.

В ранее проведенных исследованиях представлено большое количество доказательств о возможности выработки условных рефлексов на запаховые раздражители у незрелорождающихся млекопитающих уже в первые часы и дни жизни (Кассиль, Гулина, 1987; McCollum et al., 1997). Проведенные нами исследования выработки рефлекса на запаховые раздражители (мяты) у ювенильных (15-суточных) крыс показали, что в отличие от контрольной группы, крысята, пережившие гипоксию на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза не вырабатывали положительной реакции на запах мяты. И, напротив, у крысят, подвергавшихся воздействию гипоксии на 17-19-е сутки пренатального развития и в течение второй недели жизни находившиеся в клетках с экстрактом мяты, при последующем тестировании обнаружили достоверное увеличение уровня предпочтения запаха мяты. 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.

Изучение последствий влияния пренатальной гипоксии и введения дексаметазона на поведение взрослых животных было осуществлено на следующем этапе нашей работы.

Оценку влияния гипоксической экспозиции и введения дексаметазона самкам в конце третьей недели беременности, на двигательную, ориентировочно-исследовательскую и эмоциональную активность животных проводили в тестах «открытое поле» и приподнятый крестообразный лабиринт. Для выявления изменений в способности к обучению применяли следующие экспериментальные ситуации: водный лабиринт Морриса и тесты на формирование условной реакции пассивного избегания.

Анализ полученных результатов показал, что: 1) действие гипоксии и дексаметазона может проявляться различными нарушениями поведения; 2) гипоксия и дексаметазон влияют на формирование поведения в различные сроки беременности неодинаково.

В тесте «открытого поля» было обнаружено, что пренатальная гипоксия и введение дексаметазона на 14-16-е сутки приводят к повышению числа пересеченных квадратов у самцов крыс. При гипоксической экспозиции на 17-19-сутки в пренатальном периоде уровень горизонтальной двигательной активности у самцов не изменяется, а после введения дексаметазона в указанные сроки, снижается. В настоящем исследовании изменений в уровне двигательной активности у самок, испытавших воздействие гипоксии или дексаметазона в пренатальном периоде, выявить не удалось.

При мониторинге изменений активности крыс в тесте «открытого поля» были получены различные результаты в зависимости от времени воздействия дексаметазона. В ряде исследований показано, что пренатальное введение дексаметазона изменяет поведение крыс в «Открытом поле», однако результаты их часто противоречивы. Некоторые авторы показали, что введение дексаметазона в гестационном периоде приводило к снижению двигательной активности в " открытом поле " у взрослых крыс (Rayburn et al. 1997; Вайншток, 2001; Welberg et al., 2001; Nagano et al., 2008). Сходные данные были получены у крыс, подвергшихся пренатальному стрессу (Poltyrev et al., 1996; Vallee et al., 1997; Lehmann et al., 2000; Fujioka et al., 2001; Вайншток, 2001; Abe et al., 2007). С другой стороны, есть и другие исследования, описывающие повышенную двигательную активность в «открытом поле» у крыс после пренатального воздействия дексаметазона (Smith et al., 1975; Muneoka et al., 1997). Эти, казалось бы, противоречивые результаты, вероятно, связаны с различиями в сроках и дозировании дексаметазона. Большинство приведенных данных были получены с применением повторяющегося стресса или введения дексаметазона в течение всей беременности или последние недели беременности.

В настоящем исследовании были показаны разнонаправленные изменения локомоторной активности крыс самцов в «открытом поле», в отличие от самок, у которых

не наблюдалось изменений активности, что может свидетельствовать о том, что дексаметазон влияет на гормон-опосредованные механизмы развивающегося мозга. Обнаруженные половые различия поведения крыс в «открытом поле» после введения дексаметазона на 14-16-е сутки гестации согласуются с данными, полученными различными авторами при изучении последствий пренатального стресса (Beatty, et al., 1976; Blizard, et al., 1975; Weinstock et al., 2001; Vataeva et al., 2001; Ordyan, Pivina 2004; Romero, Chen, 200). Это подтверждается нашими предыдущими исследованиями о влиянии пренатальной блокады экспрессии серотонина на активность поведения самок и самцов крыс в «открытом поле» (Vataeva et al., 2007).

Воздействие на плод высокой дозы дексаметазона на 17-19-е сутки пренатального онтогенеза влияет на механизмы, которые отвечают за гиперактивность животных. Во время тестирования в «открытом поле» этот эффект может быть замаскирован повышенным уровнем тревожности при тестировании в «приподнятом крестообразном лабиринте». Кроме того введение дексаметазона в этот период (в отличие от 14-16-х суток гестации) не приводило к привыканию в тесте «открытого поля» при повторных тестированиях через 24 часа, что говорит о нарушениях механизмов торможения в клетках мозга.

При применении дексаметазона в период раннего развития затрагиваются различные механизмы. Часто влияние дексаметазона вызывает разнонаправленные изменения поведения в зависимости от пола животных. В «открытом поле» внутриутробное и неонатальное введение препарата приводит к гиперактивности у самок и снижению активности у самцов путем неоднозначного изменения активности системы возбуждающих аминокислот (Muneoka et al., 1997; Adena, et al., 2008; Kippin et al., 2008; Ambroggi et al., 2009 Vataeva et al., 2007). В то же время обнаруженные нарушения поведения могут быть связаны с взаимодействием дексаметазона и функцией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГН) (Weinstock, 200; Welberg, et al., 2001; Seckl, 2004; Oberlander et al., 2008).

Результаты наших экспериментов с использованием приподнятого крестообразного лабиринта подтвердили данные, полученные при тестировании крыс в тесте «открытое поле», свидетельствующие о том, что воздействие гипоксии на 14-16-е сутки в пренатальном периоде приводит к увеличению уровня двигательной активности у взрослых самцов крыс. Этот вывод основывается на достоверном увеличении числа переходов между темными рукавами, которое принимают за меру уровня двигательной активности при исследовании поведения крыс в приподнятом крестообразном лабиринте.

Достоверных влияний пренатальной гипоксии на уровень тревожности взрослых самцов крыс выявлено не было.

При введении дексаметазона самкам на 14-16-е сутки беременности отмечалось достоверное увеличение времени нахождения в открытых рукавах лабиринта у их потомков самцов, что может указывать на снижение уровня тревожности в данной группе крыс. Введение дексаметазона на 17-19-е сутки, напротив, приводило к увеличению уровня тревожности у самцов. Было обнаружено также, что в тесте приподнятого лабиринта самцы этой группы характеризуются повышенным уровнем двигательной активности, не выявленном в тесте «открытого поля». Можно предполагать, что высокий уровень тревожности маскирует проявление повышенной двигательной активности у животных этой группы в тесте «открытого поля». С учетом этих данных мы полагаем, что гиперактивность развивается у самцов, потомков самок, испытавших воздействие гипоксии на 14-16-е сутки беременности, и у самцов, потомков самок, получавших инъекции дексаметазона на 14-16-е или на 17-19-е сутки беременности.

Неоднократно высказывались предположения о существовании определенного «окна уязвимости» при пренатальном введении дексаметазона (Weinstock, 2000; Welberg, et al., 2001; Seckl, 2004; Oberlander et al., 2008), что находит отражение в различиях отклонений в зависимости от сроков введения препарата. Причем надо отметить, что «окна уязвимости» для дексаметазона и тяжелой гипобарической гипоксии не всегда совпадают.

С целью выявления нарушений в способности к обучению была проведена серия экспериментов с использованием водного лабиринта Морриса и тестов на формирование условной реакции пассивного избегания.

Существует целый ряд подходов к исследованию формирования у животного пространственных представлений. Некоторые связаны с оценкой ориентации животных в естественных условиях, другие же - с моделированием данного поведения в лабораторных условиях. Наиболее часто используются две методики — *радиальный и водный лабиринты*. Главным отличием между данными поведенческими тестами является то, что радиальный лабиринт основан на позитивном подкреплении, а водный на негативном.

В начале восьмидесятых годов шотландский исследователь Р. Моррис (Morris, 1984) предложил для изучения способности животных к формированию пространственных представлений использовать "водный лабиринт". Принцип метода заключается в следующем: животное (мышь или крысу) выпускают в бассейн с водой, из бассейна нет выхода, но имеется невидимая, вследствие замутнения воды, подводная платформа, которая может послужить убежищем: отыскав её, животное может выбраться из воды.

Животное вынимают из бассейна, а через некоторое время снова выпускают плавать, однако уже из другой точки периметра. Постепенно время, которое проходит от пуска животного до отыскания платформы, укорачивается, а путь упрощается. Это свидетельствует о формировании у него представления о пространственном расположении платформы, на основе внешних, по отношению к бассейну, ориентиров. Подобная мысленная карта может быть более или менее точной, а определить, в какой степени животное помнит положение платформы, можно, переместив ее в новое положение. В этом случае, время, которое животное проведет, плавая над старым местоположением платформы, будет показателем прочности следа памяти.

Создание специальных технических средств автоматизации эксперимента с водным лабиринтом и программного обеспечения для анализа результатов, позволило использовать такие данные для точных сравнений поведения животных в тесте. При этом можно было оценивать:

- динамику формирования пространственного навыка;
- стратегии поведения животного в ходе опыта;
- слабые отличия в поведении.

Такие возможности делают водный тест Морриса важным инструментом для изучения когнитивных функций.

В настоящее время существует множество вариаций процедуры тестирования в водном лабиринте Морриса, выявляющих различные аспекты процессов пространственной ориентации, обучения, краткосрочной и долгосрочной памяти. Также разработана процедура тестирования пространственной рабочей памяти.

Термин «рабочая память» впервые был предложен Дж. Миллером, И. Гелентером и К. Прибрамом в книге «Планирование и структуры поведения» в 1960 году («Plans and the Structure of Behavior»), однако начало изучения рабочей памяти было положено в работах Баддли и Хитча, которые в 1974 году предложили трехкомпонентную модель рабочей памяти. Согласно определению, данному А. Бэддли, рабочая память – это система, предоставляющая временное хранилище для информации и осуществляющая с ней манипуляции, необходимые для решений сложных когнитивных задач (Baddeley, 1997). Объем рабочей памяти ограничен, материал, не используемый в данный момент для решения поставленной задачи, либо переходит в долговременное хранилище, либо теряется. При тестировании животных в лабораторных условиях под термином рабочей памяти понимают хранение информации о принципе выполнения поставленной задачи в экспериментальных условиях на протяжении тестирования.

Одна из задач проводимых нами исследований состояла в изучении влияния гипоксии, перенесенной самками в различные сроки беременности, на способность их 3-месячного потомства к формированию навыка пространственного распознавания в водном лабиринте Морриса. Для выяснения роли гипотермии, как фактора влияющего на способность к обучению данного навыка животными контрольных и экспериментальных групп, их тестирование осуществлялось в условиях двух температурных режимов – при низкой и относительно высокой, «комфортной» температуре воды.

Показано, что при обучении крыс в водном лабиринте Морриса долгосрочные последствия пренатальной гипоксии обнаруживаются лишь у самцов. Выявляемые нарушения наиболее выражены у животных, испытывавшие воздействие гипоксии на 14-16-е сутки периода пренатального развития. Важным обстоятельством является также и то, что направленность выявляемых изменений зависит от условий тестирования. В жестких условиях (в наших опытах при температуре воды 16-17°C), пренатальное гипоксическое воздействие проявляется в улучшении показателей обучения, в менее жестких (при температуре воды 23-24°C) – ухудшении.

Были проведены также опыты с тестированием животных в водном лабиринте Морриса по протоколу, разработанному для выявления специфических нарушений рабочей памяти. Полученные данные свидетельствуют о дефиците рабочей памяти у самцов, матери которых подвергались воздействию гипоксии на 14-16-е, но не на 17-19-е сутки пренатального онтогенеза.

В представленной работе показано также влияние пренатально введенного дексаметазона на нарушения пространственного обучения в «лабиринте Морриса», что согласуется с данными исследователей, которые применяли дексаметазон для лечения беременных женщин на протяжении относительно длительного периода времени (Brabham, et al., 2000; Emgård et al., 2007; Noorlander, et al., 2008). В наших исследованиях показано, что наиболее значимые нарушения пространственного распознавания обнаруживаются у животных, которым вводили дексаметазон на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза. Однако применение дексаметазона не изменяло рабочую память, в отличие от тяжелой гипобарической гипоксии, пережитой крысами на 14-16-е сутки пренатального развития.

Известно, что механизмы, контролирующие обучение в лабиринте Морриса и условную реакцию пассивного избегания (УРПИ), различны, вместе с тем, обе эти формы обучения осуществляются при непосредственном участии гиппокампа (Florian. et al., 2004). Интересные попытки анализа гиппокампальных механизмов, опосредующих процессы обучения, содержатся в работах, выполненных с использованием мышей разных

инбредных линий (Дмитриева и др., 1983, Дмитриев и др., 1987, Schopke et al., 1991, Lipp et al., 1998). Особое внимание исследователей привлекло взаимодействие аксонов гранулярных нейронов зубчатой фассии (так называемых мшистых волокон) с пирамидными клетками поля СА3 гиппокампа. Описаны два проекционных поля аксонов гранулярных клеток зубчатой фассии - изменчивая по размеру зона интра- и инфрапирамидных окончаний и большая и более стабильная по размеру зона супрапирамидных окончаний. Показано, что способности к пространственной ориентации в тесте водного лабиринта Морриса и успешность обучения активному избеганию в челночной камере корреляционно связаны с размером зоны интра- и инфрапирамидных проекций от гранулярных клеток. В опытах с обучением в лабиринте Морриса выявлена положительная, а при обучении активному избеганию отрицательная корреляция между показателями обучения и размером этой зоны. Имеются также данные, что между размером гиппокампа и способностью к обучению УРПИ обнаруживается высокая отрицательная корреляция (Wimer et al., 1971).

По-видимому, гипоксия у самок и самцов приводит к неодинаковым изменениям функции гиппокампа, а также других структур, причастных к обучению. Какова природа этих изменений в настоящее время еще до конца не ясно. Гистологические исследования свидетельствуют о значительных поражениях нервных клеток различных структур головного мозга крыс, возникающих вследствие действия гипоксии в пренатальном периоде. Соответствующие поражения выявляются пренатально или непосредственно сразу после рождения (Журавин и др., 2001; Khozhai et al., 2004). Когда мозг достигает определенного уровня зрелости, морфологических нарушений нервных клеток не обнаружено (Дубровская и Журавин, 2008; Cai et al., 1999). Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что отклонения в поведении взрослых животных, подвергавшихся действию гипоксии в пренатальном периоде, очевидно, не обусловлены грубыми структурными повреждениями головного мозга. Они скорее связаны с разнообразными нейрохимическими нарушениями. Например, у потомков крыс, испытавших воздействие гипоксии во время беременности, обнаружены долгосрочные изменения в уровне функционирования катехоламинергических систем головного мозга (Perrin et al., 2004). Это интересно в том отношении, что они позволяют связать полученные нами результаты с данными других исследований, в которых было показано, что у крыс деплеция катехоламинов с помощью внутримозговой аппликации 6-гидроксидофамина приводит к улучшению показателей обучения в лабиринте Морриса в холодной воде (Selden et al., 1990). При тестировании в теплой воде достоверных

различий в характере обучения между животными данной группы и контролем выявить не удалось.

Методика условного рефлекса пассивного избегания (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. Существует несколько вариантов методики выработки УРПИ. Одна из часто используемых форм УРПИ — обучение животных в светло-темной камере, в которой затемненный и освещенный отсеки соединены дверцей, а пол затемненного отсека 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.

В нашей работе было изучено влияние тяжелой гипоксии, перенесенной самками в различные сроки беременности, на способность их потомства к обучению на примере выработки и воспроизведения УРПИ. Первоначально использовалась модификация теста, в которой выработка УРПИ проводилась в светло-темной камере. Достоверных различий УРПИ между самцами различных групп 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. Напротив, у самок, подвергавшихся гипоксии на 11-13-е и 17-19-е сутки гестации, 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. Сопоставление данных, полученных на самцах и самках, выявило также, что самки после воздействия гипоксии на 14-16-е сутки гестации по показателям обучения достоверно превосходили самцов, подвергавшихся указанному воздействию в те же сроки.

Сходные данные были получены на самцах, так же испытавших воздействие гипоксии в различные сроки в пренатальном периоде, но выработка УРПИ у которых проводилось по другой методике. И в этом случае не было выявлено нарушений процессов формирования и угашения УРПИ у самцов, перенесших гипоксию в

пренатальном периоде. Однако обнаружены значимые различия выраженности воспроизведения УРПИ при угашении у самцов, в пренатальном периоде подвергавшихся воздействию дексаметазона. Потомки крыс, получавших инъекции дексаметазона на 17-19-е сутки беременности, на протяжении процедуры угашения обнаружили стабильное сохранение более высокого уровня воспроизведения навыка УРПИ, когда величина такого показателя, как время замирания значимо превышала таковую у контрольных животных и крыс, матери которых получали инъекции дексаметазона на 14-16-е сутки беременности. У последних в условиях применения при обучении звукового сигнала угашение воспроизведения навыка происходило быстрее, чем в контроле.

В настоящем исследовании впервые проведен анализ процессов обучения и угашения УРПИ в зависимости от сроков воздействия гипоксии и дексаметазона в пренатальном периоде развития. Показано, что введение дексаметазона беременным самкам в начале или в конце последней недели беременности вызывала разнонаправленные изменения воспроизведения пассивных оборонительных реакций у их потомков - самцов. Гипоксическая экспозиция в те же сроки в пренатальном периоде не приводила к достоверным изменениям выработки и угашения УРПИ у взрослых самцов крыс. Данные, полученные в этой серии экспериментов, хорошо соотносятся с результатами тестирования животных в тесте приподнятого крестообразного лабиринта. Самцы крыс, испытавшие действие дексаметазона на 17-19-е сутки в пренатальном периоде, проявлявших повышенный уровень тревожности, демонстрировали нарушение угашения УРПИ и пролонгацию следа памяти о страхе. Противоположная тенденция обнаруживалась в поведении крыс, подвергавшихся воздействию дексаметазона на 14-16-е сутки, которые демонстрировали пониженный уровень тревожности и нарушение угашения УРПИ. Таким образом, показано, что существует определенная связь между уровнем тревожности и показателями формирования следа памяти на страх у крыс, подвергшихся воздействию дексаметазона в пренатальном периоде. Важно отметить, что, несмотря на множество работ, вопрос о связях между тревожностью и угашением УРПИ до конца еще не изучен (Holmes, 2003; Strekalova et al., 2005; Mineur et al., 2006; Jacobson, Cryan, 2007)

Нарушение угашения следов памяти на страх и неспособность пациентов тормозить проявления памяти о негативных событиях являются основными симптомами аффективных расстройств тревожно-депрессивного характера (Delgado et al., 2006; Hermans et al., 2006; Hofmann, 2008). Эти нарушения могут быть обусловлены искажением восприятия негативных событий, формированием патологических эмоциональных состояний или усилением персеверации паттернов оборонительного поведения (Kurylo,

2004; Ponnusamy et al., 2005). Проблема изучения аффективных расстройств, возможности профилактики и социальной адаптации у соответствующих пациентов в настоящее время приобрела особую актуальность. В зарубежной и отечественной литературе в последние годы можно выделить несколько экспериментальных моделей, позволяющих изучать патофизиологические и патогенетические механизмы возникновения тревожно-депрессивных расстройств. Возможность использования для этих целей тестов условной реакции пассивного избегания продемонстрирована достаточно убедительно (Lee et al., 2001; Дубровская и др., 2008)

Полученные нами данные свидетельствуют, что пренатальное применение дексаметазона может рассматриваться как фактор риска формирования аффективных расстройств и нарушений адаптации, характеризующихся стойкими проявлениями без видимых внешних причин патологическими эмоциональными состояниями и отношениями. Дексаметазон является избирательным агонистом глюкокортикоидных-рецепторов. Можно предполагать, что нарушение функции глюкокортикоидных рецепторов в первую очередь в коре, гиппокампе, а также амигдале, которая имеет прямое отношение к эмоциональному контролю процессов памяти (McGaugh, Cahill, 1997; Power et al., 2003), составляет основу изменений в эмоциональной сфере и способности к обучению оборонительным реакциям, связанных с действием дексаметазона в пренатальном периоде развития. Кора, гиппокамп, амигдала не только влияют на стресс-зависимое поведение, но играет важную роль в регуляции гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы и уровня глюкокортикоидов, осуществляя, таким образом, двустороннюю связь между гормональными механизмами и центрами регуляции поведения.

В заключение этого фрагмента обсуждения. нельзя не отметить одну важную закономерность: стресс, с одной стороны, может привести к выраженным патологическим изменениям, а, с другой, целый ряд вызываемых им изменений имеет адаптивные последствия (Самойлов и др., 2001, Самойлов и Рыбникова, 2012). Такого рода изменения, возникающие после однажды перенесенного стресса, подготавливают организм к противостоянию последующим стрессам. В этом мы видим причину того, что потомки крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии во время беременности, по показателям обучения в лабиринте Морриса при стрессовых условиях превосходят контрольных животных. Интересно и то, что нами не обнаружено достоверных изменений времени замирания при выработке обстановочного оборонительного условного рефлекса и оборонительного условного рефлекса у самцов крыс, подвергшихся воздействию

гипоксии в пренатальном периоде. То есть гипоксия в пренатальном периоде нарушает обучение с отрицательным подкреплением.

Суммируя результаты, полученные нами при изучении влияния применяемых нами воздействий на соматическое, сенсомоторное развитие можно заключить, что и гипоксия и дексаметазон на ранних этапах постнатального онтогенеза вызывают замедление развития вне зависимости от пола и срока воздействия (табл. 8 и 9). Однако введение дексаметазона на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза в отличие от гипоксии приводило к повышенной смертности потомства и уменьшению массы тела и мозга новорожденных.

Изменения поведения вследствие влияния неблагоприятных факторов на ранних этапах онтогенеза проявляются по разному в зависимости от типа воздействия и пола. Наиболее существенные нарушения обнаруживаются после воздействия гипоксии и дексаметазона на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза. При этом отклонения в поведении могут носить противоположную направленность. То же касается и изменений в развитии способности к обучению у взрослых животных.

Результаты проведенного исследования подтвердили клинические наблюдения, согласно которым основным проявлением пренатальной гипоксии и введения дексаметазона является задержка роста и развития (Айламазян, 2014). Нами было установлено, что данный эффект не зависит от сроков ее воздействия. Наряду с этим, были получены данные, свидетельствующие, что отдаленные последствия гипоксии и введения дексаметазона у крыс более выражены, если их воздействие приходится на возрастной интервал, включающий период позднего органогенеза и период гистогенеза (по Rice and Barone, 2000). Показано также, что направленность изменений в поведении носит различный характер, в зависимости от типа воздействия и сроков его применения - в первой или во второй половине последней недели пренатального периода развития.

Влияние пренатальной гипоксии в различные сроки гестации на:			САМКИ			САМЦЫ		
			Период пренатального развития (сутки)					
			11-13	14-16	18-20	11-13	14-16	17-19
КРЫСЯТА (ранний период развития)	СОМАТИЧЕСКОЕ РАЗВИТИЕ	выделение ушных раковин, разделение пальцев, появление шерсти, резцов, сосков у самок и прозрение	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	РАЗВИТИЕ СЕНСОМОТОРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК	сгибания (флексии) пальцев передних конечностей и экстензии задних конечностей,	N	N	N	N	N	N
		переворачивания на горизонтальной поверхности	N	N	N	N	N	N
		развитие реакции избегания наклонной плоскости	↓	↓	↓	↓	↓	↓
		избегание края (обрыва) плоскости	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	ОБУЧЕНИЕ	Выработка условных рефлексов на запаховые раздражители	N	N	↑	N	N	↑
ВЗРОСЛЫЕ (отсроченные эффекты)	ПОВЕДЕНИЕ	ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ	N	N	N	N	Повышение активности	N
		ПКЛ	N	N	N	N	Увеличение локомоторной активности	N
	ОБУЧЕНИЕ	УРПИ	N	N	N	N	↓	N
		ЛАБИРИНТ МОРРИСА	-	-	-	N	↓	N
		ЛАБИРИНТ МОРРИСА (РАБОЧАЯ ПАМЯТЬ)	-	-	-	N	↓	N
		Формирование и динамика угашения обстановочного оборонительного рефлекса	-	-	-	N	N	N
		Формирование и динамика угашения оборонительного условного рефлекса на звук	-	-	-	N	N	N

Табл. 8. Влияние тяжелой гипобарической гипоксии в различные периоды пренатального онтогенеза на соматическое, сенсомоторное развитие, поведение и обучение крыс.

Влияние пренатального введения дексаметазона в различные сроки гестации на:			САМКИ			САМЦЫ		
			Период пренатального развития (сутки)					
			11-13	14-16	18-20	11-13	14-16	17-19
КРЫСЯТА (ранний период развития)	СОМАТИЧЕСКОЕ РАЗВИТИЕ	Вес тела новорожденных	N	N	N	N	↓	↓
		Вес мозга при рождении	N	N	N	N	↓	↓
		выделение ушных раковин, разделение пальцев, появление шерсти, резцов, сосков у самок и прозрение	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	РАЗВИТИЕ СЕНСОМОТОРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК	сгибания (флексии) пальцев передних конечностей и экстензии задних конечностей,	N	N	N	N	N	N
ВЗРОСЛЫЕ (отсроченные эффекты)	ПОВЕДЕНИЕ	ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ	N	N	N	N	Повышение активности	Снижение активности
		ПКЛ	N	N	N	N	Снижение тревожности	Повышение тревожности
	ОБУЧЕНИЕ	ЛАБИРИНТ МОРРИСА	-	-	-	N	↓	N
		ЛАБИРИНТ МОРРИСА (РАБОЧАЯ ПАМЯТЬ)	-	-	-	N	N	N
		Формирование и динамика угашения обстановочного оборонительного рефлекса	-	-	-	N	N	↑
		Формирование и динамика угашения оборонительного условного рефлекса на звук	-	-	-	N	↓	↑

Табл. 9. Влияние введения дексаметазона в различные периоды пренатального онтогенеза на соматическое, сенсомоторное развитие, поведение и способность к обучению крыс.

При изучении последствий влияний пренатальной гипоксии на развитие мозга особый интерес представляет гиппокамп и новая кора. Известно, что 14-16-е сутки

эмбрионального развития головного мозга крыс соответствуют 5-7-ой неделе беременности, а 17-19-е сутки гестации - 8-10-ой недели (Bayer S.A. et al., 1993, Golan and Huleihel, 2006). Как в неокортексе, так и в гиппокампе крыс на 14-16-е сутки гестации происходит активное деление клеток предшественников и их миграция. В этот период закладываются все области гиппокампа (Bayer S.A. 1980) и формируются V, VI слои неокортекса (Dehay C. and Kennedy H. 2007). Затем, на 17-19-е сутки гестации в неокортексе окончательно закладываются II, III и IV слои и происходит настройка первичных связей между нейронами различных образований головного мозга. Повреждающие воздействия в этот период могут привести к существенным изменениям этих настроек на молекулярно-клеточном уровне.

Наши исследования показали что именно этот период как правило является «окном уязвимости» для вредных воздействий, таких как гипоксия, стресс и т.д. Механизмы, вовлеченные в контроль нейрогенеза, могут играть решающую роль в нарушениях формирования гиппокампа во время раннего развития плода. Применяемые нами воздействия (гипоксия и введение дексаметазона) затрагивают различные звенья этих механизмов. Важным фактором, определяющим последствия введения кортикостероидных гормонов является активность ферментов 11-бетта-гидроксистероиддегидрогеназа (11- β -hydroxysteroid dehydrogenase, 11 β -HSD) -1 и 2, которые регулируют взаимосвязь глюкокортикоидов со стероидным рецепторами. Высокий уровень активности 11 β -HSD обнаруживается еще в середине периода гестации (Brown et al., 1996; Waddell et al., 1996). Было высказано предположение, что высокий уровень 11 β -HSD2 в тканях зародыша и плаценты во время раннего гестационного периода защищает плод от неблагоприятного воздействия глюкокортикоидов (Seckl, 1997; Diaz et al., 1998). С другой стороны, избыток 11 β -HSD1 и нормальный уровень 11 β -HSD2 в тканях на поздних сроках беременности увеличивает сродство плода к глюкокортикоидам. (Brown et al., 1996; Speirs et al., 2004; Nyirenda et al., 2009). Вероятно введение дексаметазона на последней неделе гестации, регулируя соотношение 11 β -HSD1 и 11 β -HSD2, приводит к увеличению воздействия материнских и собственных глюкокортикоидов, приводящих к возникновению побочных эффектов, в том числе нарушениям поведения. Также возможно, что дексаметазон приводит к снижению выхода кортикостерона из материнских надпочечников и, как следствие, увеличивает секрецию кортикостерона от надпочечников плода. Это может объяснять значительную потерю массы тела новорожденных, получавших дексаметазон на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза.

Структуры коры головного мозга играют важную роль в обеспечении адаптивных реакций при стрессе, при этом их роль не ограничивается только интеграцией процессов обучения или восприятием сложных взаимосвязей между отрицательными раздражителями и выработке соответствующих поведенческих навыков. Как гиппокамп, так и различные области новой коры способны регулировать активность паравентрикулярных ядер гипоталамуса и, следовательно, активность гипоталамо-гипофизарной системы (Cullinan et al., 1991, Jason et al., 2009) через корково-гипоталамические пути, (Herman et al., 1989), а также через проекционные проводящие пути к ядру терминальной полоски (Choi et al., 2007). Таким образом, кора головного мозга осуществляет интеграцию отдельных компонентов нервной и эндокринной систем, участвующих в восприятии отрицательного стимула и формировании адаптивного ответа всего организма на данное воздействие. Важным обстоятельством является то, что гиппокамп и новая кора относятся к числу областей головного мозга, наиболее чувствительных к действию гипоксии.

Гистологические исследования свидетельствуют о значительных поражениях нервных клеток различных областей головного мозга крыс, возникающих вследствие действия гипоксии в пренатальном периоде. Соответствующие поражения выявляются пренатально или непосредственно сразу после рождения (Журавин И.А., 2001, Khozhai L. I., 2004). Когда мозг достигает определенного уровня зрелости, поражения нервных клеток не проявляются (Cai Z., 1999). Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что обнаруженные нами отклонения в поведении взрослых животных, подвергавшихся действию гипоксии в пренатальном периоде, очевидно, не обусловлены грубыми структурными повреждениями головного мозга. Они скорее связаны с разнообразными нейрохимическими нарушениями.

Гормональные механизмы нарушений, вызываемых повреждающими воздействиями в пренатальном периоде развития.

Одним из базисных нейроэндокринных механизмов описанной Ф.З.Меерсоном (Меерсон, 1993) «перекрестной адаптации, или неспецифической резистентности» является оптимальная активация ГГАС, а возможности изменений адаптационных характеристик организма определяются особенностями функционирования гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС) (Филаретов и др., 1994). ГГАС является основной эндокринной системой, регулирующей гомеостаз и обеспечивающей мобилизацию защитных сил организма при действии экстремальных факторов, необходимую для формирования адаптивных реакций (Selye H. 1950). 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 (De Kloet E.R., 1998). В нашей лаборатории, руководимой профессором М.О. Самойловым, впервые было продемонстрировано, что реакция ГГАС при гипоксии вовсе не является неспецифической, а зависит от параметров гипоксического воздействия. Гипобарическая гипоксия в различных режимах (повреждающем и умеренном – прекондicionирующем) вызывает реакцию ГГАС, значительно отличающуюся по своим характеристикам. Так, неповреждающая гипоксия индуцирует умеренную активацию ГАС с присущей ей двухфазной динамикой. В отличие от этого, после повреждающей тяжелой гипобарической гипоксии наблюдается медленное постепенное нарастание содержания глюкокортикоидов в плазме к 24 ч. сроку, то есть нарушается нормальная двухфазная динамика гормонального уровня. Исходя из особенностей этой реакции (редуцированного стрессорного выброса и отсроченного глюкокортикоидного торможения), очевидно, что при этом нарушаются и процессы активации ГГАС, и механизмы ее обратной регуляции. Сопоставляя эти особенности активации ГГАС со степенью наблюдаемых функциональных и структурных повреждений, была выявлена отчетливая корреляция между нарушением двухфазной динамики активации ГГАС и возникновением патологических реакций (Рыбникова и др., 2008 Самойлов, Рыбникова 2012).

В период пренатального и раннего постнатального развития вследствие воздействий повреждающих факторов окружающей среды происходит перепрограммирование работы гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной оси. Программирование гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной оси включает в себя эпигенетическое ремодулирование хроматина, ведущее к изменениям экспрессии генов во многих органах и тканях, включая гиппокамп (Grace et al., 2011). Вызванные пренатальной гипоксией нарушения в поведении у животных, достигших зрелого возраста, могут быть связаны с расстройством регуляции гормональных систем. Это предположение подтвердилось при исследовании стрессореактивности ГГАС у самок крыс, подвергшихся воздействию пренатальной гипоксии в настоящем исследовании. Динамику функциональной активности и стрессореактивность ГГАС у крыс исследовали по уровню содержания в плазме крови основного глюкокортикоидного гормона – кортикостерона. Тяжелая гипобарическая гипоксия, предъявляемая на 17-19-е сутки пренатального онтогенеза повышает стрессореактивность ГГАС у взрослых самок, способствуя ее быстрой и мощной активации в ответ на стресс, что в свою очередь усиливает регуляторные возможности гормональной системы. В этих условиях крайне важно, что вместе с выраженным стимулирующим эффектом у этих животных 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 нами был изучен характер вовлечения экстрагипоталамических (гиппокампальных) кортикостероидных рецепторов в механизмы повреждения мозга, индуцируемые повреждающими воздействиями (гипоксия и дексаметазон) в период пренатального онтогенеза. Согласно современным представлениям, существенная роль в адаптивных процессах регуляции гормональных функций, а также гибели/выживания нейронов мозга принадлежат глюкокортикоидным (ГР) и минералокортикоидным (МР) рецепторам, функционирующим в качестве транскрипционных факторов (Almeida O. et al., 2000, De Kloet E.R. et al., 1998, Lai M. Et al., 2007, Rogalska J. 2010). У взрослых животных существует высокая дифференциация расположения МР и ГР в различных областях мозга, их координированная активность необходима для обеспечения нормального функционирования ГГАС, вовлекаемой в регуляцию стресс-ответов, эмоционального поведения, способность к обучению и память (De Kloet E.R. et al., 1998, 2005, Rogalska J. 2010). Недавно появились доказательства быстрого (не генетического - *nongenomic*) непосредственного участия этих рецепторов в опосредовании действия гормонов, что может свидетельствовать о возможном расположении их на нейрональной мембране, активация этих рецепторов дополняет медленные ядерные эффекты кортикостероидов (Karst et al., 2005). ГР зубчатой извилины гиппокампа вовлекаются в ингибирование ГГАС, предотвращая ее длительную гиперактивацию в условиях стресса. Глюкокортикоидная рецепция гиппокампа представляет собой важную часть стресс-лимитирующей системы, дисбаланс которой способствует повышению уязвимости организма к стрессам и развитию различных постстрессовых патологий, в том числе нарушениям памяти (Sapolsky et al., 2000, Dominguez et al., 2014). Таким образом, важная роль в регуляции активности ГГАС по принципу отрицательной обратной связи отводится кортикостероидным рецепторам гранулярных клеток зубчатой извилины (Brady L. Et al., 1998, Jankord R, Herman JP. 2001, Rybnikova E et al. 2007).

К настоящему времени имеется достаточно экспериментальных доказательств, свидетельствующих о том, что кортикостероидам и их ГР и МР рецепторам принадлежит важная роль в механизмах повреждения, гибели/выживания нейронов гиппокампа и неокортекса в условиях окислительного стресса, гипоксии-ишемии (Almeida O. et al., 2000, Antonawich F. et al., 2001, Crochemore C. Et al., 2005, Lai M. Et al., 2007, Macleod M. Et al., 2003, Rogalska J. 2010). Причем, в этих процессах существенное значение имеет

характер изменения соотношения (баланса) МР/ГР (Almeida O. et al., 2000, Hassan A. et al., 1996, Rogalska J. 2010). Показано, что активация МР препятствует возможному повреждающему действию ГР в процессе нейронального переживания (Almeida et al., 2000, Hassan et al., 1996). Установлено, что активация МР приводит к усилению экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-xL, нейротрофических факторов, а стимуляция ГР смещает это соотношение в пользу проапоптотических белков (Almeida. et al., 2000). Активация ГР приводит к пагубным для клеток последствиям, таким как атрофия дендритов и, возможно, апоптоз (Crochemore et al., 2005).

Одной из наиболее уязвимых к тяжелой гипоксии областей гиппокампа является СА1 (Рыбникова и др., 2004, Rybnikova et al., 2005, Rybnikova et al., 2006). В иммуноцитохимических исследованиях обнаружено, что тяжелая гипобарическая гипоксия у взрослых крыс вызывает в нейронах СА1 существенное подавление уровня МР при выраженной оверэкспрессии ГР (Самойлов и Рыбникова, 2012; Rybnikova et al., 2011). В отличие от этого, используемое в нашей лаборатории гипоксическое прекондиционирование, предотвращающее массивное повреждение и гибель нейронов по типу апоптоза в СА1 (Рыбникова и др., 2004, Rybnikova et al., 2005, Rybnikova et al., 2006), сохраняет близкое к контролю соотношение МР/ГР после тяжелой гипоксии (Самойлов и Рыбникова, 2012; Rybnikova et al., 2011).

Кортикостероиды являются важным фактором, определяющим нормальное функционирование транспортной функции плаценты и роста плода (Shams et al., 1998; Barth et al., 1999; Seckl et al., 2000; Hewitt et al., 2006; Mark et al., 2009). Однако эффекты глюкокортикоидов на функциональное состояние плаценты и развитие плода мало изучены. Кортикостероиды оказывают свои эффекты путем связывания с внутриклеточными глюко- и минералокортикоидными рецепторами. До сих пор мало изучены механизмы действия кортикостероидов на развивающийся мозг. Синтетический глюкокортикоид дексаметазон специфически связывается с ГР, но не МР. Активация ГР, по видимому, в первую очередь отвечает за повышенную уязвимость мозга плода к влиянию дексаметазона в поздний период беременности. Это подтверждается данными о том, что высокая экспрессия ГР наблюдается в мозге плодов крыс только на поздних стадиях пренатального онтогенеза (de Kloet et al., 1998; Erdeljan et al., 2005; Gupta et al., 2007).

Уровень экспрессии и функциональной значимости МР и ГР в развивающемся мозге на разных этапах онтогенеза отличается от взрослых животных.

Существуют убедительные доказательства того, что в развивающемся мозге эффекты МР и ГР можно разделить на адаптивные и патологические. *Адаптивные*. Они

являются транскрипционными факторами (ТФ) для многих генов (Datson et al., 2001), МР и ГР несомненно важны в качестве посредников в видоспецифичной организации эффектов кортикостероидов во время созревания мозга. Они включают в себя регулирование уровней экспрессии генов, например, BDNF, в основных возраст-зависимых процессах, таких как созревание и обслуживание нейронно-глияльных сетей (Hansson et al., 2000). Во-вторых, МР и ГР, могут быть важными посредниками программирования эволюционно адаптивного развития ЦНС (Bateson et al., 2004; Macri et al., 2006). *Патологические.* Нарушения экспрессии и функционирования МР и ГР приводят к эмоциональным расстройствам человека, включая депрессию и посттравматического стрессового расстройства (Perlman et al., 2004; Webster et al., 2002 г.). То же показано и в экспериментальных исследованиях воздействия хронических стрессоров на поведение животных (Fuchs and Flugge, 2002) Растет число свидетельств того, что в раннем возрасте тяжелый стресс является важным долгосрочным фактором риска для изменения функционирования ГГАС и развития эмоциональных расстройств (Heim et al., 2001, 2004; Nemeroff CB. et al., 2004; Newport et al., 2004) Существует несколько экспериментальных доказательств того, что в начале жизни тяжелый стресс приводит к длительному выраженному изменению уровня и функциональной активности МР по отношению к ГР (Ladd et al., 2004).

В нашей работе мы так же исследовали отсроченные эффекты неблагоприятных воздействий в пренатальном периоде развития. Анализируя представленные результаты по изучению влияния пренатальной гипоксии или введения дексаметазона видно, что в основном общее число иммунопозитивных клеток 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 только снижение количества иммунопозитивных 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 в следствии применения этих воздействий на поздних сроках пренатального онтогенеза. Подавление иммунореактивности ГР в зубчатой извилине является одной из причин нарушения обратной отрицательной связи и дезрегуляции ГГАС.

Основные изменения уровня кортикостероидных рецепторов касались модификации количества интенсивно иммунореактивных клеток к ГР и МР как при введении дексаметазона, так и после пренатальной гипоксии. Причем наиболее выражены эти изменения были в области CA1 гиппокампа и в неокортексе. Суммарная картина

представлена в обобщающей таблице 10. Степень и направленность модификации экспрессии, однако, была различна в зависимости от воздействия и его сроков и области мозга. По видимому, нарушения экспрессии кортикостероидных рецепторов отражают изменения их активности в качестве транскрипционных факторов, регулирующих транскрипцию генов-мишеней в том числе транскрипционных факторов HIF-1 α , нейрогормонов кортиколиберина и вазопрессина, антиоксидантов (Kodama et al., 2003).


























			N				Ni			
			CA1	DG	Neo2	Neo5	CA1	DG	Neo2	Neo5
ГР	Гипоксия	14-16	N	N	N			N		
		17-19	N	N	N			N	N	
	Дексаметазон	14-16	N	N	N	N		N		
		17-19	N	N						
МР	Гипоксия	14-16		N	N	N		N		N
		17-19	N	N	N	N	N	N	N	
	Дексаметазон	14-16	N	N		N	N	N		N
		17-19	N	N		N	N	N		

Таблица 10. Изменения уровней глюко- (ГР) и минералокортикоидных (МР) рецепторов в области CA1 и зубчатой извилины гиппокампа, во 2-й и 5-й слоях неокортекса взрослых крыс подвергавшихся влиянию тяжелой гипобарической гипоксии или введению дексаметазона на 14-16-е или 17-19-е сутки пренатального онтогенеза. N – уровень контроля, стрелками показаны достоверные различия.

Особый интерес вызвал анализ соотношения ГР/МР при применяемых воздействиях. Как отмечалось выше дисбаланс в МР/ГР – рассматривается в качестве фактора риска болезней, связанных со стрессом, в том числе приводящих к психопатологии (de Kloet et al., 2009).

Анализ полученных нами данных представлен в таблице 11:













			N				Ni			
			CA1	DG	Neo2	Neo5	CA1	DG	Neo2	Neo5
ГР/ МР	Гипоксия	14-16	N	N		N			N	
		17-19	N	N	N	N		N	N	
	Дексаме тазон	14-16	N	N	N	N				
		17-19	N	N	N	N		N	N	

Таблица 11. Изменения отношения количества иммунопозитивных клеток к ГР и МР в области CA1 и зубчатой извилине гиппокампа, во 2-й и 5-й слоях неокортекса взрослых крыс подвергавшихся влиянию тяжелой гипобарической гипоксии или введению дексаметазона на 14-16-е или 17-19-е сутки пренатального онтогенеза. N – уровень контроля, стрелками показаны достоверные различия.

Различия в отношении ГР/МР обнаружены во всех исследованных областях мозга, но их локализация и направленность зависят от типа и сроков воздействия. Так в области CA1 уровень этого соотношения (при общей тенденции к снижению количества рецепторов) меняется в сторону уменьшения за счет разнонаправленных изменений ГР и МР, сохраняя таким образом, в некоторой степени контроль экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-xL, нейротрофических факторов. Тяжелая гипобарическая гипоксия, предъявляемая взрослым крысам, вызывает в нейронах CA1 существенное подавление уровня МР при выраженной гиперэкспрессии ГР (Самойлов и

Рыбникова, 2012). При воздействии пренатальной гипоксии этот эффект значительно отсрочен во времени, и на фоне общего снижения уровня иммунопозитивных клеток к ГР в области СА1 гиппокампа и в 5-м слое неокортекса наблюдается гиперэкспрессия иммунопозитивных клеток к МР. Таким образом, соотношение ГР/МР оказывается достоверно ниже, чем у контрольных животных. Подобный эффект был обнаружен в СА1 гиппокампа и при предъявлении тяжелой гипобарической гипоксии взрослым крысам (Самойлов, Рыбникова, 2012; Rybnikova et al., 2011). Дисбаланс ГР и МР, как следствие пренатальных воздействий повреждающих факторов, может приводить к гибели нейронов и нарушениям поведенческих реакций.

Гипоксия-ишемия новорожденных вызывает задержки развития и поведенческие расстройства, такие как патологические реакции на стресс и нарушения способности к обучению, которые сохраняются в течение всей жизни (Caputa et al., 2005; Nyakas et al., 1996; Rogalska et al., 2004, 2006a, 2009b). Существует все больше доказательств того, что регуляции активности ГР и МР на критических стадиях развития может иметь пролонгированное воздействие на поведение (Matthews, 2000). Активация (или деактивация) ГР и МР вызывают биохимические перестройки нейронов, приводящие к усилению или ослаблению нейрональной передачи (Sapolsky, 2000). В частности, гиперэкспрессия ГР в переднем мозге может увеличивать тревожность путем изменения норадренергической системы (Wei et al., 2004). Одной из причин нарушений стресс-реакций, изменений эмоционального поведения и тревожности крыс вследствие асфиксии или гипоксии-ишемии в перинатальном периоде развития является дисрегуляция гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы в следствии снижения уровня ГР и МР в гиппокампе (Nyakas et al., 1996, de Kloet et al., 1998, Rogalska et al., 2004, van den Buuse et al., 2002). Несомненно, нарушения поведения вызывают в первую очередь изменения активности нейромедиаторных систем мозга, которые в свою очередь регулируются кортикостероном гиппокампа (Han et al., 2002). Повышение уровня МР в нейронах гиппокампа связывают со снижением уровня тревожности (Berger et al., 2006; Catalani et al., 2000, Herrero et al. 2006, Lai et al., 2007). С другой стороны, активация ГР приводит к повышению тревожности, к появлению чувства страха (Korte et al., 1995, Calvo et al., 1998 г.). Это подтверждается данными об увеличении двигательной активности («разведывательной деятельности»), коррелирующей со сниженным уровнем ГР в гиппокампе (Kabbaj et al., 2000).

В нашей работе показано значительное снижение отношения ГР/МР в области СА1 и зубчатой извилины гиппокампа, в неокортексе после введения дексаметазона на 14-16-е, но не на 17-19-е сутки пренатального онтогенеза. Эти результаты коррелируют с

разнонаправленными нарушениями эмоционального поведения в тесте УРПИИ животных, подвергавшихся таким же воздействиям. Пренатальная гипоксия не дает таких однозначных результатов – на фоне уменьшения иммунопозитивных клеток к ГР, отношение ГР/МР смещается в сторону уменьшения, что сопровождается изменениями поведения – повышение двигательной активности у животных, подвергавшихся пренатальной гипоксии на 14-16-е сутки гестации.

Эффективность обучения и память также зависят от сбалансированной работы МР и ГР, контролирующих нормальное функционирование гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (Berger et al., 2006; de Kloet et al., 1998). Активация МР вовлекается в процессы оценки информации и выбора ответов (Oitzl и de Kloet, 1992; Oitzl et al., 1994). Исследования с использованием специфических МР- и ГР-антагонистов и трансгенных моделей показали, что нарушения экспрессии МР/ГР приводят к хроническим изменениям активности гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы, следствием чего может быть ухудшение когнитивной деятельности (Gass et al., 2001, Lai et al., 2007). Изменения экспрессии ГР/МР, обнаруженные в нашей работе, так же сопровождаются ухудшением способности к пространственному обучению в лабиринте Морриса и рабочей памяти. Поведенческие расстройства вследствие неонатальной аноксии связывают с нарушениями отношения ГР/МР (Boksa et al., 1996; Rogalska et al., 2009a).

Таким образом, тяжелая гипобарическая гипоксия и введение дексаметазона на последней неделе пренатального онтогенеза приводят к длительным (очевидно в течение всей жизни) изменениям поведенческих характеристик, нарушениям обучения и памяти, которые сопровождаются длительными перестройками активности одной из центральных нейроэндокринных систем - ГГАС. Однако степень и направленность этих изменений зависят от типа и сроков воздействия.

Модификация активности кальциевой и фосфоинозитидной систем внутриклеточной регуляции при действии повреждающих факторов в раннем онтогенезе.

Толерантность мозга к гипоксии зависит от целого ряда причин. В частности, чувствительность развивающегося мозга к гипоксии определяется липидным составом мембран нейронов мозга, соотношением уровня перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты, модуляцией рецепторов возбуждающих аминокислот, уровнем внутриклеточного Ca^{2+} и кальций-зависимых внутриядерных процессов. Известно, что

свойства мембран и рецепторов, а также активность различных внутриклеточных механизмов в ходе онтогенеза существенно меняются.

Как отмечалось в обзоре литературы в опосредовании эффектов гипоксии на мозг важная роль принадлежит внутриклеточным регуляторным системам (Самойлов 1999; Самойлов и др., 2001; Chen and Simon; 1997). Показано, в частности, что одним из последствий действия гипоксии являются стойкие модификации фосфоинозитидной системы, которая, как известно, контролирует метаболизм и функциональную активность нервных клеток. Активация ПФИ сигнальной системы, приводящая к высвобождению Ca^{2+} из внутриклеточного депо (Eichberg and Dawson 1965; O'Neill 2008a, b), играет важную роль в регуляции процессов выживания или гибели клеток по типу апоптоза (Ivanova et al., 2014). Очевидно обнаруженные нами дефекты в развитии и способности к обучению связаны с изменениями активности внутриклеточных регуляторных систем, в частности кальциевой и фосфоинозитидной, которые, как известно, являются одним из основных звеньев в процессах регуляции функционирования нервных клеток.

Как показано выше, последняя неделя пренатального периода развития у крыс характеризуется существенной гетерогенностью в отношении последствий гипоксического стресса на формирование поведения и способности к обучению в постнатальном онтогенезе (Ватаева и др., 2001, 2005). В рамках настоящей работы было проведено исследование ближайших и отдаленных последствий действия гипоксии в различные сроки пренатального онтогенеза на метаболизм фосфоинозитидов в гиппокампе и неокортексе крыс.

В настоящее время имеются лишь единичные работы, посвященные изучению метаболизма полифосфоинозитидов и их роли в адаптивных реакциях мозга в раннем постнатальном онтогенезе. Результаты этих исследований показали, что содержание трифосфоинозитидов в мозге новорожденных крыс (1-3 сут.) существенно ниже, чем у взрослых животных (Gonzales and Anderson, 2006, Eichberg and Hauser, 1973). Известно, что у крыс процесс миелинизации начинается в возрасте 9-10 суток, пик миелинизации приходится на 15-20-е сутки (Rice and Barone, 2000). Интенсивная миелинизация головного мозга завершается, в основном, к 30 суткам. Полученные нами результаты, показавшие, что у 15-суточных крыс содержание полифосфоинозитидов в мозге значительно превосходит таковое у взрослых животных, подтверждают представление об активации в этот период ПФИ-зависимых процессов миелинизации, пролиферации и дифференцировки клеток мозга (Gonzales and Anderson, 2006, Goebbels et al., 2010). Вторая неделя постнатального развития является критическим периодом по многим показателям развития мозга. Ранний постнатальный период (1-15-е дни жизни) у крыс,

известный как период «взрывного» роста мозга, характеризуется ветвлением дендритов, установлением синаптических контактов и пролиферацией астроглии. Выявлено участие системы ПФИ в процессах дифференцировки нейронов, ветвления и роста аксонов (Ménager et al., 2004; Ketschek and Gallo, 2010; Shi et al., 2003; Kakumoto and Nakata, 2013), а также в процессах миграции клеток в развивающемся мозге (Yoshinaga et al., 2012; Kiviluoto et al. 2013). Наряду с этим в этот период отмечается ПФИ-зависимая экспрессия белка p42(IP4), который вовлекается в процессы развития мозга (Aggensteiner and Reiser, 2003). Кроме того, было обнаружено увеличение активности фосфатидилинозитол синтетазы в коре и гиппокампе в течение первых двух недель постнатальной жизни и снижение ее активности в гиппокампе в последующие периоды жизни (Aggensteiner and Reiser, 2003; Sato et al., 1998). При этом интересно отметить, что в проведенном нами исследовании уровень содержания полифосфоинозитидов в гиппокампе оказался значительно выше, чем в неокортексе ювенильных крыс, но не взрослых. Это может быть свидетельством того, что описанные процессы в этот период развития в гиппокампе протекают более интенсивно, чем в неокортексе.

Нами установлено, что воздействие тяжелой гипоксии в гестационном периоде может вызывать длительные изменения в уровне содержания полифосфоинозитидов в мозге потомков. Последствия действия гипоксии по-разному проявлялись в зависимости от срока пренатального развития и области мозга.

Когда действие гипоксии приходится на начало третьей недели гестации, значительные модификации содержания полифосфоинозитидов наблюдаются в гиппокампе и неокортексе как ювенильных, так и взрослых крыс, при этом и последствия пренатальной гипоксии в гиппокампе выражены в большей степени. Система фосфоинозитидов в мозге 14-суточных крыс подвергается изменениям в большей степени, чем взрослых животных. Действие гипоксии в конце третьей недели беременности также вызывает увеличение количества полифосфоинозитидов в гиппокампе (но не неокортексе) потомков, но в меньшей степени. Надо отметить, что на содержание МФИ пренатальная гипоксия не оказывает влияния. То есть происходит изменение содержания элементов системы внутриклеточной сигнальной трансдукции, но не их предшественника.

В более ранних исследованиях, проведенных в нашей лаборатории на взрослых крысах, было показано, что тяжелые формы кислородного голодания (гипобарическая гипоксия, ишемия, асфиксия) приводили к существенным изменениям метаболизма фосфоинозитидной системы мозга, которые сохранялись в течение достаточно длительного периода (Самойлов и др., 2001; Тюлькова и Павлинова, 1985; Samoilov et al.,

1992). Умеренная гипобарическая гипоксия в разработанном в лаборатории режиме трехкратного гипоксического прекондиционирования сглаживала нарушения ПФИ мозга крысы ускоряла период восстановления. Сама по себе трехкратная умеренная гипоксия приводила к незначительным (но достоверным – увеличение содержания ТФИ до 10-15%) изменениям содержания ПФИ в неокортексе, которые сохранялись некоторое время, обеспечивая необходимый уровень активации ПФИ-системы для переживания последующих патологических воздействий. В представленной работе уровень содержания ПФИ в гиппокампе и неокортексе сохраняется повышенным в течение длительного срока, по крайней мере до 90 суток. Таким образом, с одной стороны такое повышение метаболизма ПФИ связано с повышением толерантности мозга к дальнейшим тяжелым гипоксическим воздействиям (Самойлов и др. 2001, Тюлькова и др., 1998), с другой – длительная активация системы ПФИ (в течение всей жизни) может иметь патологический характер, и находить свое отражение 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.

Параллельно с тестированием ПФИ-ответа мозга крыс на действие пренатальной гипоксии, было проведено исследование уровня содержания ПФИ в мозге крыс после пренатального введения дексаметазона. Направленность изменений уровня ПФИ была такой же как после пережитой пренатальной гипоксии, но амплитуда изменений (повышение содержания ПФИ в неокортексе и гиппокампе) была значительно больше. Кроме того, введение дексаметазона на 17-19-е так же, как и на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза, приводило к достоверному увеличению уровня содержания полифосфоинозитидов в неокортексе и гиппокампе взрослых крыс.

В этом контексте интересно было оценить способность ПФИ отвечать на активацию глутаматной системы. Показано, что глутаматергическая сигнальная трансдукция опосредуется через гидролиз фосфоинозитидов только в неонатальном периоде (Balduini et al., 1991; Costa, 1994; Mistry 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 (Costa, 1994; Mistry et al., 1996; Rhodes and Cai Z. 1996). Таким образом, наличие фосфоинозитидного ответа на аппликацию глутамата может служить показателем функциональной зрелости фосфоинозитидной регуляторной системы и способности мозга к адаптации к повреждающим воздействиям. Схожие результаты получены в проведенном исследовании. У контрольной группы животных аппликация глутамата на переживающие срезы мозга вызвала гидролиз ПФИ только у 15-суточных крысят, но не у взрослых животных. Вместе с тем обнаружено, что пренатальная гипоксия, перенесенная на 14-16 сутки, в последствии индуцировала опосредуемую глутаматом активацию ПФИ системы в срезах мозга взрослых животных. Ранее сходная сенситизация ПФИ системы была выявлена нами в экспериментах с предъявлением гипоксического прекодиционирования, повышающего толерантность зрелого мозга к последующему повреждающему гипоксическому воздействию (Самойлов и др., 2001; Тюлькова и др., 1998). 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 гомеостаза в условиях повреждающих воздействий, а, с другой – запускает геном-зависимые реакции, обеспечивающие долговременную толерантность мозга к повреждающим воздействиям (Самойлов МО 1999). 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 A β 42, может быть использовано для лечения этих болезней (Berman et al., 2008).

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.

Фосфоинозитидная и кальциевая регуляторные системы сопряжены между собой уже на уровне рецепции нейроном внешнего сигнала с помощью метаботропных глутаматных рецепторов I группы (Рис. 65). Глутамат вызывает гидролиз ПФИ в клетках мозга в результате активации метаботропных глутаматных рецепторов I группы (ImGluR),

конститутивная активность которых формируется в пренатальном периоде (Arbeille et al., 1999; Costa 1994; Petry and Hales, 2000). Можно предположить, что эти рецепторы вовлечены в формирование и/или постнатальное поддержание нарушений, вызываемых пренатальной гипоксией. Стимуляция ImGluR селективным агонистом DHPG – эффективный путь тестирования функционального состояния этих внутриклеточных регуляторных систем.

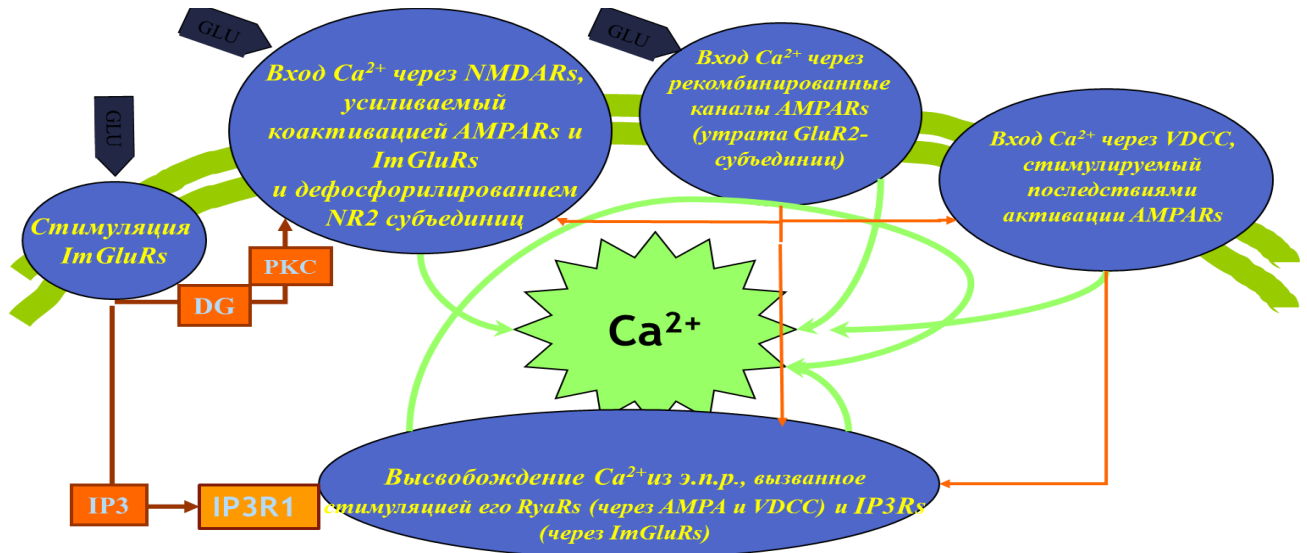


Рис. 65. Два конститутивных пути стимуляции метаботропных глутаматных рецептора 1 и 5 группы .

Метаботропные глутаматные рецепторы 1 и 5 подтипов, располагаются на постсинаптической мембране в большем или меньшем удалении от ионотропных рецепторов. Известно, что специфическая стимуляция ImGluR (1, 5) инициирует различные сигнальные пути, в том числе два основных: фосфолипаза С-зависимое, инозитолтрифосфат (IP3)–опосредованное высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума и фосфолипазаС-зависимая, диациоглицерол (DG)/протеинкиназаС (PKC)–опосредованная потенциация Ca^{2+} -проводящей функции NMDA рецепторно канального комплекса (Conn et al. 1997, Valenti et al. 2002, Benquet et al. 2002).

Вместе с тем, IP3 –опосредованный путь снижает содержание Са-с, но повышает уровень ионизированного Ca^{2+} в цитозоле, создавая условия для Ca^{2+} -зависимого торможения активности NMDA каналов (Rosenmund et al., 1995). Показано, что активация mGluRs(1) может дополнительно ограничивать Ca^{2+} вход, запуская механизм интернализации обоих типов ионотропных глутаматных рецепторов. Результирующий эффект стимуляции ImGluRs на Ca^{2+} обмен определяется сложным сочетанием действия этих и других механизмов, а форма кальциевого ответа на 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 Ca^{2+} 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.

Обсуждая возможные причины разнообразия Ca^{2+} -ответов, необходимо иметь в виду, что концентрация внутриклеточного Ca^{2+} в нейронах является гомеостатическим параметром и в физиологических условиях трансмембранный кальциевый обмен регулируется несколькими механизмами. С одной стороны, концентрация Ca^{2+} растет в результате открытия лиганд-управляемых и потенциал-управляемых кальциевых каналов и высвобождения Ca^{2+} , связанного внутриклеточными депо, при активации IP₃ или рианодиновых рецепторов эндоплазматического ретикулума. С другой стороны, избыточной концентрации внутриклеточного Ca^{2+} противодействуют АТФ-зависимые механизмы Ca^{2+} «откачки» через плазмолемму и секвестрирования в эндоплазматическом ретикулуме, $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ трансмембранный обмен и другие буферные и/или Ca^{2+} -связывающие процессы. Скоординированное управление этими механизмами контролирует уровень Ca^{2+} в цитозоле, позволяя ему флуктуировать в определенных пределах и с определенной пространственно-временной закономерностью для обеспечения множества Ca^{2+} -зависимых процессов внутриклеточной сигнальной трансдукции. Метаботропные глутаматные рецепторы I группы (1 и 5 подтипы) располагаются в основном на постсинаптической мембране в большем или меньшем удалении от ионотропных рецепторов. Они также обнаружены на Glu-ергических и GABA-ергических терминалях и представлены в стриатуме, мозжечке, гиппокампе и коре в различной степени и в разном соотношении. Известно, что специфическая стимуляция ImGluR инициирует различные сигнальные пути, в том числе два основных ФЛС-зависимых процесса: IP₃ –опосредованное высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума и диацилглицерол/протеинкиназаС–опосредованная потенция Ca^{2+} -проводящей функции ионотропных глутаматных рецепторов (Conn et al. 1997, Valenti et al. 2002, Benquet et al. 2002). Оба эти пути могут влиять на уровень цитозольного Ca^{2+} в «постсинаптическом» нейроне различным образом.

Очевидно, зарегистрированные нами негативные смещения Са-с в ответ на аппликацию DHPG (в контроле - первичный ответ у 15 дневных и оба ответа у 90 дневных

животных, а в эксперименте – начальные фазы обоих ответов у взрослых животных) отражают преобладание IP3– опосредованного сигнального пути, приводящего к высвобождению Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума. Позитивные Ca^{2+} - ответы (вторичный ответ у контрольных 15 дневных животных и все ответы экспериментальных животных), указывают на преобладание диацилглицерол/протеинкиназаC– опосредованного сигнального пути, характеризующего позитивную модуляцию ионотропных глутаматных рецепторов со стороны ImGluR и приводящей к входу экстраклеточного Ca^{2+} с последующим его связыванием буферными системами.

Таким образом результирующий эффект стимуляции ImGluRs на Ca^{2+} обмен очевидно определяется интерференцией двух основных конститутивных сигнальных путей этих рецепторов. Отмеченные нами возрастные особенности Ca^{2+} - ответов ImGluRs и их трансформация под влиянием пренатальной гипоксии, очевидно могут зависеть от множества факторов. В их числе - изменения экспрессии рецепторных субъединиц, количественного соотношения их подтипов, изменения в колокализации ImGluRs и ионотропных GluRs, модификации чувствительности рецепторов к агонисту, модуляция сопряжения IP3 и DG сигнальных путей со стороны системы анкерных Homer-белков (Ango F. et al., 2001), изменение экспрессии и/или активности IP3 эндоплазматических рецепторов и др.

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 крысятах 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). Однако было отмечено ярко выраженное различие в количестве интенсивно- и слабо иммунореактивных нейронов 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 выявлено, 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.

Гипоксия, предъявляемая крысам на 14-16 и 17-19 сутки пренатального развития, приводит к увеличению интенсивно иммунореактивных к IP3R1 клеток как у 14-суточных, так и у взрослых крыс. Надо отметить, что общее количество иммунопозитивных клеток у крыс, подвергавшихся гипоксии в пренатальном периоде развития не отличалось от контрольного уровня. В отдаленные сроки после воздействия гипоксии обнаружены изменения уровня только интенсивно иммунореактивных клеток. 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 C.U. and Ehrlich B.E. 2006; Kiviluoto S et al., 2013; Chang et al., 2014). Полученная в настоящей работе информация об ап-регуляции экспрессии IP3R1 пренатальной гипоксией согласуется с нашими исследованиями по влиянию пренатальной гипоксии на функциональное состояние кальциевой регуляторной системы крыс тех же возрастных групп, путем оценки Ca^{2+} сигнализации, опосредуемой возбуждением ImGluR в переживающих срезах мозга.

Хотя контролируемое повышение внутриклеточного кальция необходимо для Ca-сигнализации, длительное поддержание высокого уровня внутриклеточного Ca^{2+} может приводить к некрозу и апоптозу (Ruiz A et al., 2009), возникновению психических заболеваний, в том числе, болезни Альцгеймера, биполярным расстройствам и шизофрении (Berridge, 2013; 2014). 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. Дерегуляция 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). Было показано, что интенсивная активация IP3R1 отрицательно влияет на когнитивные функции, а блокада IP3-опосредованного высвобождения внутриклеточного Ca^{2+} в префронтальной коре увеличивает рабочую память (Brennan A.R et al., 2008; Birnbaum S.G. et al., 2004; Runyan J.D et al., 2005). Длительная активация IP3 рецепторного комплекса 1 в области CA1 гиппокампа (в течение всего исследованного нами срока) существенно изменяет внутриклеточную кальциевую сигнальную систему, 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 C.U. and Ehrlich B.E. 2006; Foskett J.K. 2010; Decuypere J.-P et al., 2011).

Параллельно было проведено исследование экспрессии IP3R1 в гиппокампе крыс, подвергавшихся воздействию дексаметазона на третьей неделе пренатального онтогенеза. Результаты экспериментов показали, что пренатальная гипоксия и введение дексаметазона на третьей неделе пренатального онтогенеза приводят к одинаковым изменениям экспрессии IP3R1.

Таким образом, тяжелая гипобарическая гипоксия, предъявляемая крысам в конце последней недели беременности, приводят к длительным изменениям активности внутриклеточных регуляторных систем (кальциевой и фосфоинозитидной) в мозге 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 беременности применялось воздействие.

Изменения соотношения про- и антиоксидантных систем в мозге 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- анти оксидантных 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, сопровождающиеся инициацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) и накоплением в жидких средах его продуктов: малонового диальдегида - МДА, диеновых и триеновых конъюгатов, гидроперекисей липидов, диенкетон. 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. В контексте полученных нами ранее данных возникла необходимость оценить интенсивность окислительных процессов в структурах мозга крыс, перенесших гипоксию в период пренатального онтогенеза.

В настоящем исследовании было проведено сравнение между уровнями интенсивности процессов ПОЛ у интактных 14-ти и 90-суточных крыс. Коэффициент Клейна у 14-суточных животных в среднем на 45% выше, чем у взрослых крыс. Полученные данные свидетельствуют о том, что в раннем постнатальном онтогенезе для мозга крыс характерен повышенный уровень ненасыщенных жирных кислот. Уровень ПОЛ в мозге ювенильных выше, чем у взрослых крыс, что в наибольшей степени

проявилось при определении триеновых конъюгатов и ТБКАП. Таким образом, процессы ПОЛ у интактных ювенильных крыс протекают более интенсивно, чем у интактных взрослых животных. Сходные результаты были получены при исследовании других областей мозга (стриатум, гипоталамус) (Герасимова и др. 2005). Интенсификация свободнорадикального окисления, сопровождающая усиленное клеточное дыхание, окисление и синтез АТФ, играют значительную роль в процессах завершения дифференцировки клеток (Tsatsmali et al., 2006) и апоптоза в период активного роста мозга, формирования структур и межструктурных связей. В процессе постнатального онтогенеза происходит постепенное увеличение содержания липидов и жирных кислот в головном мозге (Галкина О.В. и др. 2002), при этом меняется и степень их ненасыщенности, что ведет к увеличению основного субстрата ПОЛ. Данные, полученные в нашем исследовании, подтверждают более ранние результаты, показавшие, что интенсивность свободнорадикального окисления липидов в коре головного мозга довольно существенно снижается в период между 10-ми и 90-ми сутками постнатального развития (Галкина О.В. и др. 2009).

Перенесённая в пренатальном периоде (14–16-е и сутки) развития гипоксия существенно модифицирует уровень ПОЛ в неокортексе и гиппокампе крыс в постнатальном онтогенезе. Степень и направленность изменений зависят от срока постнатального онтогенеза, в котором проводилось тестирование. 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 суток гестации. Изменения ПОЛ в гиппокампе и коре крыс, перенесших гипоксию на 17-19 суток гестации были менее выражены.

Основной субстрат свободно-радикального окисления – фосфолипиды матрикса мембран (Dormandy, Wickens, 1987). Генетически детерминированный состав фосфолипидов является одним из эндогенных регуляторов рецепторов и ферментов, локализованных в мембране. При уменьшении содержания ненасыщенных фосфолипидов мембранные белки снижают свою функциональную активность и формируют перекисные кластеры, которые делают мембрану более проницаемой для ионов кальция и менее проницаемой для других катионов. Таким образом, модификация фосфолипидного матрикса нейрональных и глиальных мембран может участвовать в патологических и адаптивных процессах (Adibhatla et al., 2007,2010).

Пренатальная гипоксия на 14-16-е сутки гестации, приводит к понижению коэффициента Клейна в гиппокампе у 14-суточных животных, а в гиппокампе взрослых животных – к повышению. При этом у взрослых животных этой группы лишь в неокортексе было выявлено снижение коэффициента Клейна. Известно, повышение коэффициента Клейна может быть обусловлено двумя причинами: увеличением количества двойных связей в жирных кислотах липидов и уменьшением количества углеводородных цепей. Исходя из полученных данных по коэффициенту Клейна, можно заключить, что в результате пренатального гипоксического воздействия в гиппокампе происходит накопление ненасыщенных жирных кислот, что создаёт субстрат для развития цепных реакций ПОЛ (Emerit J. et al. 2004; Watson B. D. 1998). Как показали наши исследования, такого рода изменения более характерны для животных, подвергшихся воздействию гипоксии на 14-16-е сутки гестации, но не на 17-19-е сутки гестации. У последних не было выявлено существенных изменений практически всех исследованных параметров системы ПОЛ в гиппокампе и неокортексе взрослых животных.

В гиппокампе и неокортексе 14-суточных и взрослых крыс вследствие перенесенной тяжелой гипоксии на 14-16-е сутки гестации отмечается увеличение количества триеновых конъюгатов в среднем на 70-75%. Различия в уровне между диеновыми и триеновыми конъюгатами отражает качественные особенности липидного состава исследованных структур. Изменения уровня диеновых и триеновых конъюгатов свидетельствует о нарушениях в гидрофобном слое клеточных мембран, что может приводить к увеличению вязкости и полярности мембран, а также к нарушению их барьерной функции. Такие изменения могут модифицировать электорфизиологические свойства нейронов и оказывать существенное влияние на их функциональную активность. Помимо этого увеличение вязкости приводит к угнетению активности ферментов, а рост полярности мембран усиливает Fe^{2+} зависимую индукцию ПОЛ. При нарушении барьерной функции клеточной мембраны, она становится более проницаемой для H^+/OH^- .

Динамика вторичных продуктов ПОЛ в настоящей работе оценивалась по содержанию ТБКАП, а конечных по содержанию оснований Шиффа. У 14-суточных крысят пренатальная гипоксия, предъявляемая на последней неделе гестации, не приводила к значительным изменениям этих компонентов ПОЛ. Однако у взрослых животных, подвергавшихся гипоксическому воздействию на 14-16-е сутки гестации, эти изменения носили существенный характер. При этом в гиппокампе отмечено повышение уровня как продуктов ТБКАП, так и оснований Шиффа. В неокортексе повышенный уровень ТБАКП сопровождается снижением количества третичных продуктов ПОЛ.

Такие длительные изменения уровня вторичных и третичных компонентов ПОЛ являются отражением структурно-функциональных повреждений мембран и изменений их пластических свойств (Kishida K.T. and Klann E. 2007). Несовпадение и даже разнонаправленность в характере вызываемых пренатальной гипоксией изменений в уровне ПОЛ в неокортексе и гиппокампе, скорее всего, отражают качественные различия в липидном составе данных структур мозга, а также различия в динамике формирования их в ходе эмбриогенеза по отношению к срокам перенесенного воздействия. Существенная зависимость эффектов пренатальной гипоксии от сроков ее воздействия также подтверждается нашими данными, свидетельствующими, что пренатальная гипоксия, предъявляемая на 17-19-е сутки гестации, в отличие от предъявляемой на 14-16-е сутки гестации, не приводит к значительным перестройкам окислительных процессов в гиппокампе и неокортексе взрослых крыс.

Модификация состава клеточных мембран, а также изменение уровня ряда биологически активных соединений, в результате активации перекисного окисления, наблюдаемая у животных, перенесших тяжелую гипобарическую гипоксию на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза, может оказать существенное влияние на протекание ферментативных и рецепторных реакций, что, несомненно, в дальнейшем может привести к изменению пластичности ответа клеточных мембран.

Результаты настоящего исследования согласуются с полученными нами данными о том, что гипоксия, перенесенная на 14-16-е сутки пренатального развития, в ювенильном и взрослом периодах развития существенно влияет на функциональное состояние внутриклеточных сигнальных систем.

При физиологических условиях ПОЛ участвует в поддержании структурной целостности, функциональной пластичности мембран и в обеспечении работы ионных каналов, рецепторов и ферментов. Важная роль ПОЛ отводится в механизмах синаптической пластичности и в процессах памяти (Kishida K.T. and Klann E. 2007). Но в то же время надо отметить, что изменения активности ПОЛ приводят к возникновению широкого круга заболеваний. Выраженные длительные нарушения в состоянии системы ПОЛ сопряжены с процессами интенсивного распада клеточных мембран, что является ранним признаком развивающихся постстрессовых и нейродегенеративных патологий (Adibhatla et al., 2007,2010; Флеров и Герасимова 2006). Полученные нами данные убедительно продемонстрировали, что процессы длительной активации перекисного окисления липидов могут интенсивно вовлекаться в механизмы, опосредующие индуцируемые тяжелой пренатальной гипобарической гипоксией структурные повреждения головного мозга человека и животных.

Традиционные взгляды о пагубной роли свободных радикалов дополняются большим количеством данных об их участии в различных процессах в качестве важнейших эндогенных сигнальных молекул (Rhee S.G. 2006). В механизмах развития гипоксической толерантности активные формы кислорода (АФК) и другие свободные радикалы индуцируют специфические или неспецифические регуляторные процессы, приводящие, помимо всего прочего, и к изменениям экспрессии антиоксидантных белков (Строев, Самойлов, 2006; Турпаев, 2002; Liu et al., 2005). Большое значение имеет баланс про- и антиоксидантных систем в мозге.

Антиоксидантные системы играют существенную роль в формировании защитных реакций на гипоксию и потому гипоксические воздействия влияют на уровень экспрессии антиоксидантных белков. Одним из ключевых эндогенных антиоксидантов является цитозольный тиоредоксин-1 (Trx-1), представляющий собой небольшой (около 12 кДа) полифункциональный убиквитинилированный белок. Trx-1 защищает клетки от окислительного стресса (Hori et al., 1994; Sasada et al., 1996; Takagi et al., 1999). Различные формы гипоксии/ишемии обычно повышают экспрессию Trx-1 (Berggren et al., 1996; Tomimoto et al., 1993; Stroeve et al., 2004a), однако при особо тяжёлых гипоксических воздействиях может, напротив, наблюдаться её подавление. Например, экспрессия тиоредоксина и его мРНК была снижена в зоне ишемического ядра, но при этом повышена в прилежащих к нему перифокальных областях спустя 4 часа после фокальной ишемии мозга (Hattori et al., 2002; Takagi et al., 1998a, b). Также нами ранее была показана возможность снижения экспрессии Trx-1, напротив, в ответ на умеренные, адаптивные формы гипоксии (Строев и др., 2008).

Иммуноцитохимическое исследование показало, что перенесённая в пренатальном периоде (14 – 16-е сутки) развития гипоксия существенно модифицирует уровень экспрессии Trx-1 в нейронах гиппокампа крыс в постнатальном онтогенезе. Степень и направленность изменений экспрессии Trx-1 в различных областях гиппокампа различны и зависят от срока постнатального онтогенеза.

Полученные данные свидетельствуют о том, 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 отдельных случаях динамика общего числа экспрессирующих Trx-1 клеток и числа клеток с высоким уровнем его экспрессии может носить разнонаправленный характер, что ещё более усложняет картину

изменений и не позволяет свести её к простой тенденции общего увеличения или снижения экспрессии данного антиоксиданта.

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 экспрессии. Эта тенденция, однако, более или менее прослеживается только в областях Аммонова рога (CA1, CA2, CA3), но не в зубчатой извилине (DG), где наблюдается иная динамика, притом различная для общего числа иммунопозитивных клеток и интенсивно окрашенных клеток.

Различия в реакции областей Аммонова рога и зубчатой извилины на пренатальную гипоксию могут быть связаны с гетерогенностью созревания этих структур в онтогенезе (Golan et al., 2006) и, соответственно, смещением временного «окна чувствительности» к пренатальной гипоксии.

Сложилось устоявшееся представление, что повышенный уровень экспрессии антиоксидантов отражает развитие адаптивных механизмов защиты от различных неблагоприятных воздействий, молекулярный механизм которых опосредуется развитием окислительного стресса. И, напротив, обычно считается, что снижение уровня экспрессии антиоксидантов во время или после тех или иных стрессорных воздействий отражает нарушение защитных механизмов и развитие дезадаптивных, патологических состояний, что подтверждается, в частности, характером экспрессии тиоредоксина в ишемическом ядре и в прилежащей к нему пограничной области (Takagi et al., 1998a, 1998b; Hattori et al., 2002). Это представление, однако, по-видимому, является несколько упрощённым и не всегда соответствует действительности. Хорошо известны данные о том, что введение экзогенных антиоксидантов подавляет развитие собственных защитных реакций (Baines et al., 1997; Kaeffer et al., 1997; Vanden Hoek et al., 1998; Das et al., 1999; Rauca et al., 2000; Ravati et al., 2000, 2001; Leak et al., 2006), поскольку для его развития требуется не подавленный «фоновым» уровнем антиоксидантов сигнал, опосредуемый повышением уровня активных форм кислорода. Нельзя исключить возможности того, что данная закономерность относится не только к ситуации введения экзогенных антиоксидантов, но и к системе обратных связей в регуляции экспрессии собственных эндогенных антиоксидантов.

В частности, в ранее опубликованных нами работах было показано, что прекондиционирование умеренными гипоксическими воздействиями заметно повышает

экспрессию Trx-1 (Stroev et al., 2004a) и ряда других антиоксидантных белков (Stroev et al., 2004b, 2005; Строев и др., 2003, 2005; Строев, Самойлов, 2006) вслед за последующей тяжёлой гипоксией, что коррелирует с повышением выживаемости нейронов и снижением уровня функциональных расстройств. Однако само по себе прекондиционирование умеренной гипоксией без или до последующей тяжёлой гипоксии не только не повышает, но и заметно снижает «фоновый» уровень экспрессии Trx-1 (Строев и др., 2008), а также Trx-2 и Cu, Zn-супероксиддисмутазы (Stroev et al., 2011; Строев и др. 2012), что, возможно, имеет важное значение для повышения чувствительности клетки к опосредуемому активными формами кислорода сигналу и ускорению защитной реакции в ответ на этот сигнал. Следовательно, снижение общего числа экспрессирующих Trx-1 нейронов, как и снижение числа интенсивно экспрессирующих его нейронов нельзя считать однозначным свидетельством общего снижения нейропротективной функции тиоредоксиновой антиоксидантной системы и формирования патологического дезадаптивного состояния. Вопрос об адаптивном или дезадаптивном характере таких изменений требует дополнительных исследований влияния различных повреждающих факторов. Не исключено, что в данном случае преобладание процессов адаптации или патологии зависит от конкретной ситуации. Так, например, ранее при обучении в водном лабиринте Морриса нами было показано, что в «жёстких» стрессовых условиях, (при температуре воды в лабиринте 16-17°C), пренатальная гипоксия приводит к улучшению показателей обучения относительно контроля, а в более благоприятных условиях (при температуре воды 23-24°C) – к их ухудшению.

Полученные данные свидетельствуют о том, что тяжёлая гипоксия, перенесённая материнским организмом в критический с точки зрения развития плода период приводит к модификации тиоредоксиновой антиоксидантной системы в нейронах гиппокампа родившихся крысят на протяжении всего их постнатального развития, включая взрослое состояние. Наряду с ранее показанными модификациями работы кальциевой и фосфоинозитидной систем внутриклеточной сигнальной трансдукции эти изменения отражают, по-видимому, один из возможных молекулярных механизмов, лежащих в основе как адаптивных, так и патологических модификаций когнитивных и поведенческих функций у переживших пренатальную гипоксию животных.

Таким образом, гипоксия, перенесённая на 14-16-е сутки гестации, оказывает существенное влияние на состояние тиоредоксиновой антиоксидантной системы уже в первые сутки жизни, а последствия этого воздействия сохраняются и во взрослом состоянии. Повышение уровня ПОЛ в гиппокампе взрослых крыс, подвергавшихся гипоксии на 14-16-е сутки гестации, согласуется со сниженным у этих животных уровнем

эндогенной антиоксидантной защиты. Известно, что у новорожденных, перенесших внутриутробную гипоксию, наблюдается дисбаланс соотношения ПОЛ и системы антиоксидантов мембран тромбоцитов (Дубинина и др., 1996; Евсюкова и др. 1996). В нашей работе показано, что в чувствительных к гипоксии образованиях мозга такой дисбаланс сохраняется в течение длительного периода постнатального онтогенеза.

Были также исследованы изменения экспрессии других представителей семейства антиоксидантов – тиоредоксина2, Cu-Zn-супероксиддисмутазы и Mn-супероксиддисмутазы, в гиппокампе взрослых крыс, подвергавшихся влиянию тяжелой гипобарической гипоксии на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза.

Таким образом, тяжелая гипобарическая гипоксия, предъявляемая животным на 14-16-е сутки пренатального онтогенеза, вызывает длительную модификацию экспрессии протестированных антиоксидантов. За исключением Trx2 (в области CA1), общая направленность изменений - в сторону уменьшения экспрессии исследованных антиоксидантов. Наибольшие модификации наблюдаются в областях Аммонова рога (CA1, CA2, CA3), но не в зубчатой извилине (DG). Мы уже сталкивались с феноменом отличия наблюдаемых нарушений в зубчатой извилине по сравнению с областями вентрального гиппокампа. По видимому, и в данном случае различия в реакции зависят от времени созревания различных областей гиппокампа в пренатальном периоде развития. Направленность изменений зависит от типа антиоксиданта и области гиппокампа. Более значимы изменения количества интенсивно иммунореактивных клеток. Однако направленность и степень изменений очень неоднородны и, скорее всего, отражают индивидуальные особенности животных.

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 нарушений, 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 сроков пренатального онтогенеза. Существенное значение имеет фактор времени предъявления воздействия - в начале или в конце последней недели пренатального 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 сутки пренатального 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 не всегда 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 крысы на 14-16-е и 17-19-е сутки пренатального онтогенеза, приводят к модификациям гормональной системы мозга, которые обнаруживаются у взрослых животных. Общее число иммунопозитивных 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 иммунопозитивных 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 иммунореактивных клеток, что свидетельствует о выраженной модификации экспрессии глюко- и минералокортикоидных рецепторов. Отсутствие изменений количества иммунопозитивных 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 пренатальных 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, нейрогормональных 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 в пренатальном периоде, в отличие от животных, испытывавших действие гипоксии, наблюдаются отклонения в эмоциональном реагировании и способности к обучению в стрессовых ситуациях. В частности, введение дексаметазона на 14-16-е сутки в пренатальном периоде развития приводит к снижению, 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-адренкортикальной 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 в пренатальном 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. 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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян А.Х. Новые молекулярные критерии оценки токсического действия регуляторов роста растений производных гидразина (Активные формы кислорода как ключевые агенты в механизме токсичности)// Автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора медицинских наук. - 1990. -45 с.
2. Айламазян Э.К. Акушерство.//СПб.: СпецЛит – 2014. – 546 с.
3. Александрова Е.А., Зарайская И.Ю., Швыркова Н.А. Формирование социальной системы социального поиска в раннем постнатальном периоде развития//Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. - 1997. - Т. 47(6), - С. 987-993.
4. Анохин П.К. Биология и нейрофизиология условного рефлекса. //М.: Медицина - 1968.
5. Арчаков А.И., Мохосев И.М. Модификация белков активным кислородом и их распад// Биохимия. -1989. -Т. 54, № 2.- С. 179-186
6. Аршавский И.А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития.///1982 - М., «Наука», - 270 С.
7. Барашнев Ю.И. Клинико-морфологическая характеристика и исходы церебральных расстройств при гипоксически-ишемических энцефалопатиях. // Акуш. и ген. -2000. -№ 5.- с. 39-42.
8. Биленко М.В., Ишемические и реперфузионные повреждения органов. //Москва: Медицина,- 1989.- 369 с.
9. Болдырев А.А. Карнозин. Биологическое значение и возможности применения в медицине// М.: Издательство МГУ, -1998. -320 с.
10. Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Журавин И.А. Структурные изменения в нервной ткани новой коры в онтогенезе крыс после гипоксии на разных стадиях эмбриогенеза.//Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2008. - Т. 44(3). - С. 258-267
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 // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. -2005. -Т. 41. -С. 532-535.
12. Ватаева Л.А. Косткин В.Б., Макухина Г.В., Хожай Л.И., Отеллин В.А. Поведение в «открытом поле» у самок и самцов крыс, подвергавшихся действию гипоксии в различные сроки пренатального периода развития// ДАН .- 2001.- Т. 380(1).- С. 125-127.

13. Ватаева Л.А. Косткин В.Б., Макухина Г.В., Хожай Л.И., Отеллин В.А. Условнорефлекторная реакция пассивного избегания у самок и самцов крыс, подвергшихся воздействию гипоксии в различные сроки пренатального периода развития// Журнал эволюционной биохимии и физиологии. -2004. -Т. 40. № 3. -С. 250-253.
14. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Влияние предварительного воздействия умеренной гипоксии на нарушение выработки и воспроизведения условной реакции пассивного избегания, вызываемые тяжелой гипобарической гипоксией у крыс.// Журнал высшей нервной деятельности -2004а. -Т.54. №6. - С795-801.
15. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Влияние тяжелой гипоксии на эмоциональное поведение крыс: корректирующий эффект прекондicionирования//ДАН.- 2004б.- Т. 395. №3. -С 415-417
16. Владимиров Г.Е., Григорьев Н.Ф. Рекомендации режимов адаптации и питания в условиях высокогорья.// Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова. -1945.- Т.31. №5-6.- С.356-63.
17. Галкина О.В., Путилина Ф.Е., Ещенко Н.Д., Блюдзин Ю.А. Интенсивность перекисного окисления липидов головного мозга крыс разного возраста. //Нейрохимия.- 2002. -Т. 19, № 6, -с. 287-292.
18. Галкина О.В., Путилина Ф.Е., Романова А.А., Ещенко Н.Д. Изменения перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы головного мозга крыс в ходе раннего постнатального развития//Нейрохимия. -2009, -58(6). -С. 111-116.
19. Герасимова И.А., Флеров М.А., Вьюшина А.В. Влияние пренатального стресса на свободнорадикальное окисление липидов головного мозга крыс в постнатальном онтогенезе//Нейрохимия. -2005. -Т. 22, № 2, -с. 105-106.
20. Дмитриев Ю. С., Бачманов А. А., Дмитриева Н. И., Гоццо С, Жакобино К. The features of the hippocampal structure as a neuroanatomical basis for differences in behavior // Ж. эвол. биохим. и физиол. -1987. - Т. 23. № 5. -С.663-667.
21. Дмитриева Н. И., Гоццо С., Дмитриев Ю. С., Лопатина Н. Г., Кассиль В. Г. Нейроанатомические характеристики линий крыс различающихся по способности формирования условного рефлекса активного избегания // Докл. акад. наук СССР.- 1983. - Т. 272. № 5. -С.1235-1238.
22. Дубинина Е.Е., Раменская. Н.П., Софронова Р.Л. Особенности антиокислительной системы крови у новорожденных с асфиксией. //Педиатрия. -1996.- № 5, -с.75.
23. Дубровина Н. И., Зиновьев Д. Р., Зиновьева Д. В., Куликов А. В. Обучение и угашение реакции пассивного избегания у мышей с высокой предрасположенностью к каталепсии// Российский физиолог. ж. им И.М. Сеченова. -2008. -Т.94. Т 6.- С. 609-616.

24. Дубровская Н.М., Журавин И.А. Онтогенетические особенности поведения крыс, перенесших гипоксию на 14-е или 18-е сутки эмбриогенеза//Журнал высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова. -2008. -Т. 58. № 6. -С. 718-727.
25. Дунаева Т.Ю., Трофимова Л.К., Граф А.В., Маслова М.В., Маклакова А.С., Крушинская Я.В., Соколова Н.А. Трансгенерационные эффекты антенатальной острой гипоксии периода раннего органогенеза. //БЭБиМ.- 2008. -Т. 146. № 10. -С. 364-366.
26. Евсюкова И.И., Савельева Т.В., Арутюнян А.В., Прокопенко В.М., Шнеерсон М.Г., Байбородов Б.Д. Свободнорадикальное окисление у доношенных новорожденных детей с различной патологией. //Педиатрия – 1996 - №.1. -с. 13-16.
27. Ещенко Н.Д., Путилина Ф.Е., Галкина О.В. Биохимия развивающегося мозга. Избранные разделы//под ред. Н.Д.Ещенко. - СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского Государственного Университета. -2013 -252 с.
28. Жукова Т.П., Знаменская Е.И., Паленова Н.Г. Структурные изменения мозга. Перинатальная патология // Под ред. М.Я.Студеникиной. Совместное издание СССР-ГДР. // М.: Медицина, - 1984. – с. 45-83
29. Журавин И.А., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Багрова Д.И., Кочкина Е.Г., Плеснева С.А., Туманова Н.Л., Наливаева Н.Н. Когнитивные расстройства в онтогенезе млекопитающих при нарушении пренатального развития//Психиатрия. -2010. -№4 (46). - С. 36-43.
30. Журавин И.А., Дубровская Н.М., Туманова Н.Л. Постнатальное физиологическое развитие крыс после острой пренатальной гипоксии//Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.- 2003. -Т. 89.- № 5. С. 522-532.
31. Журавин И.А., Туманова Н.Л., Васильев Д.С. Структурные изменения нервной ткани гиппокампа в онтогенезе крыс после пренатальной гипоксии// Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2009. Т. 45. № 1. С. 138-140.
32. Журавин И.А., Туманова Н.Л., Озирская Е.В., Васильев Д.С., Дубровская Н.М. Формирование структурной и ультраструктурной организации стриатума в постнатальном онтогенезе крыс при изменении условий их эмбрионального развития.// Журнал эволюционной биохимии и физиологии. -2007. -Т. 43. -С. 194-203.
33. Журавин И.А., Туманова Н.Л., Потапов Д.О. Структурные изменения в сенсомоторной коре мозга в раннем постнатальном онтогенезе крыс, перенесших пренатальную гипоксию // Ж. эвол. биох. и физиол. -2001. -Т. 37. № 6. -С. 518-520.
34. Журавлев А.И. // Свободнорадикальная биология. М.:Моск. вет. академия, 1993. 24с.

35. Зарайская И. Ю., Александрова Е. А., Анохин С. В. Поведенческие развития тесты. // Мат. Отдела системогенеза НИИ им. П.К. Анохина РАМН.- 2000.
36. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. //М.: МАИК «Наука/Интерпериодика»,- 2001.- 343 с.
37. Зинченко В.П., Долгачева Л.П. Внутриклеточная сигнализация.//Электронное издательство «аналитическая микроскопия». -2003. -84 с.
38. Кассиль В.Г., Гулина Л.К. Изменения сигнального значения запаховых раздражителей при сочетании их с отрицательными воздействиями на организм у щенков раннего возраста // Физиол. ж. СССР. -1987.- Т. 73. № 2. --С. 246–253
39. Кассиль В.Г., Отеллин В.А., Хожай Л.И. и др. Критические периоды развития головного мозга. // Рос. Физиол. Журн. им. И.М.Сеченова. -2000. -Т. 86. № 11. –с. 1418-1425.
40. Кассиль В.Г., Отеллин В.А., Хожай Л.И., Косткин В.Б. Критические периоды развития головного мозга//Росс. Физиол. Журн.- 2000. -Т. 86. № 11.- С. 1129-1136.
41. Киселев Г.В. Изменения конформации мио-инозита в трифосфоинозитиде. //Биохимия. - 1978. - Т. 43(7). - С. 1328-1334.
42. Костюк П.Г., Станика Р.И., Лукьянец Е.А. Внутриклеточные механизмы гипоксических нарушений функций нервной клетки//Проблемы гипоксии: молекулярны. Физиологические и медицинские аспекты. Отв. ред. Лукьянова Л.Д., Ушаков И.Б.: М., Истоки. -2004.- С. 84- 95.
43. Кучеренко Н.Е., Блюм Я.Б., Роль мембранных фосфоинозитидов в опосредовании гормональных эффектов. // Украинский биохимический журнал,- 1986. - т. 58, N 1. - с. 86 — 101.
44. Левадная О.В., Донченко Г.В., Валуцина В.М., Корж Е.В., Хиль Ю.Н. Соотношение между величинами активности ферментов антиоксидантной системы в различных тканях интактных крыс.// Укр. биохим. журн. -1998.- Т. 70, № 6. -С. 53-58.
45. Львова С.П., Абаева Е.М. Антиокислительная система тканей в раннем постнатальном развитии крыс. //Онтогенез. -1996. -Т. 27, № 3.- С. 204-207.
46. Лукьянова Л.Д. Молекулярные механизмы гипоксии и адаптации к ней// Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. П/ред. Лукьяновой Л.Д., Ушакова И.Б. М.: Истоки, - 2004. -- С.8-13.
47. Маркель А.Л., Галактионов В.В., Ефимов В.М. Факторный анализ поведения крыс в тесе открытого поля // Журн. ВНД. – 1988. – Т.38(5). – С.855-863.

48. Медведева Н. Д. Фосфоинозитид-специфическая фосфолипаза C-γ 1 — ключевой белок передачи сигнала, запускаемого факторами роста. // Цитология., 1999. — т. 41, N 11. - с. 997 — 1005.
49. Меерсон Ф.З. Адаптация к периодической гипоксии: механизм и защитные эффекты // Нурохia Medical. – 1993б. - № 3. - С.2-7.
50. Меерсон Ф.З. Адаптация к стрессу: механизмы и защитные перекрестные эффекты // Нур. Med. J. – 1993а. - №4. - С. 23-30.
51. Меерсон Ф.З. Механизмы и защитные эффекты адаптации.//В кн.: Адаптационная медицина. М., -1993в.-С. 25 - 31.
52. Миронов А.А., Мухина И.В., Крылов В.Н., Снопova Л.Б., Жемарина Н.В., Проданец Н.Н. Влияние превентивного введения буфотина на устойчивость центральной нервной системы крыс к острой гипобарической гипоксии// Нижегородский медицинский журнал, - 2003. - № 1
53. Науменко Е.В., Дыгало Н.Н., Маслова Л.Н. Длительная модификация стрессорной реактивности воздействиями в пренатальном онтогенезе: онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса//Новосибирск: Наука. – 1990. – с. 55-66.
54. Неговский В.А., Гурвич М.А., Золотокрылина Е.С. Постреанимационная болезнь. М.: Медицина, -1979.- 383 с.
55. Никитин В.П., Самойлов М.О. Хлортетрациклиновый флуоресцентный зонд – индикатор связывания ионов кальция кальций-связывающими белками//Биофизика. - 1990.- Т. 35(6). -С. 921-924
56. Ордян Н.Э., Жуков Д.А. Влияние контролируемого и неконтролируемого стрессорных воздействий на рецепторное связывание дексаметазона в гипофизе и гиппокампе крыс с различной стратегией поведения // Росс. Физиол. Журнал им. И.М. Сеченова. – 1996. – Т. 82(2). – С.50-54.
57. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ордян Н.Э. Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. Адаптивные механизмы, непосредственные и отсроченные эффекты. //СПб.: Десятка,- 2007.- 237 с.
58. Отеллин В.А., Хожай Л. И., Ватаева Л.А. Влияние гипоксии в раннем пренатальном онтогенезе на поведение и структурные характеристики головного мозга. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. - 2012. - Т. 48. № 5.- С. 467-473.
59. Отеллин В.А., Хожай Л. И., Ватаева Л.А. Шишко Т. Т. Отдаленные последствия гипоксии в перинатальный период развития на структурно-функциональные

характеристики мозга у крыс // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. -2011.- Т. 97. № 10. -С. 1092-1100.

60. Отеллин В. А. Формирование патологий головного мозга в эмбриональный период. //Природа.- 2003. - № 9. -с.30-35.

61. Павлов И.П. Полн. собр. соч. М.; Л.: Изд-во АН СССР. -1951. -Т. 3, кн. 2. -438 с.

62. Пальчик А.Б., Шабалов Н.П. Гипоксически-ишемическая энцефалопатия новорожденных. – С-Пб.: ПИТЕР, 2001. – 224 с.

63. Питлик Т.Н., Булай П.М., Денисов А.А. и др. Редокс-регуляция ионного гомеостаза в нейронах // Нейрохимия. -2009. -Т.26. -С.104-110.

64. Поздняков А.А. Способ диагностики гипоксического поражения центральной нервной системы у новорожденных: патент на изобретение №214262 от 27 апреля 2000 г.- М., -2000.

65. Поленов А.Л., Константинова М.С., Гарлов П.Е. Гипоталамо-гипофизарный нейроэндокринный комплекс / В кн.: Нейроэндокринология (часть первая, кн. первая) // Под ред. А.Л. Поленова. – СПб, 1993. - С.139-187.

66. Пучков В.Ф. Учение П.Г.Светлова о критических периодах развития и его значение для современной эмбриологии.//Морфология. -1993.- Т. 105,№11.-С. 147-158.

67. Пылова С.И. Аденилатциклазная система ткани головного мозга при клинической смерти и в постреанимационном периоде. //Нейрохимия. -1988.- Т. 7, № 1. -С. 39-46.

68. Резников К.Ю. Проплиферация клеток мозга позвоночных в условиях нормального развития мозга и при его травме. М.: «Наука». – 1981. – 149 с.

69. Рыбникова Е.А., Хожай Л.И., Тюлькова Е.И., Глущенко Т.С., Ситник Н.А., Отеллин В.А., Самойлов М.О. Влияние гипобарической гипоксии на экспрессию белков ранних генов и структурные изменения нейронов мозга: корректирующий эффект прекодиционирования// Морфология. – 2004. Т. 125(2). С. 10-15.

70. Самойлов М.О. Мозг и адаптация (молекулярно-клеточные механизмы).(Монография) СПб. Изд-во "ГНИУ Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН". -1999. -271 с.

71. Самойлов М.О. Реакции нейронов мозга на гипоксию. Л.: Наука, -1985. -190 с.

72. 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 прекодиционирования нейронов мозга. (Обзор) // Рос. физиол. ж. им. И.М.Сеченова.- 2001. -Т. 87. -С. 714-729.

73. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А. Молекулярно-клеточные и гормональные механизмы индуцированной толерантности мозга к экстремальным факторам среды// Рос. физиол. ж. им. И.М.Сеченова. -2012. -Т. 98. № 1, -С. 108-126.
74. Самойлов М.О., Ситник Н.А., Рыбникова Е.А., Глущенко Т.С., Тюлькова Е.И. Особенности экспрессии про- и антиапоптотических белков Вах и Bcl-2 в нейронах мозга крыс в ответ на тяжелую гипобарическую гипоксию: корректирующий эффект гипоксического preconditionирования// Доклады АН. - 2005. - т.402(4). - с. 1-3
75. Самойлов М.О., Чурилова А.В., Глущенко Т.С., Рыбникова Е.А. Влияние различных режимов гипобарической гипоксии на экспрессию кортикостероидных рецепторов в гиппокампе крыс //Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.- 2012, -т. 98, № 11, -с.
76. Светлов П.Г. Некоторые закономерности в онтогенезе и их отношение к проблеме охраны антенатального периода жизни. //Вестник АМН. -1966.- Т. 6. -С. 26-34.
77. Сиротинин Н.Н. - Сиротинін М.М. Життя на висотах та хвороба висоти. Киев,- 1939.
78. Строев С. А., Тюлькова Е. И., Самойлов М. О., Пельто-Хьюкко М. Т. Сравнение эффектов однократной и трехкратной умеренной гипобарической гипоксии на экспрессию Cu, Zn-супероксиддисмутазы в гиппокампе крыс//Нейрохимия, -2012, -том 29, № 3,- с. 1–6.
79. Строев С.А., Е.И. Тюлькова, Т.С. Глущенко, И.А. Тугой, М.О. Самойлов, М. Пельто-Хьюкко, Влияние умеренной гипобарической гипоксии на уровень экспрессии тиоредоксина-1 в гиппокампе крыс. //Морфология. 2008. Т. 133. С. 20–24.
80. Строев С.А., Самойлов М.О.//Эндогенные антиоксиданты и гипоксическая толерантность мозга. СПб.: Ин-т физиологии им. И. П. Павлова РАН, -2007.- 145с.
81. Строев С.А., Т.С. Глущенко, Е.И. Тюлькова, Е.А. Рыбникова, М.О. Самойлов, М. Пельто-Хьюкко, Экспрессия и ферментативная активность Cu, Zn-супероксиддисмутазы после тяжелой гипоксии в мозге крыс, эффект preconditionирования.// Нейрохимия. - 2003.- Т. 20. -С. 190-195.
82. Строев С.А., Т.С. Глущенко, Е.И. Тюлькова, Е.А. Рыбникова, М.О. Самойлов, М. Пельто-Хьюкко. Влияние тяжелой гипобарической гипоксии на экспрессию Mn-супероксиддисмутазы в гиппокампе непрекondиционированных и preconditionированных крыс.// Нейрохимия. -2005. -Т. 22. -С. 292-298.
83. 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, -с. 20–24

84. Теппермен Дж., Теппермен Х., Физиология обмена веществ и эндокринной системы. Москва: Мир,-1989. -656 с.
85. Ткачук В.А. Фосфоинозитидный обмен и осцилляция ионов Ca^{2+} . // Биохимия., 1998. — т. 63, вып. 1. — с. 47 — 56.
86. Турпаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов.// Биохимия. -2002. -Т. 67. №5. -С.339-352.
87. Тюлькова Е.И., Павлинова Л.И. Метаболизм полифосфоинозитидов мозга при его ишемии//Нейрохимия. – 1985. – т. 4(3). – с.306-309.
88. Тюлькова Е.И. Семенов Д.Г., Самойлов М.О. Участие кальциевой и фосфоинозитидной систем внутриклеточной регуляции в адаптации нейронов срезов мозга к гипоксии *in vitro*. // Бюлл. exper. биологии и медицины. -1998. -Т. 125.- С. 259-263
89. Угрюмов М.В. Механизмы Нейроэндокринной регуляции. //М.: Наука. – 1999. – 299 с.
90. Филаретов А.А. Принципы и механизмы регуляции гипоталамо-адреноталамической системы. Ленинград: Наука, -1987.- 165 с.
91. Филаретов А.А., Подвигина Т.Т., Филаретова Л.П. Адаптация как функция гипоталамо-адреноталамической системы. Санкт-Петербург: Наука, -1994.- 131 с.
92. Флеров М.А., Герасимова И.А. Перекисное окисление липидов некоторых отделов головного мозга в развитии постстрессорных депрессивных состояний у крыс с разной стратегией адаптивного поведения. // Нейрохимия.- 2006.- Т.23. -С.307-312.
93. Флеров М.А., Герасимова И.А. Перекисное окисление липидов некоторых отделов головного мозга в развитии постстрессорных депрессивных состояний у крыс с разной стратегией адаптивного поведения // Нейрохимия.- 2006. -Т. 23.№4. -С.307-312.
94. Хавинсон В.Х., Баринин В.А., Арутюнян А.В., Малинин В.В. Свободнорадикальное окисление и старение// СПб: Наука, -2003. -327 с.
95. Хачатурян М.Л., Гукасов В.М., Комаров П.Г., Пирогова Л.Б., Биленко М.В. Показатели перекисного окисления липидов органов крыс с различной устойчивостью к гипоксии// Бюл. эксп. биол. мед. -1996. -Т. 121, № 1.- С. 26-29.
96. Хожай Л. И. Клеточные и тканевые реакции развивающегося головного мозга млекопитающих на воздействие неблагоприятных факторов среды. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. 2008
97. Чернышева М.П. Гормоны животных. Введение в физиологическую эндокринологию. — СПб — 1995.

98. Четвериков Д.А. Некоторые аспекты функциональной биохимии фосфолипидов мозга.// Успехи нейробиологии. -1974.- С.73-83.
99. Чистякова Н.В., Савостьянов К.В., Сергиенко Е.А. Эндогенные механизмы когнитивного контроля в регуляции функциональной системы «Мать-Плод»// Психологические исследования. -2013. -Т. 6, № 28. -С. 7.
100. Шаляпина В.Г. Кортиколиберин в регуляции приспособительного поведения и патогенезе постстрессорной психопатологии / В кн.: Основы нейроэндокринологии // Под ред. В.Г.Шаляпиной и П.Д.Шабанова. – СПб.: Элби-СПб, 2005. – С.84-146.
101. Шаляпина В.Г., Ракицкая В.В., Рыбникова Е.А. Кортикотропин-рилизинг гормон в интеграции эндокринных функций и поведения. Обзор. // Успехи физиол. наук. – 2003. – Т.34, № 4. – С.75-92.
102. Abe H., Nowak T.S. Jr. Gene expression and induced ischemic tolerance following brief insults. //Acta Neurobiol Exp (Wars). -1996. -V.56, № 1.- P. 3-8
103. Abe, H., Hidaka, N., Kawagoe, C., Odagiri, K., Watanabe, Y., Ikeda, T., Ishizuka, Y.,
104. Abramov A. Y., Scorziello A., Duchen M. R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation.// J. of Neuroscience. -2007. -V. 27. № 5.- P. 1129 –1138.
105. Abunasra H.J., Smolenski R.T., Morrison K., Yap J., Sheppard M.N., O'Brien T., Suzuki K., Jayakumar J., Yacoub M.H. Efficacy of adenoviral gene transfer with manganese superoxide dismutase and endothelial nitric oxide synthase in reducing ischemia and reperfusion injury// Eur J Cardiothorac Surg.- 2001. -V. 20, № 1.- P. 153-158.
106. Aden, P., Goverud, I., Liestol, K., Loberg, E. M., Paulsen, R. E., Maehlen, J., Lomo, J. Low-potency glucocorticoid hydrocortisone has similar neurotoxic effects as high-potency glucocorticoid dexamethasone on neurons in the immature chicken cerebellum.// Brain Res.- 2008, -1236 - p. 39-48
107. Adibhatla R.M., Hatcher J.F. Lipid Oxidation and Peroxidation in CNS Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. // Antioxidants & Redox Signaling.- 2010.- V12.- P.125–69
108. Adibhatla R.M., Hatcher J.F. Lipid Oxidation and Peroxidation in CNS Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. Antioxidants & Redox Signaling. -2010. -V12. -P.125–69
109. Adibhatla R.M., Hatcher J.F. Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies. // BMB Rep.- 2008.- V.41.- P.560-567.
110. Adibhatla R.M., Hatcher J.F. Role of lipids in brain injury and diseases. // Future Lipidol. -2007.- V.2.- P.403-422.

111. Adén U, Dahlberg V, Fredholm BB, Lai LJ, Chen Z, Bjelke B MRI evaluation and functional assessment of brain injury after hypoxic ischemia in neonatal mice.// *Stroke*. -2002. - V. 33(5). -P. 1405-1410.
112. Aggensteiner M, Reiser G. Expression of the brain-specific membrane adapter protein p42IP4/centaurin alpha, a Ins(1,3,4,5)P4/PtdIns(3,4,5)P3 binding protein, in developing rat brain // *Brain Res Dev Brain Res*. -2003. -V. 142. -P. 77-87
113. Ahima R.S., Harlan R.E. Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system // *Neurosci.* – 1990. – V.39. – P.579-604.
114. Ahima R.S., Krozowski Z., Harlan R.E. Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids // *J. Comp. Neurol.* – 1991. – V.313. – P.552-538.
115. Akira T, Henry D, Baldwin RA, Wasterlain CG. Nitric oxide participates in excitotoxic mechanisms induced by chemical hypoxia.//*Brain Res*. - 1994. - V. 645(1-2).- P. 285-90.
116. Akhtar A, Gasser SM The nuclear envelope and transcriptional control.// *Nat Rev Genet.*- 2007. - V. 8. - P. 507–517
117. Allbritton NL., Meyer T., Stryer L. Range of messenger action on calcium ion and inositol 1,4,5-triphosphate//*Science*. 1992. V. 258(5089). P. 1812-1815.
118. Alema S. Calcium and brain proteins // *Metal. Ions Biol. Syst.* - 1984. - V.17. - P. 275-311.
119. Almeida O., Conde G., Crochmore C., Demeinieux B., Fischer D., Hassan A., Meyer M., Holsboer F., Michaelidis T. Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate.// *Faseb J.* - 2000. - V. 14. - P. 779-790
120. Alvarez J, Montero M. Measuring $[Ca^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum with aequorin.// *Cell Calcium* - 2002. V. 32. - P. 251–260.
121. Ambroggi, F., Turiault, M., Milet, A., Deroche-Gamonet, V., Parnaudau, S., Balado, E., Barik, J., van der Veen, R., Maroteaux, G., Lemberger, T., Schuëtz, G., Lazar, M., Marinelli, M., Piazza, P.V., Tronche, F. Stress and addiction: glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons facilitates cocaine seeking. //*Nat. Neurosci.* - 2009, - 12- p. 247–249.
122. An G., Lin T.N., Liu J.S., Xue J.J., He Y.Y., Hsu C.Y. Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia. //*Ann Neurol.* - 1993. - V. 33, № 5. - P. 457-464.
123. Andoh T., Chock P.B., Chiueh C.C. Preconditioning-mediated neuroprotection: role of nitric oxide, cGMP, and new protein expression// *Ann N Y Acad Sci.* - 2002 a. - V. 962, - P. 1-7.

124. Andoh T., Chock P.B., Chiueh C.C. The roles of thioredoxin in protection against oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells// J Biol Chem. - 2002 b. - V. 277, № 12. - P. 9655-9660.
125. Ango F., Preceau L., Miller T., Tu J.C., Xsiao B., Worley P.F., Pin J.P., Bockaert J., Fagni L. Agonist-independent activity of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer.// Nature. - 2001. - V. 411. - P. 962-965.
126. Antonawich F., Miller G., Rigsby D., and Davis J. Regulation of ischemic cell death by glucocorticoids and adrenocorticotrophic hormone. //Neuroscience.- 1999/ - 88 – p. 319–325.
127. Arancio O, Kim TW, Di Paolo G. Oligomeric amyloid-beta peptide disrupts phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate metabolism// Nat Neurosci – 11 – p. 547–554
128. Arbeille Ph., Maulik D., Laurini R. Fetal Hypoxia. - Medical. - 1999. - 145 p
129. Aronsson M., Fuxe K., Dong Y., Agnati L.F., Okret S., Gustafsson J.-A. Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1988. – V.85. – P.9331-9335.
130. Arriza J.L., Simerly R.B., Swanson L.W., Evans M.R. Neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response // Neuron. – 1988. – V.1. – P.887-900.
131. Arthur P.G., Lim S.C., Meloni B.P., Munns S.E., Chan A., Knuckey N.W. The protective effect of hypoxic preconditioning on cortical neuronal cultures is associated with increases in the activity of several antioxidant enzymes// Brain Res. - 2004. - V. 1017, № 1-2. - P. 146-154.
132. Aruoma O.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease.// J Amer Oil Chem Soc. - 1998. - V. 75, № 2. - P. 199-212.
133. Arundine M., Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury.// Cell Mol Life Sci. - 2004. - V. 61. № 6 - P. 657-68.
134. Azzopardi D, Wyatt JS, Cady EB, Delpy DT, Baudin J, Stewart AL, Hope PL, Hamilton PA, Reynolds EO. Prognosis of newborn infants with hypoxic-ischemic brain injury assessed by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. //Pediatr Res. - 1989. - V. 25(5). - P. 445-451.
135. Baddeley A. Working memory and executive control. //Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. -1997. -V. 351. -P.1397-403.
136. Baines C.P., M. Goto, J.M. Downey, Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium.// J Mol Cell Cardiol. - 1997. - V.29. - p. 207-216.
137. Balduini W , De Angelis V . Mazzoni E et al. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. // Brain Reseach – 2000 - V 859. - P. 318-325.

138. Balduini W, Candura SM, Costa LG Regional development of carbachol-, glutamate-, norepinephrine-, and serotonin-stimulated phosphoinositide metabolism in rat brain // *Brain Res Dev Brain Res.* - 1991. --V. 62. - P. 115-120.
139. Bandrowski A., Aramakis V., Moore S., Ashe J. Metabotropic glutamate receptors modify ionotropic glutamate responses in neocortical pyramidal cells and interneurons.// *Exp Brain Res.* - 2001. - V. 136. - P. 25-40.
140. Bano D., Nicotera P. Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. // *Stroke.* - 2007. - V. 38. № 2. - P. 674-6.
141. Barhwal K., Hota S.K., Jain V., Prasad D., Singh S.B., Ilavazhagan G. Acetyl-L-carnitine (ALCAR) prevents hypobaric hypoxia-induced spatial memory impairment through extracellular related kinase-mediated nuclear factor erythroid 2-related factor 2 phosphorylation//*Neuroscience.*- 2009.- V.161.- P.501-14.
142. Barlow C. A., Laishram R. S., Anderson R. Nuclear Phosphoinositides: A Signaling Enigma Wrapped in a Compartmental Conundrum//*Trends Cell Biol.* -2010. -V. 20(1).- P. 25.
143. Baron M, Kudin AP, Kunz WS. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. // *Biochem Soc Trans.* -2007 – v. 35(Pt 5) – p.- 1228-1231.
144. Barth, S., Graf, R., Engelmann, M., Beslagic, D., Reul, J. M., Holsboer, F., Dohr, G., Desoye, G., Hahn, T. Placental glucose transporter expression is regulated by glucocorticoids.// *J. Clin. Endocrinol. Metab.*- 1999 – v. 84 – p.- 1445-1452.
145. Bartlett G. Phosphorous assay in column chromatography. // *J. Biol. Chem.*- 1959.- V. 234.- P. 446-473.
146. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, Gluckman P, Godfrey K, Kirkwood T, Lahr MM, McNamara J, Metcalfe NB, Monaghan P, Spencer HG, Sultan SE. Developmental plasticity and human health.//*Nature.*- 2004 –v. - 430(6998). – p. 419-21.
147. Bayer S.A. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography.// *J Comp Neurology.*- 1980. -V.190. -p. 87-114.
148. Bayer S.A., Altman J., Russo R.J., Zhang X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat.//*Neurotoxicology.*-1993.- v. 14(1).- P.83-144.
149. Bayer S.A., Altman J., Russo R.J., Zhang X.//*Neurotoxicology.*- 1993. -- v. 14(1). - P.83-144.
150. Bayer S.A. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography// *J Comp Neurology.* -1980.- V.190.- p. 87-114.

151. Bayer, S.A., Altman, J., Russo, R.J., & Zhang, X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat// *Neurotoxicology*, -1993. - V. 14, -p. 83–144.
152. Bazan N.G. Synaptic Signaling by Lipids in the Life and Death of Neurons.// *Molecular Neurobiology*. - 2005. - V.31 №1–3 -- P.219–230.
153. Bazan N.G., Rodriguez de Turco E.B., Allan G. Mediators of injury in neurotrauma: intracellular signal transduction and gene expression.// *J Neurotrauma*. - 1995. - V. 12 № 5. - P. 791-814.
154. Beatty, W. W., Fessler, R. G. Ontogeny of sex differences in open-field behavior and sensitivity to electric shock in the rat. // *Physiol. Behav.* – 1976. - 16. - P. 413-417.
155. Behn C., Araneda O. F., Aníbal J. L., Celedón G., González G. Hypoxia-related lipid peroxidation: Evidences, implications and approaches. // *Respiratory Physiology & Neurobiology*. - 2007. - V.158. - P.143–150.
156. Belzung C. Measuring exploratory behavior // *Handbook of molecular genetic techniques for brain and behavior research (Techniques in the behavioral and neural sciences)* / Eds.: W.E. Crusio, R.T. Gerlai. Elsevier, Amsterdam, 1999. – P.739-749.
157. Bengtson CP, Bading H. Nuclear calcium signaling.// *Adv Exp Med Biol*. - 2012. - V. 970. - P.377-405.
158. Benquet P., Gee C., Gerber U. Two distinct signaling pathways upregulate NMDA receptor responses via two distinct metabotropic glutamate receptor subtypes // *J Neurosci* - 2002. - V. 22. - P. 9679–9686.
159. Berger, S., Wolfer, D. P., Selbach, O., Alter, H., Erdmann, G., Reichardt, H. M., Chepkova, A. N., Welz, H., Hass, H. L., Lipp, H.-P., and Schutz, G. Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioural plasticity.// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 2006. - V. 103, - p. 195–200.
160. Berggren M., A. Gallegos, J.R. Gasdaska, P.Y. Gasdaska, J. Warneke, G. Powis, Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia.// *Anticancer Res.*- 1996. - V. 16. - P. 3459-3466.
161. Berggren M., Gallegos A., Gasdaska J.R., Gasdaska P.Y., Warneke J., Powis G., Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia.// *Anticancer Res.* - 1996. - v. 16. - p. 3459-3466.
162. Berman D.E., Dall'Armi C, Voronov SV, McIntaire LB, Zhang H, Moore AZ, Staniszewski A, Arancio O, Kim TW, Di Paolo G. Oligomeric amyloid-beta peptide disrupts phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate metabolism.// *Nat Neurosci*. - 2008. - Vol. 11. - P. 547-554.

163. Berman DE, Dall'Armi C, Voronov SV, McIntire LB, Zhang H, Moore AZ, Staniszewski A, Arancio O, Kim TW, Di Paolo G. Oligomeric amyloid-beta peptide disrupts phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate metabolism.// *Nat Neurosci.* - 2008. - V. 11(5). - P. 547-54..
164. Berridge M.J. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers//*Biochem. J.* - 1984. - v. 220(2). - P. 345-360.
165. Berridge M.J. Calcium: an universal second messenger // *Triangle.*-1985.- V24. – P.79-90.
166. Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR. Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis//*Cell.* - 1989. - Vol. 59. - P. 411-419
167. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling.// *Nature* - 1993. - V. 361. - P. 315–325.
168. Berridge MJ. Dysregulation of neural calcium signaling in Alzheimer disease, bipolar disorder and schizophrenia. //*Prion.* - 2013. - V. 7(1). - P. 2-13.
169. Berridge MJ. Calcium signalling and psychiatric disease: bipolar disorder and schizophrenia//*Cell Tissue Res.* - 2014. - V. 357(2).- P. 477-92
170. Biaglow J.E., Miller R.A. The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy// *Cancer Biol Ther.* - 2005. - V. 4, № 1.- P. 6-13.
171. Bickler P.E., Hansen B.M. Causes of calcium accumulation in rat cortical brain slices during hypoxia and ischemia: role of ion channels and membrane damage.// *Brain Res.* - 1994. - V. 665. - P.269-276.
172. Birnbaum S.G., Yuan P.X., Wang M., Vijayraghavan S., Bloom A.K., davis D.J., Gobeske K.T., Sweatt J.D., Manji H.K., Arsten A.F. Protein kinase C overactivity impairs prefrontal cortical regulation of working memory// *Science.* - 2004. - v. 306.- p. 882-884.
173. Blass J.P., Gibson G.E. Consequences of mild, graded hypoxia.//*Adv Neurol.* -1979. - V. 26. - P. 229-250.
174. Blizard, D. A., Lippman, H. R., Chen, J. J. Sex differences in open-field behavior in the rat: The inductive and activational role of gonadal hormones. //*Physiol. Behav.* -1975 – v. 14 . - p. 601-608.
175. Blomgren K., Zhu C., Wang X., Karlsson J.O., Leverin A.L., Bahr B.A., Mallard C., Hagberg H. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of 'pathological apoptosis'?//*Journal of Biological Chemistry.* - 2001. - V. 276. - P. 10191–10198.
176. Blumberg RM, Cady EB, Wigglesworth JS, McKenzie JE, Edwards AD. Relation between delayed impairment of cerebral energy metabolism and infarction following transient

- focal hypoxia-ischaemia in the developing brain.// *Exp Brain Res.* - 1997. - V. 113(1). - P. 130-137.
177. Boksa, P. Animal models of obstetric complications in relation to schizophrenia.// *Brain Research Reviews.* - 2004. - v. 45, - p. 1–17.
178. Boksa, P., Krishnamurthy, A., and Sharma, S. Hippocampal and hypothalamic type I corticosteroid receptor affinities are reduced in adult rats born by a caesarean procedure with or without an added period of anoxia. // *Neuroendocrinology* - 1996. - V. 64, - p. 25–34.
179. Bordet R., Deplanque D., Maboudou P., Puisieux F., Pu Q., Robin E., Martin A., Bastide M., Leys D., Lhermitte M., Dupuis B. Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance// *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* - 2000. - V. 20, № 8. - P. 1190-1196.
180. Brabham, T., Phelka, A., Zimmer, C., Nash, A., López, J. F., Vázquez, D. M. Effects of prenatal dexamethasone on spatial learning and response to stress is influenced by maternal factors. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* - 2000. - V. 279. - p. R1899–R1909.
181. Braun, T., Li, S., Sloboda, D. M., Li, W., Audette, M. C., Moss, T. J., Matthews, S.G., Polglase, G., Nitsos, I., Newnham, J.P., Challis, J. R. Effects of maternal dexamethasone treatment in early pregnancy on pituitary-adrenal axis in fetal sheep. // *Endocrinology.* - 2009, - v. 150 – p. 5466-5477.
182. Brennan A.R., Dolinsky B., Vu M-A.T., Stanley M., Yeckel M.F., Arnsten A.F.T. Blockade of IP3-mediated channel signaling in the rat medial prefrontal cortex improved spatial working memory// *Learning and memory.* - 2008. - v. 15. - p. 93-96
183. Brown, R. W., Diaz, R., Robson, A. C., Kotelevtsev, Y. V., Mullins, J. J., Kaufman, M, H., Seckl, J. R. The ontogeny of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development.// *Endocrinology.* - 1996, - v. 137 – p. 794-797.
- 184.** Bunce MW, Bergendahl K, Anderson RA. Nuclear PI(4,5)P(2): a new place for an old signal.// *Biochim Biophys Acta* - 2006.- v. 1761 – p. 560–569.
185. Burton A, Azevedo C, Andreassi C, Riccio A, Saiardi A. Inositol pyrophosphates regulate JMJD2C-dependent histone demethylation.// *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2013. - V. 110(47). - P. 18970-5.
186. Cai Z., Xiao F., Lee B., Paul J. A., Rhodes P. G. Prenatal hypoxia-ischemia alters expression and activity of nitric oxide synthase in the young rat brain and causes learning deficits // *Brain Res. Bull.* - 1999. - V. 49. № 5. - P. 359-365.
187. Calabresi P., Saulle E., Marfia G. A., Centonze D., Mulloy R., Picconi B., Hipskind R. A., Conquet F., Bernardi G. Activation of metabotropic glutamate receptor subtype 1/protein

kinase C/mitogen-activated protein kinase pathway is required for postischemic long-term potentiation in the striatum // *Mol. Pharmacol.* - 2001. - V. 60. - P. 808–815.

188. Calvo, N., Martijena, I. D., Molina, V. A., and Volosin, M. Metirapone pretreatment prevents the behavioral and neurochemical sequelae induced by stress.// *Brain Res.* - 1998. - V. 800, - p. 227–235.

189. Candelario-Jalil E., Mhadu N.H., Al-Dalain S.M., Martinez G., Leon O.S. Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. // *Neurosci Res.* - 2001. - V. 41, № 3. - P. 233-241.

190. Cannon W. *The Wisdom of the Body* // 2nd ed., NY: Norton Pubs. – 1939.

191. Caputa, M., Rogalska, J., Wentowska, K., and Nowakowska, A. Perinatal asphyxia, hyperthermia and hyperferremia as factors inducing behavioural disturbances in adulthood: A rat model.// *Behav. Brain Res.* - 2005. - V. 163, - p. 246–256.

192. Cardell M., Wieloch T. Time course of the translocation and inhibition of protein kinase C during complete cerebral ischemia in the rat. // *J Neurochem.* - 1993. - V. 61, № 4. - P. 1308-1314.

193. Carling D. AMP-activated protein kinase: balancing the scales.// *Biochimie.* - 2005. - V. 87(1). - P. 87-91.

194. Carvalho AP. Calcium in the nerve cell//*Handbook of neurochemistry.* New York; London: Plenum Press. - 1982. - V. 1.- P. 69-116.

195. Catalani, A., Casolini, P., Scaccianoce, S., Patacchioli, F. R., Spinozzi, P., and Angelucci, L. Maternal corticosterone during lactation permanently affects brain corticosteroid receptors, stress response and behaviour in rat progeny.//*Neuroscience.* – 2000. – v. 100(2). – p. 319-25.

196. Chan P.H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. // *J Cereb Blood Flow Metab.* - 2001. - V. 21, № 1. - P. 2-14.

197. Chan P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage// *Stroke.* - 1996. - V. 27, № 6. - P. 1124-1129.

198. Chan P.H., Epstein C.J., Kinouchi H., Kamii H., Chen S.F., Carlson E., Gafni J., Yang G., Reola L. Neuroprotective role of Cu Zn-superoxide dismutase in ischemic brain damage// *Adv Neurol.* - 1996. - V. 71. - P. 271-280.

199. Chang MJ, Zhong F, Lavik AR, Parys JB, Berridge MJ, Distelhorst CW. Feedback regulation mediated by Bcl-2 and DARPP-32 regulates inositol 1,4,5-trisphosphate receptor phosphorylation and promotes cell survival.// *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2014. - V. 111(3). - P. 1186-91.

200. Chen J., Graham S.H., Chan P.H., Lan J., Zhou R.L., Simon R.P. bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat. // *Neuroreport.* - 1995. - V. 6, № 2. - P. 394-398.

201. Chen J., Simon R. Ischemic tolerance in the brain // *Neurology*. 1997. V. 48. P. 306-311.
202. Chen Y., Cai J., Murphy T.J., Jones D.P. Overexpressed human mitochondrial thioredoxin confers resistance to oxidant-induced apoptosis in human osteosarcoma cells// *J Biol Chem*. - 2002. - V. 277, № 36.- P. 33242-33248.
203. Chen Z., Siu B., Ho Y.-S., Vincent R., Chua C.C., Hamdy R.C., Chua B.H.L. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice// *J Mol Cell Cardiol*. - 1998. - V. 30, № 11. - P. 2281-2289.
204. Choe C.U., Ehrlich B.E. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork.//*Sci STKE*. - 2006. - (363)-re15.
205. Choi D.W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic cell death. //*Trends Neurosci*. - 1995. - V. 18, № 2. - P. 58-60.
206. Choi D.W., Rothman S.M., The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. //*Annu Rev Neurosci*. - 1990. - V. 13. - P. 171-182.
207. Choi S, Thapa N, Hedman AC, Li Z, Sacks DB, Anderson RA. IQGAP1 is a novel phosphatidylinositol 4,5 biphosphate effector in regulation of directional cell migration.// *EMBO J*. - 2013. - V. 32(19). - P. 2617-30.
208. Chou IC, Trakht T, Signori C, Smith J, Felt BT, Vazquez DM, Barks JD Behavioral/environmental intervention improves learning after cerebral hypoxia-ischemia in rats.// *Stroke*. - 2001. - V. 32(9). - P. 2192-2197.
209. Christy A. Barlow, Rakesh S. Laishram and Richard A. Anderson Nuclear phosphoinositides: a signaling enigma wrapped in a compartmental conundrum //*Trends in Cell Biology*. - 2009. - Vol.20 No.1. - p. 25-35.
210. Chrousos G.P., Gold P.W. The concept of stress and stress disorders: overview of physical and behavioral homeostasis // *J. Amer. Med.* – 1992. – V.257. – P.1244-1252.
211. Clemens J.A. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants.// *Free Radic Biol Med*. - 2000. - V. 28, № 10. - P. 1526-1531
212. Cocco L, Martelli AM, Barnabei O, Manzoli FA. Nuclear inositol lipid signaling//*Adv Enzyme Regul*. – 2001. - V. 41. – p. 361–384.
213. Concannon CG, Tuffy LP, Weisová P, Bonner HP, Dávila D, Bonner C, Devocelle MC, Strasser A, Ward MW, Prehn JH. AMP kinase-mediated activation of the BH3-only protein Bim couples energy depletion to stress-induced apoptosis.// *J Cell Biol*. - 2010. - V. 189(1). - P. 83-94.
214. Conn P. J., Pin J. P. Pharmacology and function of metabotropic glutamate receptors // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. - 1997. - V. 37. - P. 205–237.

215. Costa LG. Signal transduction mechanisms in developmental neurotoxicity: the phosphoinositide pathway // *Neurotoxicology*. - 1994. - V. 15. - p. 19-27.
216. Coyle D.W., Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. // *Science*. - 1993. - V. 262, № 5134. - P. 689-695.
217. Crapo J.D., Oury T., Rabouille C., Slot J.W., Chang L.Y. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells// *Proc Natl Acad Sci USA*. -1992. - V. 89, № 21. - P. 10405-10409.
218. Crochemore C., Lu J., Wu Y., Liposits Z., Sousa N., Holsboer F., and Almeida O. Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation. // *Mol. Psychiatry*. -- 2005. - V. 10. - p. 790–798.
219. Cross J. L., Meloni B. P., Bakker A. J., Lee S., and Knuckey N. W. Modes of Neuronal Calcium Entry and Homeostasis following Cerebral Ischemia // *Stroke Research and Treatment*. – 2010- : 316862. Published online.
220. Crowther C.A., Harding J. Repeat doses of prenatal corticosteroids for women at risk of preterm birth for preventing neonatal respiratory disease.// *Cochrane Database Systemat Rev*. – 2003. - V. 1. - CD003935.
221. Czech MP. Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion.// *Annu Rev Physiol* - 2003. - V.65.- p.791–815.
222. Czech MP. PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface.// *Cell*. - 2000. - V.100. - p. 603–606.
223. Dammann O., Matthews S.G. Repeated antenatal glucocorticoid exposure and the developing brain. // *Pediatr Res*. – 2001. - V.50. – P. 563–564.
224. Das D.K., N. Maulik, M. Sato, P.S. Ray, Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. // *Mol Cell Biochem*. - 1999. -V. 196. - P. 59-67.
225. Das K.C., Lewis-Molock Y., White C.W. Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin// *Am J Respir Cell Mol Biol*. - 1997. - V. 17, № 6. - P. 713-726.
226. Datson NA, van der Perk J, de Kloet ER, Vreugdenhil E. Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression.// *Eur J Neurosci*. – 2001- v. - 14(4). - P. 675-89.
227. Dawson V.L., Dawson T.M. Free radicals and neuronal cell death// *Cell Death Differentiation*. -- 1996. - V. 3. - P. 71–78.
228. De Kloet E.R. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control // *Front. Neuroendocrinol*. – 1991. – V.12. – P.95-164.

229. De Kloet E.R. Hormones and the stressed brain // Ann. N.Y. Acad. Sci. - 2004. - V.1018. - P.1-15.
230. de Kloet ER, Fitzsimons CP, Datson NA, Meijer OC, Vreugdenhil E. Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: about receptors, transcription machinery and microRNA.// Brain Res. - 2009. - V. 1293. - P. 129-141.
231. De Kloet E.R., Joels M., Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease.// Nature Rev. Neurosci. - 2005. – v. 6 – p. 463-475.
232. De Kloet E.R., Vreugdenhil E., Oitzl M.S., Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease // Endocr Rev.- 1998.- V.19, N3. – P.269-301.
233. Decker MJ, Hue GE, Caudle WM, Miller GW, Keating GL, Rye DB Episodic neonatal hypoxia evokes executive dysfunction and regionally specific alterations in markers of dopamine signaling.// Neuroscience. - 2003. - V. 117(2). - P. 417-425
234. Decuypere JP, Monaco G, Bultynck G, Missiaen L, De Smedt H, Parys JB. The IP(3) receptor-mitochondria connection in apoptosis and autophagy.// Biochim Biophys Acta. - 2011 (a). - V. 1813(5). - P. 1003-1013.
235. Decuypere J.-P., Monaco G., Missiaen L. De Smedt H., Parys J.B., Bultynck G. IP(3) Receptors, Mitochondria, and Ca Signaling: Implications for Aging.// J. Aging res. - 2011 (b). - V. 2011. Article ID 920178, 20 pages
236. Dehay C. and Kennedy H. Cell-cycle control and cortical development// Nature Reviews Neuroscience. - 2007. - V. 8. - P. 438-450.
237. Dehay C. and Kennedy H.// Nature Reviews Neuroscience. - 2007. - V. 8. - P. 438-450.
238. Dekundy A, Pietraszek M, Schaefer D, Cenci MA, Danysz W. Effects of group I metabotropic glutamate receptors blockade in experimental models of Parkinson's disease.// Brain Res Bull. - 2006. - V. 69(3). - P. 318-26.
239. Delcour M, Russier M, Amin M, Baud O, Paban V, Barbe MF, Coq JO. Impact of prenatal ischemia on behavior, cognitive abilities and neuroanatomy in adult rats with white matter damage.// Behav Brain Res. - 2012a. - V. 232(1). - P. 233-244.
240. Delcour M, Olivier P, Chambon C, Pansiot J, Russier M, Liberge M, Xin D, Gestreau C, Alescio-Lautier B, Gressens P, Verney C, Barbe MF, Baud O, Coq JO. Neuroanatomical, sensorimotor and cognitive deficits in adult rats with white matter injury following prenatal ischemia.// Brain Pathol. - 2012b. - v. 22(1). - P. 1-16.
241. Delgado MR, Olsson A, Phelps EA. Extending animal models of fear conditioning to humans.// Biol Psychol. - 2006 – v. 73(1). – p. 39-48.
242. Delivoria-Papadopoulos M, Mishra OP. Nuclear mechanisms of hypoxic cerebral injury in the newborn.// Clin Perinatol. - 2004. - V. 31(1). - P. 91-105.

243. Dent MA, Raisman G, Lai FA. Expression of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor during axogenesis and synaptic contact in the central and peripheral nervous system of developing rat. //Development. - 1996. - V. 122. - P. 1029–1039
244. DeRijk R., de Kloet E.R. Corticosteroid receptor genetic polymorphisms and stress responsivity.// Endocrine, - 2005, - v. 28(3), - p. 263–270.
245. di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositids in cell regulation and membrane dynamics. //Nature – 2006. – v. 443. – p. 651- 657.
246. Di S., Malcher-Lopes R., Halmos K.C., Tasker J.G. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism // J. Neurosci. - 2003. – V.23(12). - P.4850-4857.
247. Diaz, R., Brown, R. W., R. Seckl, J. Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11b-Hydroxysteroid Dehydrogenase Types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. //The J. Neurosci. - 1998, - v. 18. – p. 2570–2580.
248. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels.//Pharmacol Rev. - 1999. - V. 51(1). - P.7-61
249. Diorio D., Viau V., Meaney M.J. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamo-pituitary-adrenal responses to stress // J. Neurosci. – 1993. – V.13. – P.3839-3847.
250. Dirnagl D, Iadecola C, Moskowitz MA: Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. //Trends Neurosci – 1999. – v. 22. – p. 391-397.
251. Dobbing J. Valnerable periods in developing brain. In: Applied neurochemistry. 1968., Eds A.N.Davison and Dobbing J. Blackwell, Oxford. - pp 287-316.
252. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Neuropharmacology – Special Issue on Cerebral Ischemia Mechanisms of Ischemic Brain Damage//Neuropharmacology. -2008. - V. 55(3). - P. 310–318.
253. Domanska-Janik K., Zablocka B. Protein kinase C as an early and sensitive marker of ischemia-induced progressive neuronal damage in gerbil hippocampus. //Mol Chem Neuropathol. - 1993. - V. 20, № 2. - P. 111-123
254. Dominguez G, Faucher P, Henkous N, Krazem A, Piérard C, Béracochéa D. Stress induced a shift from dorsal hippocampus to prefrontal cortex dependent memory retrieval: role of regional corticosterone.// Front Behav Neurosci. – 2014. - V.8:166. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00166. eCollection 2014.
255. Dormandy T., Wickens D. The experimental and clinical pathology of diene conjugation. //Chem Phys of Lipids. -1987. - V. 45, № 2-4. - P. 353-364.

256. Doughman RL, Firestone AJ, Anderson RA. Phosphatidylinositol phosphate kinases put PI4,5P(2) in its place. //J Membr Biol. – 2003. - V. 194. - P. 77–89.
257. Dragunow M., Goulding M., Faull R.L., Ralph R., Mee E., Frith R. Induction of c-fos mRNA and protein in neurons and glia after traumatic brain injury: pharmacological characterization. //Exp Neurol. - 1990. - V. 107, № 3. - P. 236-248.
258. Drejer J., Sheardown M., Nielsen E.O., Honoré T. Glycine reverses the effect of HA-966 on NMDA responses in cultured rat cortical neurons and in chick retina // Neurosci. Lett. – 1989. – V.98. P. 333-338.
259. Du Plessis, A.J., & Volpe, J.J. Perinatal brain injury in the preterm and term newborn.// Current Opinion in Neurology, - 2002. - V. 15, - p. 151–157
260. Dygalo N.N., Saharov D.G., Kalinina T.S., Shishkina G.T. Behavioral effects of single adverse exposure in a number of rat generations: the role of maternal glucocorticoids//журнал высшей нервной деятельности. – 1999. – т. 49(3). – с. 489-494.
261. Eichberg J., Dawson R.M.C. Phosphoinositides in myelin // Biochem. J. - 1965. -V. 96. - P. 644-650.
262. Eichberg J., Hauser G. The subcellular distribution of polyphosphoinositides in myelinated and unmyelinated rat brain // Biochem. Et Biophys. Acta – Lipids and Lipids Metabolism. - 1973. - V. 326. - P. 210-223.
263. Emerit J., Edeas M., Briocaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. //Biomed.Pharmacother. - 2004. - V.58. - P.39-46.
264. Emerit J., Edeas M., Briocaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. // Biomed.Pharmacother. - 2004. - V.58. - P.39-46.
265. Emgård, M., Paradisi, M., Pirondi, S., Fernandez, M., Giardino, L., Calzà, L. Prenatal glucocorticoid exposure affects learning and vulnerability of cholinergic neurons.// Neurobiol. Aging - 2007, - v. 28. - P. 112-121.
266. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.//Nature. - 1998. - V. 391(6662). - P. 43-50.
267. Erdeljan, P., MacDonald, J. F., Matthews, S. G. Glucocorticoids and serotonin alter glucocorticoid receptor mRNA levels in fetal guinea-pig hippocampal neurons, in vitro. //Reprod Fertil Dev. – 2005. - V. 17(7). - P. 743-749.
- 268.** Faenza I, Bregoli L, Ramazzotti G, Gaboardi G, Follo MY, Mongiorgi S, Billi AM, Manzoli L, Martelli AM, Cocco L. Nuclear phospholipase C beta1 and cellular differentiation.// Front Biosci. - 2008. - V. 13. - P. 2452–2463.

269. Fagni L., Chavis P., Ango F., Bockaert J. Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca^{2+} stores and ion channels in neurons // Trends Neurosci. - 2000. - V. 23. - P. 80–88.
270. Faravelli C, Lo Sauro C, Godini L, Lelli L, Benni L, Pietrini F, Lazzeretti L, Talamba GA, Fioravanti G, Ricca V. Childhood stressful events, HPA axis and anxiety disorders. //World J Psychiatry. - 2012. - V. 2(1). - P. 13-25.
271. Ferreri-Jacobia M, Mak DOD, Foskett JK. Translational mobility of the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca^{2+} release channel in endoplasmic reticulum membrane.// J Biol Chem , - 2005. - V.280 - p. 3824- 3831
272. Ferris CD, Haganir RL, Supattapone S, Snyder SH. Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles.// Nature. -1989. - V. 342. - P. 87–89.
273. Figueiredo H.F., Bruestle A., Bodie B.L., Tauchi M., Dolgas C.M., Hermann J.P. The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor // Eur. J. Neurosci. – 2003. – V.18. – P.2357-2364
274. Florian C., Roulet P. Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice // Behavioural Brain Research. - 2004. - V. 154№ 2. - P. 365-374.
275. Forder J.P., Tymianski M. Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: Involvement of postsynaptic density proteins, radicals, and oxidant molecules.//Neurosci. - 2009. - V.158. №1. - P. 293-300.
276. Foskett J.K. Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels in neurological diseases.//Pflugers Arch. - 2010. - V. 460(2). - P. 481-494.
277. Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO. Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels.//Physiol Rev. - 2007. – v. 87(2). - P. 593-658.
278. Frandsen A, Drejer J, Schousboe A. Glutamate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake into immature cerebral cortex neurons shows a distinct pharmacological profile.//J Neurochem. -1989. - V. 53(6). - P.1959-62.
279. Fuchs E, Flügge G. Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals.//Pharmacol Biochem Behav. - 2002. - V. 73(1). - P. 247-258
280. Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Noshita N., Sugawara T., Kawase M., Chan P.H. The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice// J Neurosci. - 2000. - V. 20, № 8. - P. 2817-2824

281. Fujioka, T., Fujioka, A., Tan, N., Chowdhury, G. M., Mouri, H., Sakata, Y., Nakamura, S. Mild prenatal stress enhances learning performance in the non-adopted rat offspring. //Neuroscience – 2001. - V. 103. - P. 301–307.
282. Fulford A.J. and Harbuz M.S. An introduction to the HPA axis // Handbook of Stress and the Brain / Eds Stechler T., Kalin N.M., Reul J.M.- 2005. - V. 15. – P.43-65.
283. Gass, P., Reichardt, H. M., Strekalova, T., Henn, F., and Tronche, F. Mice with targeted mutations of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: Models of depression and anxiety? //Physiol. Behav. - 2001. - V. 73,-- p. 811–825.
284. Gibson G.E., Blass J.P. Impaired synthesis of acetylcholine in brain accompanying mild hypoxia and hypoglycemia. //J Neurochem. - 1976. - V. 27, № 1. - P. 37-42.
285. Gilland E, Bona E, Hagberg H. Temporal changes of regional glucose use, blood flow, and microtubule- associated protein 2 immunostaining after hypoxia-ischemia in the immature rat brain. //Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. -1998 - v. 18(2). - P. 222–228.
286. Goebbels S, Oltrogge JH, Kemper R, Heilmann I, Bormuth I, Wolfer S, Wichert SP, Möbius W, Liu X, Lappe-Siefke C, Rossner MJ, Groszer M, Suter U, Frahm J, Boretius S, Nave KA. Elevated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in glia triggers cell-autonomous membrane wrapping and myelination.// J Neurosci. - 2010. - V. 30(26). - P. 8953-8964.
287. Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. Mitochondria as targets for chemotherapy // Apoptosis. - 2009. - V.14, N4. - P. 624-640
288. Golan H., Huleihel M., The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models//Developmental Science. - 2006. - V. 9(4), - p. 338–349
289. Golan H., Kashtutsky I., Hallak M., Sorokin Y., Huleihel M. Maternal hypoxia during pregnancy delays the development of motor reflexes in newborn mice. //Developmental Neuroscience. - 2004. - v. 26. - p. 24-29.
290. Gold P.W., Chrousos G.P. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states // Molecular Psychiatry. – 2002. – V.7. – P.254-275.
291. Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury.//J Neurosci. - 1993. - V. 13(8). - P. 3510-24.
292. Goldgaber D., Harris H.W., Hla T., Maciag T., Donnelly R.J., Jacobsen J.S., Vitek M.P., Gajdusek D.C. Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. //Proc Natl Acad Sci U S A. - 1989. - V. 86, № 19. - P. 7606-7610.

293. Gonzales ML, Anderson RA. Nuclear phosphoinositide kinases and inositol phospholipids // *J. of Cellular Biochemistry*. - 2006. - V. 97. - P. 252-260.
294. Grace CE, Kim SJ, Rogers JM. Maternal influences on epigenetic programming of the developing hypothalamic-pituitary-adrenal axis//*Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. - 2011. - V. 91(8). - P. 797-805.
295. Gray L, van den Buuse M, Scarr E, Dean B, Hannan AJ. Clozapine reverses schizophrenia-related behaviours in the metabotropic glutamate receptor 5 knockout mouse: association with N-methyl-D-aspartic acid receptor up-regulation.//*Int J Neuropsychopharmacol*. - 2009. - V. 12(1). - P. 45-60.
296. Grojean S, Schroeder H, Pourié G, Charriaut-Marlangue C, Koziel V, Desor D, Vert P, Daval JL. Histopathological alterations and functional brain deficits after transient hypoxia in the newborn rat pup: a long term follow-up.// *Neurobiol Dis*. - 2003. - V. 14(2). - P. 265-278.
297. Gupta, V., Awasthi, N., Wagner, B. J. Specific activation of the glucocorticoid receptor and modulation of signal transduction pathways in human lens epithelial cells *Invest. //Ophthalmol. Vis. Sci*. - 2007, - v. 48. - P. 1724-1734
298. Gwag B.J., Lobner D., Koh J.Y., Wie M.B., Choi D.W. Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation in vitro.// *Neuroscience*. - 1995. - V. 68, № 3. - P. 615-619.
299. Hagberg H, Mallard C. Effect of inflammation on central nervous system development and vulnerability//*Curr Opin Neurol*. - 2005. - V. 18(2). - P. 117-23.
300. Hagberg H. Mitochondrial impairment in the developing brain after hypoxia-ischemia//*J Bioenerg Biomembr*. - 2004. - V. 36(4). - p. 369-73.
301. Hakim S, Bertucci MC, Conduit SE, Vuong DL, Mitchell CA. Inositol polyphosphate phosphatases in human disease.// *Curr Top Microbiol Immunol*. - 2012. - V. 362. - P. 247-314.
302. Hammond C, Crépel V, Gozlan H, Ben-Ari Y. Anoxic LTP sheds light on the multiple facets of NMDA receptors.//*Trends Neurosci*. - 1994. - V. 17(11). - P. 497-503.
303. Han, J. S., Bizon, J. L., Chun, H. J., Maus, C. E., and Gallagher, M. Decreased glucocorticoid receptor mRNA and dysfunction of HPA axis in rats after removal of the cholinergic innervation to hippocampus.// *Eur. J. Neurosci*. - 2002. - V. 16, - p. 1399–1404.
304. Hansson AC, Cintra A, Belluardo N, Sommer W, Bhatnagar M, Bader M, Ganten D, Fuxe K. Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat.//*Eur J Neurosci*. – 2000. - V. 12(8) .- p. 2918-34.
305. Hansson AC, Cintra A, Belluardo N, Sommer W, Bhatnagar M, Bader M, Ganten D, Fuxe K. Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene

- expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat.// *Eur J Neurosci.* - 2000. - V.12 (8). - P. 2918-2934.
306. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders.//*Nat Rev Neurosci.* - 2010. - V. 11(10). - P.682-96.
307. Hashiguchi, H., Takeda, R., Nishimori, T., Ishida, Y. Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. //*Neurosci. Res.* - 2007, - v. 59. - P. 145–151.
308. Hassan A., von Rosenstiel P., Patchev V., Holsboer F., and Almeida O. Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone.// *Exp. Neurol.* – 1996. - V. 140. - P. 43–52.
309. Hattori I., Takagi Y., Nozaki K., Kondo N., Bai J., Nakamura H., Hashimoto N., Yodoi J., Hypoxia-ischemia induces thioredoxin expression and nitrotyrosine formation in new-born rat brain// *Redox Rep.* - 2002. - v.7. - p. 256-259
310. Hauser, J., Feldon, J., Pryce, C. R. Direct and dam-mediated effects of prenatal dexamethasone on emotionality, cognition and HPA axis in adult Wistar rats. //*Horm Behav.* – 2009. - V. 56. - P. 364-375.
311. Hayes J.D., Milner S.W., Walker S.W. Expression of glyoxalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase isoenzymes in different bovine tissues. //*Biochim Biophys Acta.* - 1989. - V. 994, № 1. - P. 21-29.
312. Heck JN, Mellman DL, Ling K, Sun Y, Wagoner MP, Schill NJ, Anderson RA.. A conspicuous connection: structure defines function for the phosphatidylinositol-phosphate kinase family.// *Crit Rev Biochem Mol Biol.* – 2007. -- V. 42. - P. 15–39.
313. Heck S., Kullmann M., Gast A., Ponta H., Rahmsdorf H.J., Herrlich P., Cato A.C. A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1 // *EMBO J.* – 1994. – V.13. – P.4087-4095.
314. Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies.//*Biol Psychiatry.* - 2001. - V. 49(12). - P. 1023-39. Review.
315. Heim C, Plotsky PM, Nemeroff CB. Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression.// *Neuropsychopharmacology.* - 2004. - V. 29(4). - P. 641-648.
316. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis.//*Nature.* 2000. V. 407(6805). P. 770-776.

317. Hengerer B., Lindholm D., Heumann R., Ruther U., Wagner E.F., Thoenen H. Lesion-induced increase in nerve growth factor mRNA is mediated by c-fos.// *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1990. - V. 87, № 10. - P. 3899-3903.
318. Henrich-Noack P, Hatton CD, Reymann KG The mGlu receptor ligand (S)-4C3HPG protects neurons after global ischaemia in gerbils.//*Neuroreport*. - 1998. - V. 9(6). - P. 985-8.
319. Henry I.P. Biological basis of the stress response // *News Physiol. Sci.* – 1993. – V.8, N4. – P. 125-136.
320. Herlenius, E., and Lagercrantz, H. Development of neurotransmitter systems during critical periods// *Experimental Neurology*. – 2004. - v. 190. - p. S8–S21.
321. Herman J.P., Mueller N.K., Figueiredo H., and Cullinan W.E. Neurocircuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress response – an overview // *Handbook of Stress and the Brain* / Eds. Steckler T., Kalin N.H., Reul J.M.H.M. - Amsterdam, Elsevier. - 2005. -P. 405-418.
322. Hermans D, Craske MG, Mineka S, Lovibond PF. Extinction in human fear conditioning.// *Biol Psychiatry*. - 2006. - V. 60(4). - P. 361-368.
323. Hermans E., Challiss, R. A. Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors // *Biochem. J.* - 2001. - V. 359. - P. 465–484.
324. Herrero, A. I., Sandi, C., and Venero, C. Individual differences in anxiety trait are related to spatial learning abilities and hippocampal expression of mineralocorticoid receptors.// *Neurobiol. Learn. Mem.* - 2006. - V. 86. - p. 150–159.
325. Hertle D.N., Yeckel M.F. Distribution of Inositol-1,4,5-trisphosphate Receptor Isotypes and Ryanodine Receptor Isotypes During Maturation of The Rat Hippocampus// *Neuroscience*. - 2007. - V. 150(3). - P. 625–638.
326. Hewitt, D. P., Mark, P. J., Waddell, B. J. Glucocorticoids prevent the normal increase in placental vascular endothelial growth factor expression and placental vascularity during late pregnancy in the rat. //*Endocrinology*. – 2006. - V. 147. - P. 5568–5574.
327. Hisanaga K., Sagar S.M., Sharp F.R. N-methyl-D-aspartate antagonists block fos-like protein expression induced via multiple signaling pathways in cultured cortical neurons. // *J Neurochem*. - 1992. - V. 58, № 5. - P. 1836-1844
328. Hofmann SG. Cognitive processes during fear acquisition and extinction in animals and humans: implications for exposure therapy of anxiety disorders.// *Clin Psychol Rev*. - 2008. - V. 28(2). - P. 199-210.
329. Hokin MR, Hokin LE. Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices.// *J Biol Chem*. - 1953. - V. 203. - P. 967–977.

330. Holl C.S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity // *J. Comp. Physiol.* – 1936. – V.22. – P.345-352.
331. Holmes C. Neuropathology and genetics of dementia. // *Int J Psychiatry Clin Pract.* - 2003. - V. 7(1). - P. 71-73.
332. Holmgren A. Thioredoxin// *Annu Rev Biochem.* - 1985. - V. 54. - P. 237-271.
333. Hori K., M. Katayama, N. Sato, K. Ishii, S. Waga, J. Yodoi, Neuroprotection by glial cells through adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin (ADF/TRX).// *Brain Res.* - 1994. - V. 652. - P. 304-310.
334. Horhammer L., Wagner H., Richter G. Zur papier chromatographischen auftrennung von phosphatiden//*Biochem. Z.* – 1959. – B 331(3). - S. 155-161.
335. Hornbein T.F., Townes B.D., Schoene R.B., Sutton J.R., Houston C.S. The cost to the central nervous system of climbing to extremely high altitude.// *N Engl J Med.* - 1989. - V.321. - P.1714-9.
336. Hu B.R., Liu C.L., Ouyang Y., Blomgren K., Siesjo B.K. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxiaischemia declines during brain maturation. // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism,* - 2000. - V. 20. - P. 1294–1300.
337. Huang C.Y., Fujimura M., Chang Y.Y., Chan P.H. Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase attenuates acute activation of activator protein-1 after transient focal cerebral ischemia in mice// *Stroke.* - 2001. - V. 32, № 3. - P. 741-747.
338. Hutter D., Kingdom J., Jaeggi E. Causes and Mechanisms of intra uterine hypoxia and its impact on the cardiovascular system: a review. // *Int.J of Pediatrics.* - 2010. - v.2010. - p.1-9.
339. Irvine RF. Nuclear lipid signalling.// *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2003. - V. 4. - P. 349–360.
340. Ishimaru H., Takahashi A., Ikarashi Y., Maruyama Y. Immunohistochemical and neurochemical studies of hippocampal cholinergic neurones after ischaemia. // *Neuroreport.* - 1995. - V. 6, № 3. - P. 557-560.
341. Ito T., Morita N., Nishi M. In vitro and in vivo immunocytochemistry for the distribution of mineralocorticoid receptor with the use of specific antibody // *Neurosci. Res.* – 2000. – V.37. – P.173-182.
342. Ivanova H., Vervliet T., Parys JB., De Smedt H., Bultynck G. Inositol1,4,5-trisphosphate receptor-isoform diversity in cell death and survival//*Biochem. Biophys. Acta.* - 2014. - V. 18(43). - P. 2164-2183
343. Jacobson L., Sapolsky R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis // *Endocr. Rev.*- 1991. –V.12. – P.118–134.
344. Jacobson LH, Cryan JF. Feeling strained? Influence of genetic background on depression-related behavior in mice: a review.//*Behav Genet.* - 2007. - V. 37(1). - P. 171-213.

345. Jagadapillai R, Mellen NM, Sachleben LR Jr, Gozal E. Ceftriaxone preserves glutamate transporters and prevents intermittent hypoxia-induced vulnerability to brain excitotoxic injury.// PLoS One. - 2014. - V. 9(7) - e100230.
346. Jankord R, Herman JP. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress.// Ann N Y Acad Sci.- 2008. - V. 1148. - P. 64-73.
347. Jin Y, Silverman AJ, Vannucci SJ. Mast cells are early responders after hypoxia-ischemia in immature rat brain.// Stroke. - 2009. - V. 40(9). - P. 3107-3112.
348. Johansen F.F., Tender N., Berg M., Zimmer J, Diemer NH. Hypothermia protects somatostatinergic neurons in rat dentate hilus from zinc accumulation and cell death after cerebral ischemia // Mol. Chem. Neuropathol.- 1993.- V.18. – P. 161-172.
349. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis.// Essays Biochem. – 2010. - V. 47. - P. 69-84.
350. Kabbaj, M., Devine, D. P., Savage, V. R., and Akil, H. Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: Differential expression of stress-related molecules.// J. Neurosci. - 2000. - v. 20, - p. 6983–6988.
351. Kadotani H, Namura S, Katsuura G, Terashima T, Kikuchi H. Attenuation of focal cerebral infarct in mice lacking NMDA receptor subunit NR2C.//Neuroreport. - 1998. - V. 9(3). - p. 471-5.
352. Kaeffer N., V. Richard, C. Thuillez, Delayed coronary endothelial protection 24 hours after preconditioning: role of free radicals.// Circulation. - 1997. - V. 96. - P. 2311-2316.
353. Kakumoto T. and Nakata T. Optogenetic Control of PIP₃: PIP₃ Is Sufficient to Induce the Actin-Based Active Part of Growth Cones and Is Regulated via Endocytosis//PLoS One. - 2013; - v. 8(8) - e70861. Published online Aug 7, 2013.
354. Kamphuis, P. J. G. H., Gardoni, F., Kamal, A., Croiset G., Bakker, J. M, Cattabeni F., Gispen, W. H., van Bel, F., Di Luca, M., Wiegant, V. M. Long-lasting effects of neonatal dexamethasone treatment on spatial learning and hippocampal synaptic plasticity. Involvement of the NMDA receptor complex. //The FASEB Journal express article. – 2003. - V. 10.1096 - fj.02-0333fje
355. Kamsler A., Segal M., Hydrogen Peroxide As a Diffusible Signal Molecule in Synaptic Plasticity// Molecular Neurobiology - 2004. - V.29 №2 - P.167–178
356. Kaplan J., Dimlich R.V., Biro M.H., Hedges J. Mechanisms of ischemic cerebral injury// Resuscitation. - 1987. - V. 15, № 3. - P. 149-169.
357. Kapoor, A., Petropoulos, S., Matthews, S, G. Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids.// Brain Res. Rev. – 2007. - V. 57. - P. 586-595.

358. Kasri N.N., Holves A.M., Bultynck G., Parys J.B., Bootman M.D., Rietdorf K., Missiaen L., McDonald F., Smedt H.D., Conway S.J., Holmes A.B., Berridge M.J., Roderick H.L. Regulation of InsP3 receptor activity by neuronal Ca²⁺-binding proteins.// *EMBO J.* 2004. v. 23. p. 312-321.
359. Kato H., Kogure K., Araki T., Liu X.H., Kato K., Itoyama Y. Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the hippocampus following ischemia in a gerbil model of ischemic tolerance// *J Cereb Blood Flow Metab.* - 1995. - V. 15, № 1. - P. 60-70.
360. Katsuki H., Akino N., Okuda S., Saito H. Antioxidants, but not cAMP or high K⁺, prevent arachidonic acid toxicity on neuronal cultures.// *Neuroreport.* - 1995. - V. 6, № 8. - P. 1101-1104.
361. Keller J.N., Kindy M.S., Holtsberg F.W., St Clair D.K., Yen H.C., Germeyer A., Steiner S.M., Bruce-Keller A.J., Hutchins J.B., Mattson M.P. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction// *J Neurosci.* - 1998. - V. 18, № 2. - P. 687-697.
362. Keller-Wood M., Dallman M.F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion // *Enocr. Rev.* – 1984. – V.5(1). – P.1-24.
363. Kemp P., Hubner G., Hawthorne J.N. Phosphoinositides. 3. Enzymic hydrolysis of inositol-containing phospholipids. — *Biochem. J.*, 1961, 79, N 1. — p. 193 — 200.
- 364.** Kessler DA, Levine H. Fluctuation-induced diffusive instabilities. // *Nature.* - 1998. - V. 394. - P. 556–558.
365. Ketschek A, Gallo G Nerve growth factor induces axonal filopodia through localized microdomains of phosphoinositide 3-kinase activity that drive the formation of cytoskeletal precursors to filopodia.// *J Neurosci.* - 2010. - V. 30. - P. 12185–12197
366. Khozhai L. I., Otellin V. A., Kostkin V. B. Formation of the neocortex in rats after prenatal hypoxia // *Neuroscience and Behavioral Physiology.* - 2004. - V. 34. № 2. - P. 207-211.
367. Kino T., Chrousos G.P. Glucocorticoid effects on gene expression / In: *Handbook of Stress and the Brain: Part 1. The neurobiology of stress.* Vol.15// Eds: T. Steckler, N.H. Kalin, J.M.H.M. Reul Amsterdam etc.: Elsevier. – 2005. – P. 295-310.
368. Kinouchi H., Sharp F.R., Chan P.H., Koistinaho J., Sagar S.M., Yoshimoto T. Induction of c-fos, junB, c-jun, and hsp70 mRNA in cortex, thalamus, basal ganglia, and hippocampus following middle cerebral artery occlusion. // *J Cereb Blood Flow Metab.* - 1994. - V. 14, № 5. - P. 808-817.

369. Kippin, T. E., Szumlinski, K. K., Kapasova, Z., Rezner, B., See, R. E. Prenatal stress enhances responsiveness to cocaine. //Neuropsychopharmacology. – 2008. - V. 33. - P. 769-782.
370. Kishida K. T., Klann E. Reactive Oxygen Species, Synaptic Plasticity, and Memory. Oxidative Neural Injury, Contemporary Clinical Neuroscience.// S.C. Veasey (ed.). Humana Press. - 2009. - P.1-27.
371. Kishida K.T., Klann E. Sources and targets of reactive oxygenspeacies in synaptic plasticity and memory.// Antioxid. Redox Signal. - 2007. - V. 9. - P.233-244.
372. Kishida K.T., Klann E. Sources and targets of reactive oxygenspeacies in synaptic plasticity and memory. //Antioxid. Redox Signal. - 2007. - V. 9. - P.233-244.
373. Kiviluoto S, Vervliet T, Ivanova H, Decuypere JP, De Smedt H, Missiaen L, Bultynck G, Parys JB. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors during endoplasmic reticulum stress.//Biochim Biophys Acta. - 2013. - V. 1833(7). - P. 1612-24.
374. Kloner R.A., Przyklenk K., Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion: resolved and unresolved issues. //Circulation. - 1989. - V. 80, № 5. - P. 1115–1127.
375. Koh JY, Goldberg MP, Hartley DM, Choi DW. Non-NMDA receptor-mediated neurotoxicity in cortical culture.//J Neurosci. - 1990. - V. 10(2). - P.693-705.
376. Korte, S. M., de Boer, S. F., de Kloet, E. R., and Bohus, B. Anxiolytic-like effects of selective mineralocorticoid and glucocorticoid antagonists on fear-enhanced behavior in the elevated plus-maze.// Psychoneuroendocrinology - 1995. - V. 20. - p. 385–394.
377. Kostyuk PG., Verkhatsky AN. Calcium signaling in nturon system.// Chichestert: Willey. - 1995.
378. Kotecha S., Jackson M., Al-Mahrouki A., Roder J., Orser B., MacDonald J. Co-stimulation of mGluR5 and N-methyl-D-aspartate receptors is required for potentiation of excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons.// J Biol Chem. - 2003. - V. – 278. - P. 27742-27749.
379. Kreider, M. L, Aldridge, J. E., Cousins, M. M., Oliver, C. A., Seidler, F. J., Slotkin, T. A. Disruption of rat forebrain development by glucocorticoids: critical perinatal periods for effects on neural cell acquisition and on cell signaling cascades mediating noradrenergic and cholinergic neurotransmitter/neurotrophic responses. //Neuropsychopharmacology. - 2005b. - V. 30. - P. 1841–1855.
380. Kreider, M. L, Levin, E. D., Seidler, F. J., Slotkin, T. A. Gestational dexamethasone treatment elicits sex-dependent alterations in locomotor activity, reward-based memory and hippocampal cholinergic function in adolescent and adult rats. //Neuropsychopharmacology. - 2005a. - V. 30. - P. 1617-1623.

381. Kreider, M. L., Tate1, C. A., Cousins, M. M., Oliver1 C. A., Seidler, F. J., Slotkin, T. A. Lasting effects of developmental dexamethasone treatment on neural cell number and size, synaptic activity, and cell signaling: critical periods of vulnerability, dose–effect relationships, regional targets, and sex selectivity. //Neuropsychopharmacology. – 2006. - V. 31. - P. 12–35.
382. Kucharczyk R, Zick M, Bietenhader M, Rak M, Couplan E, Blondel M, Caubet SD, di Rago JP. Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches. //Biochim Biophys Acta. – 2009. V. - 1793(1). - P. 186-99.
383. Kumar R, Thompson EB. "The structure of the nuclear hormone receptors".// Steroids. – 1999. - V. 64(5). - P. 310–9.
384. Kurylo DD. Effects of quinpirole on operant conditioning: perseveration of behavioral components.//Behav Brain Res. - 2004. - V. 155(1). - P. 117-124.
385. Ladd CO, Huot RL, Thiruvikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation.// Biol Psychiatry. - 2004. - V. 55(4). - P. 367-375.
386. Lai, M., Horsburgh, K., Bae, S.-E., Carter, R. N., Stenvers, D. J., Fowler, J. H., Yau, J. L., Gomez-Sanchez, C. E., Holmes, M. C., Kenyon, C. J., Seckl, J. R., and Macleod, M. R. Forebrain mineralocorticoid receptor overexpression enhances memory, reduces anxiety and attenuates neuronal loss in cerebral ischaemia. //Eur. J. Neurosci. - 2007. - V. 25. - P. 1832–1842.
387. Lahiri S., Roy A., Li J. Mokashi A., Baby S.M. Ca²⁺ responses to hypoxia are mediated by IP₃-R on Ca²⁺ store depletion.//Adv Exp Med Biol. - 2003 - V. 536 - P. 25-32.
388. Leak R.K., A.K. Liou, M.J. Zigmond, Effect of sublethal 6-hydroxydopamine on the response to subsequent oxidative stress in dopaminergic cells: evidence for preconditioning. //J Neurochem. - 2006. - V. 99. - P. 1151-1163.
389. Lee HJ, Choi JS, Brown TH, Kim JJ. Amygdalar nmda receptors are critical for the expression of multiple conditioned fear responses//. J Neurosci. - 2001. - V. 21(11). - P. 4116-4124.
390. Leist M, Jäätelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms.// Nat Rev Mol Cell Biol. - 2001. - V. 2(8). - P. 589-598.
391. Lehmann, J., Stohr, T., Feldon, J. Long-term effects of prenatal stress experiences and postnatal maternal separation on emotionality and attentional processes. //Behav. Brain Res. – 2000. - V. 107. - P. 133–144.
392. Leon M, Moltz H. Maternal pheromone: discrimination by pre-weanling albino rats. //Physiol Behav. - 1971. - V. 7(2). - p. 265-267.

393. Leonard CT, Goldberger ME. Consequences of damage to the sensomotor cortex in neonatal and adult cats. I. Sparing and recovery of function // *Dev Brain Res.* - 1987. - V. 32. - P. 1-14
394. Lightman S.L., Young W.S. Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat // *J. Physiol.* - 1988. - V. 403. - P. 511-523.
395. Lin T.N., Liu T.H., Xu J., Hsu C.Y., Sun G.Y. Brain polyphosphoinositide metabolism during focal ischemia in rat cortex. // *Stroke.* - 1991. - V. 22, № 4. - P. 495-498.
396. Lindenau J., Noack H., Possel H., Asayama K., Wolf G. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. // *Glia.* - 2000. - V. 29, № 1. - P. 25-34.
397. Lipp H.P., Wolfer D. P. Genetically modified mice and cognition // *Curr. Opin. Neurobiol.* - 1998. - V. 8, № 2. - P. 272-280.
398. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // *Physiol. Rev.* - 1999. - Vol. 79. - P. 1431-1568.
399. Liu J, Narasimhan P, Yu F, Chan PH. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin. // *Stroke.* 2005. v. 36(6), p.1264-9.
400. Liu C.L., Siesjö B.K., Hu B.R. Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia-ischemia changes during brain development. // *Neuroscience.* - 2004. - V. 127. - P. 113-123.
401. Liu P.K., Salminen A., He Y.Y., Jiang M.H., Xue J.J., Liu J.S., Hsu C.Y. Suppression of ischemia-induced fos expression and AP-1 activity by an antisense oligodeoxynucleotide to c-fos mRNA. // *Ann Neurol.* - 1994. - V. 36, № 4. - P. 566-576.
402. Liu S., Lau L., Wei J. et al. Expression of Ca²⁺-permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia // *Neuron.* - 2004. - V. 43(1). - P. 43-55.
403. Liu X.H., Kato H., Araki T., Itoyama Y., Kato K., Kogure K. An immunohistochemical study of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase following focal cerebral ischemia in the rat // *Brain Res.* - 1994 a. - V. 644, № 2. - P. 257-266.
404. Liu X.H., Kato H., Araki T., Itoyama Y., Kato K., Kogure K. An immunohistochemical observation of manganese superoxide dismutase in rat substantia nigra after occlusion of middle cerebral artery // *Neurosci. Lett.* - 1994 b. - V. 173, № 1-2. - P. 103-106.
405. Lobner D., Choi D.W. Preincubation with protein synthesis inhibitors protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation-induced death. // *Neuroscience.* - 1996. - V. 72, № 2. - P. 335-341.

406. Lu C., Chan S. L., Fu W., Mattson M.P. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal facilitates opening of voltage-dependent Ca^{2+} channels in neurons by increasing protein tyrosine phosphorylation.// *Biol. Chem.* - 2002. - V.277. - P.24368–24375.
407. Lubics A, Reglodi D, Tamás A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury.// *Behav Brain Res.* - 2005. - V. 157(1). - P. 157-165.
408. Lukyanova L. Bioenergetic hypoxia: Definitions and Methods of Correction.// *Exp. Biol. Med.*-1997. - V. 124 (9). - P. 244-254.
409. Lyons MR, West AE. Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription.// *Prog Neurobiol.* - 2011. - V. 94(3). - P. 259-95.
410. Mach M., Dubovicky M., Navarova J., Brucknerova I., Ujhazy E. Experimental modeling of hypoxia in pregnancy and early postnatal life.// *Interdisc. Toxicology.* - 2009. - V. 2(1). - P. 28-32.
411. Macleod M., Johansson I., Soderstrom I., Lai M., Gido G., Wieloch T., Seckl J., and Olsson T. Mineralocorticoid receptor expression and increased survival following neuronal injury.// *Eur. J. Neurosci.* - 2003. - V. 17. - P. 1549–1555.
412. Macri S, Würbel H. Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: a critical review of the maternal mediation hypothesis.//*Horm Behav.* - 2006. - V. 50(5). - P. 667-80.
413. Maiese K., Boniece I.R., Skurat K., Wagner J.A. Protein kinases modulate the sensitivity of hippocampal neurons to nitric oxide toxicity and anoxia. // *J Neurosci Res.* - 1993. - V. 36, № 1. - P. 77-87.
414. Maiti P., Muthuraju S., Ilavazhagan G., Shashi B. Singh Hypobaric hypoxia induces dendritic plasticity in cortical and hippocampal pyramidal neurons in rat brain. // *Behavioural Brain Research.* - 2008. - V.189 - P.233–243
415. Maiti P., Muthuraju S., Ilavazhagan G., Shashi B. Singh Hypobaric hypoxia induces dendritic plasticity in cortical and hippocampal pyramidal neurons in rat brain// *Behavioural Brain Research* - 2008. - V.189 - P.233–243
416. Maiti P., Singh S.B., Sharma A.K. Muthuraju S, Banerjee PK, Ilavazhagan G. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. // *Neurochem Int.* - 2006. - V. 49. №8. - P.709-16.
417. Manahan-Vaughan D., Herrero I., Reymann K. G., Sánchez-Prieto J. Presynaptic group 1 metabotropic glutamate receptors may contribute to the expression of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region // *Neuroscience.* - 1999. - V. 94. - P. 71–82.
418. Manna S.K., Zhang H.J., Yan T., Oberley L.W., Aggarwal B.B. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and

- activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1// J Biol Chem. - 1998. - V. 273, № 21. - P. 13245-13254.
419. Manzoli FA, Capitani S, Mazzotti G, Barnabei O, Maraldi NM. Role of chromatin phospholipids on template availability and ultrastructure of isolated nuclei.// Adv Enzyme Regul. - 1982. - V. 20. - P.247-262.
420. Marion E, Kaisaki PJ, Pouillon V, Gueydan C, Levy JC, Bodson A, Krzentowski G, Daubresse JC, Mockel J, Behrends J, Servais G, Szpirer C, Kruys V, Gauguier D, Schurmans S. The gene INPPL1, encoding the lipid phosphatase SHIP2, is a candidate for type 2 diabetes in rat and man.// Diabetes. - 2002. - V. 51.- P. 2012-2017.
421. Mark, P. J., Augustus, S., Lewis, J. L., Hewitt, D. P., Waddell, B. J., Mark, P. J., Augustus, S. Changes in the placental glucocorticoid barrier during rat pregnancy: impact on placental corticosterone levels and regulation by progesterone.// Biol. Reprod. - 2009. - V. 80. - P. 1209-1215.
422. Marklund S.L. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species// Biochem J. - 1984. - V. 222, № 3. - P. 649-655.
423. Marks N, Berg MJ: Recent advances on neuronal caspases in development and neurodegeneration. //Neurochem Int - 1999. - V. 35. - P. 195-220
424. Martelli AM, Ognibene A, Buontempo F, Fini M, Bressanin D, Goto K, McCubrey JA, Cocco L, Evangelisti C. Nuclear phosphoinositides and their roles in cell biology and disease.// Crit Rev Biochem Mol Biol. - 2011. - V.46(5). - P. 436-57.
425. Martin TF. Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. //Annu Rev Cell Dev Biol. 1998. - V. 14. - P. 231-264.
426. Martinez-Romero R., Canuelo A., Martinez-Lara E., Hernandez R., Del Moral M.L., Pedrosa J.A., Peinado M.A., Siles E. Aging affects but does not eliminate the enzymatic antioxidative response to hypoxia/reoxygenation in cerebral cortex// Exp Gerontol. - 2006. - V. 41(1). - P. 25-31.
427. Maternal corticosterone during lactation permanently affects brain corticosteroid receptors, stress response and behaviour in rat progeny.// Neuroscience. - 2000. - V. 100, p. 319-325.
428. Matthews, S. G. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. //Pediatr. Res. 2000. V. 47, p. 291-300.

429. Matthews S.G., Owen D., Banjanin S., Andrews M.H. Glucocorticoids, hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) development, and life after birth. *Endocr Res.* – 2002. – V. 28. – P. 709–718.
430. Mattson M.P. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. // *Trends Neurosci.* 1998. V.20. P. 52-57.
431. Mayer ML. Glutamate receptor ion channels. // *Curr Opin Neurobiol.* 2005. V. 15(3). P. 282-8.
432. McCollum J. F., Woo C. C., Leon M. Granule and mitral cell densities are unchanged following early olfactory preference training//*Dev Brain Res.* 1997. Vol. 99. N 1. P. 118-120.
433. McCord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969. V. 244, № 22. P. 6049-6055.
434. McCrea HJ and De Camilli P. mutation in phosphoinositide metabolizing enzymes and human disease//*Physiology* – 2009. – V. 24. – P. 8-16.
435. McCullers DL, Herman JP. Mineralocorticoid receptors regulate bcl-2 and p53 mRNA expression in hippocampus.// *Neuroreport.* 1998. V.9 (13). P. 3085-3089.
436. McGaugh JL, Cahill L Interaction of neuromodulatory systems in modulating memory storage.// *Behav Brain Res.* - 1997. - V. 83(1-2). - P. 31-38.
437. McQuillen PS, Sheldon RA, Shatz CJ, Ferriero DM. Selective vulnerability of subplate neurons after early neonatal hypoxia-ischemia//*J Neurosci.* - 2003. - V. 23(8). - P. 3308-3315.
438. Meaney MJ, Szyf M, Seckl JR. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health.//*Trends Mol Med.* - 2007. - V. 13(7). - P. 269-77.
439. Meijer O. C., Topic B., Steenbergen P. J., Jocham G., Huston J. P., and Oitzl M. S. Correlations between Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis Parameters Depend on Age and Learning Capacity // *Endocrinology.* – 2005. – V.146, N 3.- P.1372–1381.
440. Ménager C, Arimura N, Fukata Y, Kaibuchi K. PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation // *J Neurochem.* 2004. V. 89. P. 109-118/
441. Merry DE, Veis DJ, Hickey WF, Korsmeyer SJ. bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS.//*Development.* - 1994. - V. 120(2). - P. 301-311.
442. Mesplès B, Plaisant F, Fontaine RH, Gressens P. Pathophysiology of neonatal brain lesions: lessons from animal models of excitotoxicity.// *Acta Paediatr.* - 2005. - V. 94(2).- P. 185-90.
443. Michell, R.H. Inositol derivatives: evolution and functions. //*Nature Rev. Mol. Cell Biol.* - 2008. - V. 9. - P. 151-161.

444. Miller RJ. Calcium signaling in neurons//Trends Neurisci. - 1988. - V. 30(1). - P. 46-48.
445. Mineur YS, Belzung C, Crusio WE. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice.//Behav Brain Res. - 2006. - V. 175(1). - P. 43-50
446. Miranda-Vizuete A, Damdimopoulos AE, Spyrou G. The mitochondrial thioredoxin system. //Antioxid Redox Signal. - 2000. - V. 2(4). - P. 801-810.
447. Mishra O.P., Delivoria-Papadopoulos M. Anti-oxidant enzymes in fetal guinea pig brain during development and the effect of maternal hypoxia. //Brain Res. - 1988. - V. 470, № 2. - P. 173-179.
448. Mishra O.P., Delivoria-Papadopoulos M., Wagerle L.C. Anti-oxidant enzymes in the brain of newborn piglets during ischemia followed by reperfusion.// Neuroscience. - 1990. - V. 35, № 1. - P. 211-215.
449. Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Inositol tetrakisphosphate (IP₄)- and inositol triphosphate (IP₃)-dependent Ca²⁺ influx in cortical neuronal nuclei of newborn piglets following graded hypoxia.//Neurochem Res. - 2004. - V. 29(2). - P. 391-316.
450. Mistry R., Prabhu G., Godwin M., Challiss R.A.J. Stimulatory effects of the putative metabotropic glutamate receptor antagonist L-AP3 on phosphoinositide turnover in neonatal rat cerebral cortex // British Journal of Pharmacology. - 1996. - V. 117. - P. 1309-1317.
451. Mobley Mobley W.C., Neve R.L., Prusiner S.B., McKinley M.P. Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain. //Proc Natl Acad Sci U S A. - 1988. - V. 85, № 24. - P. 9811-9815.
452. Mohri D., Satomi F., Kondo E., Fukuoka T., Sakagami M., Noguchi K. Change in gene expression in facial nerve nuclei and the effect of superoxide dismutase in a rat model of ischemic facial paralysis.// Brain Res. - 2001. - V. 893, № 1-2. - P. 227-236.
453. Morita-Fujimura Y., Fujimura M., Yoshimoto T., Chan P.H. Superoxide during reperfusion contributes to caspase-8 expression and apoptosis after transient focal stroke// Stroke. - 2001. - V. 32, № 10. - P. 2356-2361.
454. Moroni F., Cozzi A., Lombardi G., Sourtcheva S., Leonardi P., Carfi M., Pellicciari R. Presynaptic mGlu1 type receptors potentiate transmitter output in the rat cortex // Eur. J. Pharmacol. - 1998. - V. 347. - P. 189–195
455. Muallem S., Pandol S.J., Beeker T.G. Hormone-evoked calcium release from intracellular stores is quantal process. //J. Boil. Chem. - 1989. - V. 264. - P. 205-212.
456. Munck A., Guyre P.M., Holbrook N.J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions // Endocrine Rev. – 1984. – V. 5(1). – P. 25-44.

457. Mundy WR, Freudenrich T, Shafer TJ, Nostrandt AC. In vitro aluminum inhibition of brain phosphoinositide metabolism: comparison of neonatal and adult rats // *Neurotoxicology*. - 1995. - V. 16. - P. 35-44.
458. Muneoka, K., Mikuni, M., Ogawa, T., Kitera, K., Kamei, K., Takigawa, M., Takahashi, K. Prenatal dexamethasone exposure alters brain monoamine metabolism and adrenocortical response in rat offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1997, 27:R1669-R1675.
459. Mungai PT, Waypa GB, Jairaman A, Prakriya M, Dokic D, Ball MK, Schumacker PT. Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels.// *Mol Cell Biol.* - 2011. - V. 31(17). - P. 3531-45.
460. Nagano, M., Ozawa, H., Suzuki, H. Prenatal dexamethasone exposure affects anxiety-like behaviour and neuroendocrine systems in an age-dependent manner.// *Neurosci. Res.* – 2008. - V. 60. - P. 364–371.
461. Nahorski S.R., Potter B.V. Molecular recognition of inositol polyphosphates by intracellular receptors and metabolic enzymes. // *Trends Pharmacol. Sci.*, - 1989. - V. 10(4). - P. 139 — 144.
462. Nakamura H., Matsuda M., Furuke K., Kitaoka Y., Iwata S., Toda K., Inamoto T., Yamaoka Y., Ozawa K., Yodoi J. Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide// *Immunol Lett.* - 1994. - V. 42, № 1-2. - P. 75-80
463. Nakamura T, Barbara JG, Nakamura K, Ross WN. Synergistic release of Ca^{2+} from IP_3 -sensitive stores evoked by synaptic activation of mGluRs paired with backpropagating action potentials. // *Neuron*. - 1999. - V. 24. - P. 727–737.
464. Nakamura T, Lasser-Ross N, Nakamura K, Ross WN. Spatial segregation and interaction of calcium signalling mechanisms in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons.// *J Physiol.* - 2002. - V. 543. - P. 465–480
465. Nakanishi N., Tu S., Shin Y., Kurokawa T, Zhang D, Chen HS, Tong G, Lipton SA. Neuroprotection by the NR3A subunit of the NMDA receptor// *Journal of Neuroscience*. - 2009. - V. 29(16). - P. 5260–5265.
466. Neal, C. R., Jr., Weidemann G., Kabbaj, M., Vázquez, D. M. Effect of neonatal dexamethasone exposure on growth and neurological development in the adult rat.// *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2004. - V. 287. - R375–R385.
467. Nemeroff CB. Neurobiological consequences of childhood trauma.// *J Clin Psychiatry*. - 2004. - V. 5. Suppl 1. -P. 18-28.

468. Newport DJ, Heim C, Bonsall R, Miller AH, Nemeroff CB. Pituitary-adrenal responses to standard and low-dose dexamethasone suppression tests in adult survivors of child abuse.// *Biol Psychiatry*. - 2004. - V. 55(1). - P. 10-20.
469. Nicolay N.H., Hertle D.N., Boehmerle W., Heidrich F. M., Yeckel M., and Ehrlich B. E. Inositol 1,4,5 Trisphosphate Receptor and Chromogranin B Are Concentrated in Different Regions of the Hippocampus// *J Neurosci Res*. - 2007. - V. 85(9). - P. 2026–2036.
470. Nicoletti F., Wroblewski J. T., Novelli A., Guidotti A., Costa E. Excitatory amino acid signal transduction in cerebellar cell cultures // *Funct Neurol*. - 1986. - V.1(4). - P. 345-349.
471. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. // *Science*. - 1992. – V. 258. - P. 607 - 614.
472. Nonn L., Williams R.R., Erickson R.P., Powis G. The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice// *Mol Cell Biol*. - 2003. - V. 23(3). - P. 916-922
473. Noorlander, C. W., Visser, G. H., Ramakers, G. M., Nikkels, P. G., de Graan, P. N. Prenatal corticosteroid exposure affects hippocampal plasticity and reduces lifespan.// *Dev. Neurobiol*. – 2008. - V. 68. - P. 237-246.
474. Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia//. *Ann Neurol*. - 2011. - V. 69(5). - P. 743-58.
475. Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia.// *Ann Neurol*. - 2011. - V. 69(5). - P.743-58.
476. Nyakas C., Buwalda B., Luiten PGM., Hypoxia and brain development// *Progress in neurobiol*. - 1996. - V. 49. - P. 1-51
477. Nyirenda, M. J., Carter, R., Tang, J. I., de Vries, A., Schlumbohm,C., Hillier, S. G., Streit, F., Oellerich, M., Armstrong, V. W., Fuchs, E., Seckl, J. R. Prenatal programming of metabolic syndrome in the common marmoset is associated with increased expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1.// *Diabetes*. – 2009. - V. 58. - P. 2873-2879.
478. Oberlander, T. F., Weinberg, J., Papsdorf, M., Grunau, R., Misri, S., Devlin, A. M. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses.// *Epigenetics*. – 2008. - V. 3. - P. 97–106.
479. Oberst A., Bender C., and Green D. R. Living with death: The evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals // *Cell Death Differ*. - 2008. - V.15(7). - P. 1139–1146
480. Oitzl, M. S., and de Kloet, E. R. Selective corticosteroid antagonists modify specific aspects of spatial orientation learning.// *Behav. Neurosci*. - 1992. - V. 106. - P. 62–71.

481. Oitzl, M. S., Fluttert, M., and de Kloet, E. R. The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticosteroid receptors.// *Eur. J. Neurosci.* - 1994. - V. 6. - P. 1072–1079.
482. Okamoto M., Matsumoto M., Ohtsuki T., Taguchi A., Mikoshiba K., Yanagihara T., Kamada T. Internucleosomal DNA cleavage involved in ischemia-induced neuronal death.// *Biochem Biophys Res Commun.* - 1993. - V. 196(3). - P. 1356-1362.
483. Olive, M. F. (2009). Metabotropic glutamate receptor ligands as potential therapeutics for addiction.// *Curr Drug Abuse Rev.* - 2009. - V. 2(1). - P. 83-98.
484. Oliveira TG, Chan RB, Tian H, Laredo M, Shui G, Staniszewski A, Zhang H, Wang L, Kim TW, Duff KE, Wenk MR, Arancio O, Di Paolo G. Phospholipase d2 ablation ameliorates Alzheimer's disease-linked synaptic dysfunction and cognitive deficits. // *J Neurosci.* - 2010. - V. 30(49). - P. 16419-28.
485. O'Neill C. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling in mammalian preimplantation embryo development // *Reproduction.* - 2008. - V. 136. - P. 147-156.
486. O'Neill C. The potential roles for embryotrophic ligands in preimplantation embryo development // *Hum Reprod Update.* - 2008. - V. 14. - P. 275-288.
487. Opitz T, Reymann KG. Blockade of metabotropic glutamate receptors protects rat CA1 neurons from hypoxic injury.// *Neuroreport.* - 1991. - V. 2(8). - P. 455-7.
488. Orchinik M., Murray T.F., Moore F.L. A corticosteroid receptor in neuronal membranes // *Science.* – 1991. – V.252. – P.1848-1850.
489. Ordyan, N. E., Pivina, S. G. Characteristics of the behavior and stress-reactivity of the hypophyseal-adrenal system in prenatally stressed rats. // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2004. - V. 34. - P. 569-574.
490. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer.// *Apoptosis* - 2004. - V. 9. - P. 667–676.
491. Ota K, Yakovlev AG, Itaya A, Kameoka M, Tanaka Y, Yoshihara K. Alteration of apoptotic protease-activating factor-1 (APAF-1)-dependent apoptotic pathway during development of rat brain and liver.// *J Biochem.* - 2002. - V. 131(1). - P. 131-135.
492. Owens M., Nemeroff C.B. Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor // *Pharmacology Rev.* – 1991. – V. 43(4). – P. 425-473.
493. Ozyürek H, Bayrak S, Pehlivanoglu B, Atilla P, Balkancı ZD, Cakar N, Anlar B. Effect of transient maternal hypotension on apoptotic cell death in foetal rat brain// *Balkan Med J.* - 2014. - V. 31(1). - P. 88-94.
494. Pacák K., Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders // *Endocrine Reviews.* – 2001. – V.22 (4). – P.502-548.

495. Panahian N., Yoshida T., Huang P.L., Hedley-Whyte E.T., Dalkara T., Fishman M.C., Moskowitz M.A. Attenuated hippocampal damage after global cerebral ischemia in mice mutant in neuronal nitric oxide synthase.// *Neuroscience*. - 1996. - V. 72 (2). - P. 343-354.
496. Papas S, Crépel V, Ben-Ari Y. The NMDA receptor contributes to anoxic aglycemic induced irreversible inhibition of synaptic transmission.//*Brain Res*. - 1993. - V. 607(1-2). - P.54-60.
497. Patenaude A., Murthy M.R., Mirault M.E. Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the central nervous system// *Cell Mol Life Sci*. - 2005. - V. 62 (10). - P. 1063-1080.
498. Patterson R.L., Boehning D., Snyder S.H. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators.// *Annu. Rev. Biochem*. - 2004. - V. 73. - P. 437-465.
499. Pellegrini-Giampietro D. E., Gorter J. A., Bennett M. V. L., and Zukin R. S. U. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca²⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders// *Trends in Neurosciences*. - 1997. - V. 20 (10). - P. 464–470.
500. Pellegrini-Giampietro D. E., The distinct role of mGlu1 receptors in postischemic neuronal death // *Trends in Pharmacological Sciences*. - 2003. - V. 24 (9). - P. 461–470.
501. Pellow S., Chopin P., File S., Briley M. Validation of open:closed arm entries in the elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat // *J. Neurosci. Methods*. – 1985. – V.14. – P.149-167.
502. Perez A, Ritter S, Brotschi B, Werner H, Caflisch J, Martin E, Latal B. Long-term neurodevelopmental outcome with hypoxic-ischemic encephalopathy. //*J Pediatr*. - 2013. - V. 163(2). - P. 454-459.
503. Perlman WR, Webster MJ, Kleinman JE, Weickert CS. Reduced glucocorticoid and estrogen receptor alpha messenger ribonucleic acid levels in the amygdala of patients with major mental illness.//*Biol Psychiatry*. – 2004. - V. 56(11). - P. 844-52.
504. Perrin D., Mamet J., Scarna H., Roux J. C., Berod A., Dalmaz Y. Long-term prenatal hypoxia alters maturation of brain catecholaminergic systems and motor behavior in rats // *Synapse*. - 2004. - V. 54. - P. 92-101.
505. Peters T. Calcium in physiological and pathological cell function // *Eur. Neurol*.- 1986. - V.25, N4. - P.747-760.
506. Petersen O.H. New aspects of cytosolic calcium signalling. // *News Physiol. Sci.*, - 1996. - V. 11. - P. 13 — 17.
507. Petry C. J., Hales C. N. Long-term effects on offspring of intrauterine exposure to deficits in nutrition. //*Hum. Reprod. Update*. - 2000. - V. 6. - P. 578-586.
508. Pfahl M. Nuclear receptor/AP-1 interaction // *Endocr. Rev*. – 1993. – V.14. – P.651-658.

509. Pietraszek M, Nagel J, Gravius A, Schäfer D, Danysz W. The role of group I metabotropic glutamate receptors in schizophrenia.// *Amino Acids*. - 2007. - V. 32(2). - P. 173-8.
510. Pirruccello M, De Camilli P. Inositol 5-phosphatases: insights from the Lowe syndrome protein OCRL.// *Trends Biochem Sci*. - 2012.- V. 37(4). - P. 134-43
511. Pisani A., Gubellini P., Bonsi P., Conquet F., Picconi B., Centonze D., Bernardi G., Calabresi P. Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of N-methyl-D-aspartate responses in medium spiny striatal neurons.// *Neuroscience* - 2001. - V. 106. - P. 579-587.
512. Poltyrev, T., Keshet, G.I., Kay, G., Weinstock, M. Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. // *Dev. Psychobiol.* – 1996. - V. 29. - P. 453–462.
513. Ponnusamy R, Nissim HA, Barad M. Systemic blockade of D2-like dopamine receptors facilitates extinction of conditioned fear in mice.// *Learn Mem.* - 2005. - V. 12(4). - P. 399-406.
514. Powis G., Montfort W.R. Properties and biological activities of thioredoxins.// *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. - 2001. - V. 41. - P. 261-295.
515. Raley-Susman,; Carter, Muller, K.M., Lipton P. In vitro ischemia and protein synthesis in the rat hippocampal slice: the role of calcium and NMDA receptor activation. // *Brain Res.* - 1990. - V. 515 (1-2). - P. 27-38.
516. Rauca C, Zerbe R, Jantze H, Krug M The importance of free hydroxyl radicals to hypoxia preconditioning.// *Brain Res.* - 2000. - V. 868. - P. 147-149.
517. Ravati A, Ahlemeyer B, Becker A, Klumpp S, Krieglstein J. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor- κ B.// *J Neurochem.* - 2001. - V. 78. - P. 909-919.
518. Ravati A, Ahlemeyer B, Becker A, Krieglstein J. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species. // *Brain Res.* - 2000. - V. 866. - P. 23-32.
519. Rayburn, W. F., Christensen, H.D., Gonzalez, C.L. A placebo-controlled comparison between betamethasone and dexamethasone for fetal maturation: Differences in neurobehavioral development of mice offspring. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1997. - V. 176. - P. 842–850.
520. Regard M., Oelz O., Brugger P., Landis T. Persistent cognitive impairment in climbers after repeated exposure to extreme altitude.// *Neurology*. - 1989. - V.39. - P. 210-213.
521. Reichlin S. Neuroendocrine-immune interactions // *N. Engl. J. Med.* – 1993. – V. 329. – P.1246-1253.
522. Reul J.M., De Kloet E.R. Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in the rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis // *J. Steroid Biochem.* – 1986. – V.24. – P.269-272.

523. Reul J.M., de Kloet E.R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation // *Endocrinology*.- 1985. – V.117. – P.2505-2511.
524. Reul J.M., De Kloet E.R., Van Sluijs F.J., Rijnberk A., Rothuizen J. Binding characteristics of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in dog brain and pituitary // *Endocrinology*. – 1990. – V.127(2). – P.907-915.
525. Rhee S.-G. Inositol phospholipid-specific phospholipase C: interaction of the isoform with tyrosine kinase. // *Trends Biol. Sci.*, 1991. Vol. 16. p. 297 — 301.
526. Rhee S.-G., Bae Y.S., Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. // *J. Biol. Chem.*, - 1997. - V. 272. - P. 15232 — 15246.
527. Rhee S.-G., Suh S., Ryu H., Lee S.L. Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. // *Science*., - 1989. - V. 244. - P. 546 — 550.
528. Rhee S.G. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. // *Science*. - 2006. - V.312. - P.1882-1883.
529. Rhodes PG, Cai Z. Intrauterine hypoxia-ischemia reduces phosphoinositide hydrolysis stimulated by metabotropic glutamate receptor agonists in cultured rat cerebellar granule cells // *Brain Res Dev Brain Res*. - 1996. - V. 93. - P. 129-135.
530. Rice D., Barone S. Critical periods of Vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models // *Environmental Health Perspectives*. - 2000. - V. 108. - P. 511-533.
531. Robinson FL, Dixon JE. The phosphoinositide-3-phosphatase MTMR2 associates with MTMR13, a membrane-associated pseudophosphatase also mutated in type 4B Charcot-Marie-Tooth disease.// *J Biol Chem* , - 2005. - V.280. - P. 31699–31707.
532. Robinson S, Petelenz K, Li Q, Cohen ML, Dechant A, Tabrizi N, Bucek M, Lust D, Miller RH. Developmental changes induced by graded prenatal systemic hypoxic-ischemic insults in rats.// *Neurobiol Dis*.- 2005. - V. 18(3). - P. 568-581.
533. Rodricks CL, Rose IA, Camm EJ, Jenkin G, Miller SL, Gibbs ME. The effect of prenatal hypoxia and malnutrition on memory consolidation in the chick.// *Brain Res Dev Brain Res*. - 2004. - V. 148(1). - P. 113-119.
534. Rogalska J. Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptors in Hippocampus: Their Impact on Neurons Survival and Behavioral Impairment After Neonatal Brain Injury// *Vitamins and Hormones*. - 2010. - V. 82. - P. 392-419.
535. Rogalska, J., Caputa, M., Piałkowska, K., and Nowakowska, A. Neonatal asphyxia and hyperthermia and cognitive deficits in adult rats: Role of iron. // *J. Therm. Biol*. 2009b. - V. 34. - P. 391–400.

536. Rogalska, J., Caputa, M., Wentowska, K., and Nowakowska, A. Stress-induced behaviour in juvenile rats: Effects of neonatal asphyxia, body temperature and chelation of iron// *Behav. Brain Res.* - 2004. - V. 154. - P. 321–329.
537. Rogalska, J., Caputa, M., Wentowska, K., and Nowakowska, A. Stress-induced behaviour in adult and old rats: Effects of neonatal asphyxia, body temperature and chelation of iron// *J. Physiol. Pharm.* - 2006. - V. 57. - P. 17–34.
538. Rogalska, J., Kang, P., Wotherspoon, W., Macleod, M. R., and Lai, M. Effect of hyperthermia and anoxia on glucocorticoid and mineralocorticoid receptor expression in neonatal rat hippocampus// *Neurosci. Lett.* - 2009a. - V. 450. - P. 196–200.
539. Roland, E.H., Poskitt, K., Rodriguez, E., Lupton, B.A., Hill, A. Perinatal hypoxic-ischemic thalamic injury: clinical features and neuroimaging// *Annals of Neurology*, - 1998. - V. 44. - P. 161–166
540. Romero, R. D., Chen, W. J. Gender-related response in open-field activity following developmental nicotine exposure in rats// *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 2204. – V. 78. - P. 675-681.
541. Rose HG, Frenster JH. Composition and metabolism of lipids within repressed and active chromatin of interphase lymphocytes// *Biochim Biophys Acta.* – 1965. - V. 106. - P. 577–591.
542. Roseboom P.H., Kalin N.H., Steckler T., Dautzenberg F.M. Molecular regulation of the CRF system / In: *Handbook of Stress and the Brain: Part 1. The neurobiology of stress. Vol.15*// Eds: T. Steckler, N.H. Kalin, J.M.H.M. Reul Amsterdam etc.: Elsevier. – 2005. – P. 133-154.
543. Rosenmund C., Feltz A., Westbrook G.L. Synaptic NMDA receptor channels have a low open probability// *J. Neurosci.* - 1995. - V. 15. - P. 2788-2795.
544. Ross CA, Meldolesi J, Milner TA, Satoh T, Supattapone S, Snyder SH. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons// *Nature.* - 1989. - V. 339. - P. 468–470.
545. Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake// *Nature.* - 2000. - V. 403(6767). - P. 316-21.
546. Roth MG Phosphoinositides in constitutive membrane traffic // *Physiol.Rev.* - 2004. - V. 84. - P. 699-730.
547. Roth SC, Baudin J, Cady E, Johal K, Townsend JP, Wyatt JS, Reynolds EO, Stewart AL. Relation of deranged neonatal cerebral oxidative metabolism with neurodevelopmental outcome and head circumference at 4 years// *Dev Med Child Neurol.* – 1997. - V. 39(11). - P. 718-725.
548. Rothman S.M., Olney J.M. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage// *Ann. Neurol.* – 1986. – V.19, N 2. – P. 105-111.

549. Rousset CI, Baburamani AA, Thornton C, Hagberg H. Mitochondria and perinatal brain injury.//J Matern Fetal Neonatal Med. - 2012. -V. 25 (S1). - P. 35-38.
550. Ruiz A., Matute C., Alberdi E. Endoplasmic reticulum Ca(2+) release through ryanodine and IP(3) receptors contributes to neuronal excitotoxicity//Cell calcium.- 2009. - V. 46(4). - P. 273-281.
551. Runyan J.D., Moore A.N., Dash P.K. A role for prefrontal calcium-sensitive protein phosphatase and kinase activities in working memory// Learning and memory. - 2005. - V. 12. - P. 103-110.
552. Rybnikova E, Sitnik N, Glushchenko T, Tjulkova E and Samoilov M The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats. //Brain Res. - 2006. - V. 1089(1). - P.195-202.
553. Rybnikova E., Glushchenko T., Tyulkova E., Baranova K., Samoilov M.O. Mild hypobaric hypoxia preconditioning up-regulates expression of transcription factors c-Fos and NGFI-A in rat neocortex and hippocampus// Neuroscience Research. - 2009. – V. 65. - p. 360-366.
554. Rybnikova E., Glushchenko T., Churilova A., Pivina S., Samoilov M. Expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in hippocampus of rats exposed to various modes of hypobaric hypoxia: Putative role in hypoxic preconditioning.// Brain Res. - 2011. - V. 1381. - P. 66-77.
555. Rybnikova E., Mironova V., Pivina S., Tulkova E., Ordyan N., Nalivaeva N., Turner A., Samoilov M. Involvement of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the antidepressant-like effects of mild hypoxic preconditioning in rats. //Psychoneuroendocrinology. - 2007. - V. 32(7). - P. 812-823.
556. Rybnikova E., Vataeva L., Tyulkova E., Glushchenko T., Otellin V., Pelto-Huikko M., and Samoilov M. Preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and suppression of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia.// Beh. Brain. Res. - 2005. - V. 160 (1). - P. 107-14.
557. Saito A, Maier CM, Narasimhan P, Nishi T, Song YS, Yu F, Liu J, Lee YS, Nito C, Kamada H, Dodd RL, Hsieh LB, Hassid B, Kim EE, González M, Chan PH. Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia.// Mol Neurobiol. - 2005. - V. 31(1-3). - P. 105-16.
558. Samoilov M.O., Semenov D.G., Tulkova E.I., Lazarewich J.W. Early postanoxic changes of polyphosphoinositides and boun Ca²⁺ content in relation to neuronal activity in brain cortex//Resustitution. - 1992. – v. 23. - P. 33-43.

559. Sanchez-Mejia RO, Mucke L. Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease.// *Biochim Biophys Acta*. - 2010. - V.1801(8). - P. 784-90.
560. Sanders E.J., Wride M.A. Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique // *Histochem J*. —1996. —28, №4. —P. 275–281.
561. Sapolsky RM. Stress hormones: good and bad.//*Neurobiol Dis*. - 2000. - V. 7(5). - P. 540-542.
562. Sasada T., S. Iwata, N. Sato, Y. Kitaoka, K. Hirota, K. Nakamura, A. Nishiyama, Y. Taniguchi, A. Takabayashi, J. Yodoi, Redox control of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP): protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity.// *J Clin Invest*. - 1996. - V. 97. - P. 2268-2276.
563. Salminen A., Liu P.K., Hsu C.Y. Alteration of transcription factor binding activities in the ischemic rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*. - 1995. - V. 212 (3). - P. 939-944.
564. Sapolsky R.M., Romero L., Munck A. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions // *Endo rev*. – 2000. – V. 21. – P. 55-89.
565. Sato S, Sakagami H, Tonosaki A. Kondo H. Localization of mRNAs for CDF-diacylglycerol synthase and phosphatidylinositol synthase in the brain and retina of developing and adult rats // *Brain Res Dev Brain Res*. - 1998. - V. 110. - P. 21-30.
566. Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network.// *Biochim Biophys Acta*. - 2011. - V. 1813(7). - P. 1269-78.
567. Schölzke MN, Schwaninger M. Transcriptional regulation of neurogenesis: potential mechanisms in cerebral ischemia.// *J Mol Med (Berl)*. - 2007. - V. 85(6). - P. 577-88.
568. Schon EA Mitochondrial disorders in the nervous system.// *Annu Rev Neurosci*. – 2008. - V. 31. - P. 91-123.
569. Schon EA, Area-Gomez E. Is Alzheimer's disease a disorder of mitochondria-associated membranes? // *J Alzheimers Dis*. – 2010. - V. 20 (Suppl 2). - S281-92
570. Schoepp D. D., Jane D. E., Monn J. A. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. // *Neuropharmacology*. - 1999. - V. 38. - P. 1431–1476
571. Schopke R, Wolfer D. P., Lipp H. P., Leisinger-Trigona M. C. Swimming navigation and structural variations of the infrapyramidal mossy fibers in the hippocampus of the mouse // *Hippocampus*. - 1991. - V. 1 (3). - P. 315-328.
572. Seckl, J. R. Glucocorticoids, feto-placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult diseases.// *Steroids*, - 1997. - V. 62. - P. 89 –94.
573. Seckl, J. R. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. // *Eur. J. Endocrinol*. – 2004. - V. 151 - U49-62.

574. Seckl, J. R., Cleasby, M., Nyirenda, M. J. Glucocorticoids, 11 betahydroxysteroid dehydrogenase, and fetal programming. // *Kidney Int.* – 2000. - V. 57. - P. 1412–1417.
575. Selden N. R., Cole B. J., Everitt B. J., Robbins T. W. Damage to ceruleo-cortical noradrenergic projections impairs locally cued but enhances spatially cued water maze acquisition // *Behav. Brain. Res.* - 1990. - V. 39 (1). - P. 29-51.
576. Selye H. *Stress without Distress*. New York: Lippencott, - 1974.
577. Semenov D.G., Samoilov M.O., Zielonka P., Lazarewicz J.W. Calcium transients in the model of rapidly induced anoxic tolerance in rat cortical slices: Involvement of NMDA receptors // *Neurosignals*. -2002. -V.11, N.6. - P.329-335.
578. Semenov D. G., Samoilov M. O., Łazarewicz J. W. Calcium transients in the model of rapidly induced anoxic tolerance in rat cortical slices: involvement of NMDA receptors // *Neurosignals*. - 2002. - V. 11, № 6. - P. 329-35.
579. Shams, M., Kilby, M. D., Somerset, D. A., Howie, A. J., Gupta, A., Wood, P. J., Afnan, M., Stewart, P. M. 11b-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction.// *Hum. Reprod.* – 1998. - V. 13. - P. 799–804.
580. Sharp F.R., Lowenstein D., Simon R., Hisanaga K. Heat shock protein hsp72 induction in cortical and striatal astrocytes and neurons following infarction. // *J Cereb Blood Flow Metab.* - 1991. - V. 11 (4). - P. 621-627.
581. Shi S-H, Jan LY, Jan Y-N Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity.// *Cell* – 2003. - V. 112. - P. 63–75
582. Shigeno T., Mima T., Takakura K., Graham D.I., Kato G., Hashimoto Y., Furukawa S. Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor.// *J Neurosci.* - 1991. - V. 11 (9). - P. 2914-2919.
583. Shigeno T., Yamasaki Y., Kato G., Kusaka K., Mima T., Takakura K., Graham D.I., Furukawa S. Reduction of delayed neuronal death by inhibition of protein synthesis.// *Neurosci Lett.* - 1990. - V. 120 (1). - P. 117-119.
584. Shuaib A, Mazagri R, Ijaz S. GABA agonist "muscimol" is neuroprotective in repetitive transient forebrain ischemia in gerbils.// *Exp Neurol.* - 1993. - V. 123(2). - P. 284-288.
585. Shukitt-Hale B., Kadar T., Marlowe B.E., Stillman M.J., Galli R.L., Devine J.A., Lieberman H.R. Morphological alterations in the hippocampus following hypobaric hypoxia. // *Hum. Exp. Toxicol.* - 1996. - V. 15 (4). - P. 312-31
586. Shukitt-Hale B., Stillman M.J., Welch D.I., Levy A., Devine J.A., Lieberman H.R. Hypobaric hypoxia impairs spatial memory in an elevation-dependent fashion. // *Behav. Neural Biol.* - 1994. - V.62 - P.244-252.
587. Siesjö B.K. *Brain energy metabolism*. Chichester ets., - 1978. - 607 p.

588. Siesjö B.K., Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis.// *J Cereb Blood Flow Metab.* - 1989. - V. 9 (2). - P. 127-140.
589. Sladeczek F. Putative role of inositol phospholipid metabolism in neurons//*Biochimie.* - 1987. - V. 69(4). - P. 287-296.
590. Sladeczek F., Pin J. P., Récasens M., Bockaert J., Weiss S. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones // *Nature.* - 1985. - V. 317 (6039). - P. 717-9.
591. Slot J.W., Geuze H.J., Freeman B.A., Crapo J.D. Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells// *Lab Invest.* - 1986. - V. 55 (3). - P. 363–371.
592. Smith, D. J., Joffe, J. M., Heseltine, G. F. Modification of prenatal stress effects in rats by adrenalectomy, dexamethasone and chlorpromazine.// *Physiol. Behav.* - 1975. - V. 15. - P. 461-469
593. Soriano M.A., Ferrer I., Rodriguez-Farre E., Planas A.M. Apoptosis and c-Jun in the thalamus of the rat following cortical infarction. //*Neuroreport.* - 1996. - V. 7 (2). - P. 425-428.
594. Speirs, H. J. L., Seckl, J. R., Brown, R. W. Ontogeny of glucocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-1 gene expression identifies potential critical periods of glucocorticoid susceptibility during development. //*J. Endocrinol.* – 2004. - V. 181. - P. 105–116.
595. Spyrou G., Enmark E., Miranda-Vizuete A., Gustafsson J. Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin// *J Biol Chem.* - 1997. - V. 272 (5). - P. 2936-2941.
596. Squire L.R., Zola S.M. Ischemic brain damage and memory impairment: a commentary //*Hippocampus.* - 1996. - V.6 - P.546-52.
597. Stopkova P, Saito T, Papolos DF, Vevera J, Paclt I, Zukov I, Bersson YB, Margolis BA, Strous RD, Lachman HM. Identification of PIK3C3 promoter variant associated with bipolar disorder and schizophrenia.// *Biol Psychiatry* - 2004. - V.55. - P. 981–988
598. Strasser U., Lobner D., Behrens M. M., Canzoniero L. M., Choi, D. W. Antagonists for group I mGluRs attenuate excitotoxic neuronal death in cortical cultures // *Eur. J. Neurosci.* - 1998. - V. 10. - P. 2848-2855.
599. Strek K.F Manipulation of serotonin protects against an hypoxia-induced deficit of a passive avoidance response in rats// *Pharm Biochem Behav* – 1989. - V. 33 (1). - P. 241—244.
600. Strekalova T, Spanagel R, Dolgov O, Bartsch D Stress-induced hyperlocomotion as a confounding factor in anxiety and depression models in mice.// *Behav Pharmacol.* - 2005. - V. 16(3). - P. 171-180.

601. Stroeve S.A., E.I. Tjulkova, T.S. Gluschenko, E.A. Rybnikova, M.O. Samoilov, M. Peltto-Huikko, The augmentation of brain thioredoxin-1 expression after severe hypobaric hypoxia by the preconditioning in rats.// *Neuroscience Letters*. - 2004 . - V. 370. - P. 224-229.
602. Stroeve S.A., Gluschenko T.S., Tjulkova E.I., Rybnikova E.A., Samoilov M.O., Peltto-Huikko M. The effect of preconditioning on the Cu, Zn superoxide dismutase expression and enzyme activity in rat brain at the early period after severe hypobaric hypoxia. // *Neurosci Res*. - 2005. - V. 53 (1). - P. 39-47.
603. Stroeve S.A., Gluschenko T.S., Tjulkova E.I., Spyrou G., Rybnikova E.A., Samoilov M.O., Peltto-Huikko M. Preconditioning enhances the expression of mitochondrial antioxidant thioredoxin-2 in the forebrain of rats exposed to severe hypobaric hypoxia. // *Journal of Neuroscience Research*. - 2004.- Vol. 78, № 4. - P. 563-569.
604. Stroeve SA, Tjulkova EI, Samoilov MO, Peltto-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
605. Sugawara T., Chan P.H. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia.// *Antioxid Redox Signal*. - 2003. - V. 5 (5). - P. 597-607.
606. Sugawara T., Noshita N., Lewen A., Gasche Y., Ferrand-Drake M., Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Chan P.H. Overexpression of copper/zinc-superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation// *J. of Neurosci*. - 2002. - V. 22 (1). - P. 209-217.
607. Supattapone S, Worley PF, Baraban JM, Snyder SH. Solubilization, purification, characterization of an inositol trisphosphate receptor.// *J Biol Chem*. - 1988. - V. 263. - P. 1530–1534.
608. Szabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury// *Shock*. - 1996. - V. 6 (2). - P. 79–88
609. Szatkowski M., Attwell D. Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms.// *Trends Neurosci*. - 1994. - V. 17, № 9. - P. 359-365.
610. Szulc K, Missiaen L, Parys JB, Callewaert G, De Smedt H. Uncoupled IP3 receptor can function as a Ca²⁺-leak channel: cell biological and pathological consequences.// *Biol Cell*. - 2006. - V. 98(1). - P. 1-14.
611. Takagi Y., A. Mitsui, A. Nishiyama, K. Nozaki, H. Sono, Y. Gon, N. Hashimoto, J. Yodoi, Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage.// *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1999. - V. 96. - P. 4131-4136.

612. Takagi Y., F. Horikawa, K. Nozaki, T. Sugino, N. Hashimoto, J. Yodoi, Expression and distribution of redox regulatory protein, thioredoxin during transient focal brain ischemia in the rat.// *Neurosci Lett.* - 1998a. - V. 251. - P. 25-28.
613. Takagi Y., T. Tokime, K. Nozaki, Y. Gon, H. Kikuchi, J. Yodoi, Redox control of neuronal damage during brain ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat: immunohistochemical and hybridization studies of thioredoxin.// *J Cereb Blood Flow Metab.* - 1998b. - V. 18. - P. 206-214.
614. Tamiya-Koizumi K. Nuclear lipid metabolism and signaling//*J. Biochem.* - 2002. - V. 132. - P. 13-22.
615. Ten VS, Bradley-Moore M, Gingrich JA, Stark RI, Pinsky DJ Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy.// *Behav Brain Res.* - 2003. - V. 145(1-2). - P. 209-219.
616. Terrie, E.I., Volpe, J.J. Mechanisms of perinatal brain injury// *Seminars in Neonatology*, - 2000. - V. 5. - P. 3–16.
617. Thalhammer O. Pranatale Erkrankungen. //*Ann. paediatr.*, - 1953, - Bd. 181, No V., - P. 257—276.
618. Thompson J.A., Hess M.L. The oxygen free radical system: a fundamental mechanism in the production of myocardial necrosis// *Prog Cardiovasc Dis.* - 1986. - V. 28, № 6. - P. 449-462.
619. Thornton C., Rousset C.I., Kichev A., Miyakuni Y., Vontell R., Baburamani A.A., Fleiss B., Gressens P., Molecular H. Mechanisms of Neonatal Brain Injury// *Neurol Res Int.* – 2012 - 2012:506320.
620. Thrower E.C., Hagar R.E., Ehrlich B.E., Regulation of Ins(1,4,5)P3 receptor isoforms by endogenous modulators// *Trends Pharmacol. Sci.* - 2001. - V. 22. - P. 580-586.
621. Tomimoto H., I. Akiguchi, H. Wakita, J. Kimura, K. Hori, J. Yodoi, Astroglial expression of ATL-derived factor, a human thioredoxin homologue, in the gerbil brain after transient global ischemia. //*Brain Res.* - 1993. - V. 625. - P. 1-8.
622. Tsatmali M., Walcott EC., Makarenkova H., Crossin KL. Reactive oxygen species modulate the differentiation of neurons in clonal cortical cultures. // *Mol. Cell. Neurosci.* - 2006. - V. 33. - P. 345-357
623. Troy CM, Akpan N, Jean YY. Regulation of caspases in the nervous system implications for functions in health and disease. //*Prog Mol Biol Transl Sci.* - 2011. - V. 99. - P. 265-305.
624. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress.// *J Psychosom Res.* - 2002. - V. 53(4). - P. 865-871.

625. Tsubokawa H, Oguro K, Masuzawa T, Kawai N. Spontaneous excitatory postsynaptic currents in hippocampal CA1 pyramidal neurons of the gerbil after transient ischemia. // *Neurosci Lett.* - 1995. - V. 191(1-2). - P. 95-8.
626. Tuor, U.I., Del Bigio, M.R., & Chumas, P.D. Brain damage due to cerebral hypoxia/ischemia in the neonate: pathology and pharmacological modification // *Cerebrovascular & Brain Metabolism Review*, - 1996. - V. 8, - P. 159–193
627. Ueda S., Masutani H., Nakamura H., Tanaka T., Ueno M., Yodoi J. Redox control of cell death // *Antioxid Redox Signal.* - 2002. - V. 4, № 3. - P. 405-414.
628. Uht R.M., McKelvy J.F., Harrison R.W., Bohn M.C. Demonstration of glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in glucocorticoid-sensitive vasopressin and corticotropin-releasing factor neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus // *J. Neurosci. Res.* – 1988. – V.19(4). – P.405-411.
629. Vale W., Speiss J., Rivier C., Rivier J. Characterization of 41-amino acid residue ovine hypothalamic peptide that stimulates the secretion of corticotropin and β -endorphin // *Science.* – 1981. – V.213. – P.1394-1397.
630. Valenti O., Conn P., Marino M. Distinct physiological roles of the Gq-coupled metabotropic glutamate receptors coexpression in the same neuronal populations // *J Cell Physiol.* - 2002. - V. 191. - P. 125-137.
631. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT . Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. // *J Biol Chem.* - 1998. - V. 273. - P. 18092-18098.
632. Valko M., Leibfritz D., Moncol J. Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. // *Int. J. Biochem. And Cell Biol.* - 2007. - V. 39. - P. 44-84
633. Valle'e, M., Mayo, W., Dellu, F., Le Moal, M., Simon, H., Maccari, S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. // *J. Neurosci.* – 1997. V. - 17. P. 2626–2636.
634. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT () Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. // *J Biol Chem.* 1998. - V. 273. - P. 18092-18098.
635. Van den Buuse, M., van Acker, S. A., Fluttert, M. F., and de Kloet, E. R. Involvement of corticosterone in cardiovascular responses to an open field novelty stressor in freely moving rats. // *Physiol. Behav.* - 2002. - V. 75, - P. 207–215.

636. Van Eekelen, J.A.M., Jiang, W., De Kloet, E.R., Bohn, M.C., Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus.// J Neurosci Res. - 1988. - V. 21(1). - P. 88-94
637. Vannucci C.R., Perlman J.M. Interventions for Perinatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. // Pediatrics. - 1997. - V. 100(6). - P. 1004-1013.
638. Vannucci R.C., Connor J.R., Mauger D.T. et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. // J Neuros Res. - 1999. - V. 55. - P. 158-163
639. Vannucci RC. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: legation to perinatal brain damage. // Pediatr Res. - 1990. - V. 27. - P. 317-326.
640. Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain//J Exp Biol. – 2004. - V. 207. - P. 3149-54.
641. Vataeva LA, Kudrin VS, Vershinina EA, Mosin VM, Tiul'kova EI, Otellin VA. Maternal para-chlorophenylalanine exposure modifies central monoamines and behaviors in the adult offspring.//Brain Res. - 2008. - V. 1234. - P. 1-7.
642. Vataeva, L. A., Kudrin, V. S., Vershinina, E. A., Mosin, V.M., Tiul'kova, E. I., Otellin, V. A. Behavioral alteration in the adult rats prenatally exposed to para-chlorophenylalanine.// Brain Res. - 2007. - V. 169. - P. 9-16.
643. Vekrellis K, McCarthy MJ, Watson A, Whitfield J, Rubin LL, Ham J. Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system//Development. - 1997. - V. 124(6). - P. 1239-49.
644. Vexler ZS, Ferriero DM Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury.//Semin Neonatol - 2001. - V. 6. - P. 99-108
645. Vila M, Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases.//Nat Rev Neurosci. - 2003. - V. 4(5). - P. 365-375.
646. Volpe JJ. Brain injury in the premature infant - current concepts of pathogenesis and prevention. // Biol Neonate. - 1992. - V. 62. - P. 231-242.
647. Voronov SV, Frere sg, Giovedi S, Pollina EA, Borel C, Zhang H, Schmidt C, Akeson EC, Wenk MR, Cimasoni L, Arancio O, Davisson MT, Antonarakis SE, Gardnier K, De Camilli P, Di Paolo G. Synaptojanin 1-linked phosphoinositide dyshome-ostasis and cognitive deficits in mouse model of Down's syndrome// Proc Natl Acad Sci USA. - 2008. - V. 105. - P. 9415-9420.
648. Waddell, B. J., Benediktsson, R., Seckl, J. R. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the rat corpus luteum: induction of mRNA expression and bioactivity coincident with luteal egression. //Endocrinology.- 1996. - V. 137. - P. 5386 –5391.
649. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm // Science. - 2002. – V.296, N 5573. – P. 1635–1636.

650. Wan S, Hao R, Sun K. Repeated maternal dexamethasone treatments in late gestation increases 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in the hippocampus of the newborn rat.// *Neurosci Lett*. 2005. – V. 382(1-2). P. - 96-101.
651. Wang J., Ma J.H., Giffard R.G. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase decreases ischemia-like astrocyte injury// *Free Radic Biol Med*. - 2005. - V. 38, № 8. - P. 1112-1118.
652. Warner D.S., Sheng H., Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain.// *Exp. Biol*. - 2004. - V.207. - P.3221-3231.
653. Watson B. D. Usual and unusual methods for detection of lipid peroxides as indicators of tissue injury in cerebral ischemia: what is appropriate and useful? // *Cell Mol Neurobiol.*, - 1998. - V. 18 (6). - P. 581-598.
654. Webster JI, Carlstedt-Duke J. Involvement of multidrug resistance proteins (MDR) in the modulation of glucocorticoid response.// *J Steroid Biochem Mol Biol*. - 2002 - V.82(4-5). - P. 277-88
655. Webster W.S. and Abela D. The effect of hypoxia in development. // *Birth Defects Research (part C)*. - 2007. - V. 81. - P 215-228/
656. Wei, Q., Lu, X.-Y., Liu, L., Schafer, G., Shieh, K.-R., Burke, S., Robinson, T. E., Watson, S. J., Seasholtz, A. F., and Akil, H. Glucocorticoid receptor overexpression in forebrain: A mouse model of increased emotional lability.// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 2004.- V. 101,- P.11851–11856.
657. Weinstock, M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring.// *Prog. Neurobiol*. - 2001, - V. 65. P.27–451.
658. Weisiger R.A., Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization// *J Biol Chem*. - 1973. - V. 248, № 13. - P. 4793-4796.
659. Welberg, L. A., Seckl, J. R., Holmes, M.C. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour.// *Neuroscience*. - 2001, - V. 104. - P. 71-79.
660. West A.E., Chen W.G., Dalva M.B., Dolmetsch R.E., Kornhauser J.M., Shaywitz A.J., Takasu M.A., Tao X., Greenberg M.E. Calcium regulation of neuronal gene expression // *PNAS*.- 2001.- V.98. – P.11024-11031.
661. Wimer C. C., Wimer R. E., Roderick T. H. Some behavioral differences associated with relative size of hippocampus in the mouse // *J. Comp. Physiol. Psychol*. - 1971. - V.76. - P. 57-65.
662. Winick M .Cellular growth during early malnutrition// *Pediatrics*. - 1971, V. 47. - P. 969-78.

663. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade.// *Curr Biol.* - 2003. - V. 13(22). - P. 2004-8.
664. Woolley C.S., Gould E., Sakai R.R., Spencer R.L., McEwen B.S. Effects of aldosterone or RU28362 treatment on adrenalectomy-induced cell death in the dentate gyrus of the adult rat // *Brain Res.* - 1991. - V. 554. № 1-2. - P. 312-315.
665. Wyatt JS, Edwards AD, Azzopardi D, Reynolds EO. Magnetic resonance and near infrared spectroscopy for investigation of perinatal hypoxic-ischaemic brain injury.// *Arch Dis Child.* - 1989. - V. 64. - P.953-63.
666. Yassin M, Scholfield CN. NMDA antagonists increase recovery of evoked potentials from slices of rat olfactory cortex after anoxia. // *Br J Pharmacol.* - 1994. - V. 111(4). - P.1221-7.
667. Ye K, Ahn JY. Nuclear phosphoinositide signaling.// *Front Biosci* - 2008. - V. 13. - P. 540–548.
668. York JD. Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. // *Biochim Biophys Acta* - 2006. - V. 1761. - P. 552–559.
669. Yoshinaga S, Ohkubo T, Sasaki S, Nuriya M, Ogawa Y, Yasui M, Tabata H, Nakajima K. A phosphatidylinositol lipids system, lamellipodin, and Ena/VASP regulate dynamic morphology of multipolar migrating cells in the developing cerebral cortex.// *J Neurosci.* - 2012. - V. 32(34). - P. 11643-11656.
670. Yoshioka H., Sugita M., and Kinouchi H. Neuroprotective effects of group II metabotropic glutamate receptor agonist DCG-IV on hippocampal neurons in transient forebrain ischemia// *Neuroscience Letters.*- 2009. - V. 461(3), - P. 266–270.
671. Yu B.P. Cellular defences against damage from reactive oxygen species// *Physiol Rev.* - 1994. - V. 74, № 1.- P. 139-162.
672. Zhang R., Al-Lamki R., Bai L., Streb J.W., Miano J.M., Bradley J., Min W. Thioredoxin-2 inhibits mitochondria-located ASK1-mediated apoptosis in a JNK-independent manner// *Circ Res.* - 2004. - V. 94, № 11. - P. 1483-1491.
673. Zhang X, Zhang Q, Tu J, Zhu Y, Yang F, Liu B, Brann D, Wang R. Prosurvival NMDA 2A Receptor Signaling Mediates Postconditioning Neuroprotection in the Hippocampus. // *Hippocampus.* – 2015. - V. 25(3). - P.286-296.
674. Zhao T, Zhang CP, Liu ZH, Wu LY, Huang X, Wu HT, Xiong L, Wang X, Wang XM, Zhu LL, Fan M. Hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells – role of hypoxia-inducible transcription factor-1a// *FEBS Journal.* - 2008. - Vol.275. - P. 1824–1834
675. Zilliacus J., Wright A.P., Carlstedt-Duke J., Gustafsson J.A. Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors // *Mol. Endocrinol.* – 1995. – V.9(4). – P.389-400.

676. Zipfel G. J., Lee J.-M, and Choi D. W., Reducing calcium overload in the ischemic brain// New England Journal of Medicine. - 1999. - V. 341 (20), - P. 1543–1544.
677. Zornberg, G.L., Buka, S.L., & Tsuang, M.T. Hypoxicischemia-related fetal/neonatal complications and risk of schizophrenia and other nonaffective psychoses: a 19-year longitudinal study.// American Journal of Psychiatry, - 2000. - V. 157, - P. 196–202.
678. Zubrow AB, Numagami Y, Fritz KI, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Spermine dependent activation of the N-methyl-D-aspartate receptor and the effect of nitric oxide synthase inhibition during hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets.// Brain Res. - 2000. - V. 854(1-2). - P. 11-18.