

# АНТИГИПОКСИЧЕСКИЕ И НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ BDNF И GDNF ПРИ ГИПОКСИИ *IN VITRO* И *IN VIVO*

УДК 576.3/.4:616.83/.001.6

Поступила 16.09.2014 г.



**М.В. Ведунова**, к.б.н., руководитель лаборатории по разработке методов нейропротекции Нижегородского нейронаучного центра НИИ «Институт живых систем»<sup>1</sup>;  
старший научный сотрудник отдела биохимии ЦНИЛ<sup>2</sup>;

**Т.А. Сахарнова**, младший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ<sup>2</sup>;  
младший научный сотрудник лаборатории по изучению фармакологических свойств нейротропных лекарственных средств Нижегородского нейронаучного центра НИИ «Институт живых систем»<sup>1</sup>;

**Е.В. Митрошина**, научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ<sup>2</sup>;  
научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Нижегородского нейронаучного центра НИИ «Институт живых систем»<sup>1</sup>;

**Т.В. Шишкина**, лаборант лаборатории по разработке методов нейропротекции Нижегородского нейронаучного центра НИИ «Институт живых систем»<sup>1</sup>;

**Т.А. Астраханова**, инженер кафедры нейродинамики и нейробиологии биологического факультета<sup>1</sup>;

**И.В. Мухина**, д.б.н., профессор, зав. ЦНИЛ<sup>2</sup>; зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова<sup>2</sup>;  
профессор кафедры нейродинамики и нейробиологии биологического факультета<sup>1</sup>;  
руководитель лаборатории по изучению фармакологических свойств нейротропных лекарственных средств Нижегородского нейронаучного центра НИИ «Институт живых систем»<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

<sup>2</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1

**Цель исследования** — оценить антигипоксические и нейропротективные свойства нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) и глиального нейротрофического фактора (GDNF) при моделировании гипоксии *in vitro* и *in vivo*.

**Материалы и методы.** Исследования *in vitro* проводили на диссоциированных культурах гиппокампа, полученных от 18-дневных эмбрионов мышей линии CBA и культивируемых на мультиэлектродных матрицах MEA60. Моделирование гипоксии осуществляли на 14-й день развития культуры *in vitro* путем замены нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода в течение 10 мин. Эксперименты *in vivo* выполнены на самцах мышей линии C57BL/6j массой 18–20 г. Для моделирования острой гипобарической гипоксии использовали вакуумную проточную барокамеру при внешней температуре 20–22°C. Исследовали устойчивость животных к условиям гипоксии и сохранение пространственной памяти в водном лабиринте Морриса через сутки после моделирования гипоксии.

**Результаты.** Эксперименты *in vitro* и *in vivo* показали, что нейротрофические факторы GDNF и BDNF обладают выраженными антигипоксическими и нейропротективными свойствами. При превентивной аппликации смеси GDNF и BDNF устойчивость животных и сохранение пространственной памяти в водном лабиринте Морриса ниже, чем при изолированном действии каждого из этих факторов. Также снижается выживаемость клеток в диссоциированной культуре гиппокампа.

**Заключение.** Совместное применение GDNF и BDNF при гипоксическом воздействии снижает положительное действие каждого из этих нейротрофических факторов.

**Ключевые слова:** нейротрофический фактор головного мозга; BDNF; глиальный нейротрофический фактор; GDNF; нейропротекция; диссоциированная культура гиппокампа; мультиэлектродная матрица; острая гипобарическая гипоксия; тест «Водный лабиринт Морриса».

## English

## Antihypoxic and Neuroprotective Properties of BDNF and GDNF *in vitro* and *in vivo* Under Hypoxic Conditions

**M.V. Vedunova**, PhD, Head of the Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Nizhny Novgorod Neuroscience Centre, Scientific Research Institute "Institute of Living Systems"<sup>1</sup>; Senior Research Worker, Biochemistry Department, Central Scientific Research Laboratory<sup>2</sup>;

Для контактов: Ведунова Мария Валерьевна, e-mail: Mvedunova@yandex.ru

**T.A. Sakharnova**, Junior Researcher, Molecular and Cell Technology Group, Central Scientific Research Laboratory<sup>2</sup>; Junior Researcher, Laboratory for Pharmacological Properties of Neurotropic Drugs Research, Nizhny Novgorod Neuroscience Centre, Scientific Research Institute "Institute of Living Systems"<sup>1</sup>;

**E.V. Mitroshina**, Research Worker, Molecular and Cell Technology Group, Central Scientific Research Laboratory<sup>2</sup>; Research Worker, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Nizhny Novgorod Neuroscience Centre, Scientific Research Institute "Institute of Living Systems"<sup>1</sup>;

**T.V. Shishkina**, Laboratory Technician, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Nizhny Novgorod Neuroscience Centre, Scientific Research Institute "Institute of Living Systems"<sup>1</sup>;

**T.A. Astrakhanova**, Engineer, the Department of Neurodynamics and Neurobiology; the Faculty of Biology<sup>1</sup>;

**I.V. Mukhina**, D.Bio.Sc., Professor, Head of Central Scientific Research Laboratory<sup>2</sup>; Head of the Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov<sup>2</sup>; Professor, the Department of Neurodynamics and Neurobiology, the Faculty of Biology<sup>1</sup>; Head of the Laboratory for Pharmacological Properties of Neurotropic Drugs Research, Nizhny Novgorod Neuroscience Centre, Scientific Research Institute "Institute of Living Systems"<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod — National Research University, Prospekt Gagarina, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950;

<sup>2</sup>Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005

**The aim of the investigation** was to assess antihypoxic and neuroprotective properties of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) during *in vitro* and *in vivo* hypoxia models.

**Materials and Methods.** *In vitro* studies were performed using hippocampal cells dissociated from 18-days embryonic CBA mice and cultured on multielectrode arrays (MEA60). Hypoxia modeling was performed on day 14 of culture development *in vitro* by replacing the normoxic culture medium with a medium containing low oxygen for 10 min. *In vivo* experiments were carried out on C57BL/6j male mice weighing 18–20 g. For acute hypobaric hypoxia a vacuum flow-through chamber was used at the ambient temperature of 20–22°C. We studied the resistance of animals to hypoxia, as well as their spatial memory retention in the Morris water maze upon expiration of 24 h following hypoxia model.

**Results.** The carried out *in vitro* and *in vivo* experiments revealed that BDNF and GDNF have strong antihypoxic and neuroprotective effects. Preventive application of BDNF plus GDNF before testing in the Morris water maze, contributed less animal resistance and retention of spatial memory as well as the viability of cells in dissociated hippocampal cultures was decreased in comparison with the isolated effect each of these factors.

**Conclusion.** Application of BDNF in combination with GDNF under hypoxic conditions reduces the positive individual effect these neurotrophic factors.

**Key words:** the brain-derived neurotrophic factor; BDNF; the glial-derived neurotrophic factor; GDNF; neuroprotection; dissociated hippocampal culture; multielectrode arrays; acute hypobaric hypoxia; the Morris water maze.

Для защиты клеток головного мозга от губительного действия гипоксии в настоящее время активно разрабатываются различные терапевтические подходы, связанные с использованием эндогенных соединений или их производных для коррекции неврологического статуса. Согласно современным представлениям, нейротрофические факторы играют ключевую роль в функционировании нейронных сетей головного мозга в процессе развития и в постнатальный период [1, 2]. Нейротрофины способствуют сохранению жизнеспособности клеток головного мозга на высоком метаболическом уровне при воздействии стресс-факторов. Механизмы защитного действия глиального нейротрофического фактора (GDNF) и нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) взаимосвязаны и реализуются через однонаправленные реакции поддержания гомеостаза нейронных сетей. Взаимодействие этих нейротрофических факторов с высокоселективными рецепторами на поверхности клетки приводит к активации защитных MAP-киназных (MAPK) сигнальных путей [3–7]. Однако вопрос о предполагаемом синергизме данных нейротрофинов остается открытым. Ранее, в экспериментах *in vivo* и *in vitro* [8, 9], нами было показано, что превентивное введение нейротрофического фактора головного мозга нивелирует отрицательные последствия гипоксии. Совместное применение ней-

ротрофических факторов может усилить активационные внутриклеточные каскады и увеличить защитное действие каждого из факторов.

**Цель исследования** — оценить антигипоксические и нейропротективные свойства BDNF и GDNF при моделировании гипоксии *in vitro* и *in vivo*.

**Материалы и методы**

**Эксперименты *in vitro*.** В исследовании использованы первичные диссоциированные культуры клеток гиппокампа, полученные от 18-дневных эмбрионов мышей линии CBA. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в Приказе Минздрава России №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации» и были согласованы с Этическим комитетом НижГМА. Диссоциирование клеток достигалось путем обработки ткани гиппокампа 0,25% трипсином (Gipco, США). Клетки ресуспендировали в нейробазальной среде Neurobasal™ (Invitrogen, США) в комплексе с биоактивной добавкой B27 (Invitrogen), глутамином (Invitrogen), эмбриональной телячьей сывороткой («ПанЭко», Россия) и культивировали, согласно ранее разработанному протоколу [10], в течение 30 дней *in vitro* (DIV) на мультиэлектродной матрице системы MEA60 (Multichannel Systems, Германия), содержащей 60 микроэлектродов. Предварительно мат-

рицу стерилизовали УФ-облучением и обрабатывали полиэтиленгликолем (Sigma, США), служившим опорным субстратом для культивируемых клеток. Исходная плотность культуры на матрице составляла 9000 кл./мм<sup>2</sup>. Жизнеспособность культур поддерживалась в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 35,5°C, в газовой смеси, содержащей и 5% CO<sub>2</sub> [10]. Для количественной обработки и анализа полученных данных использовали набор программного обеспечения MC Rack™ (Multichannel Systems, Германия), а также пакет прикладных программ Matlab.

*Моделирование гипоксии* проводили на 14-й день культивирования путем замены культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода на 10 мин. Вытеснение кислорода осуществлялось за счет насыщения культуральной среды инертным газом. Эксперимент проводили в герметичной камере, в которой воздух также был замещен на инертный газ. Исследуемые вещества добавляли в культуральную среду за 20 мин до моделирования гипоксии. Параметры, характеризующие ответную реакцию первичной культуры гиппокампа на гипоксию, регистрировали через 2 ч и каждые 24 ч в течение 7 дней после гипоксии.

*Оценку жизнеспособности клеток в диссоциированных культурах* осуществляли подсчетом числа клеточных ядер, окрашенных пропидий иодидом (Sigma), — мертвые клетки и ядра, окрашенных бис-бензимидам (Sigma), — все клетки культуры. Количество живых клеток рассчитывали как процентное соотношение между бис-бензимидам-позитивными и пропидий-иодид-позитивными клетками.

**Эксперименты *in vivo*.** Исследования были выполнены на 86 половозрелых самцах мышей линии C57BL/6j массой 18–20 г. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в Приказе Минздрава России №708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации», этическим принципам, установленным Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.), и согласованы с Этическим комитетом НижГМА.

*Методы исследования.* Для моделирования острой гипобарической гипоксии использовали вакуумную проточную барокамеру при внешней температуре 20–22°C. Мыши помещались в условия, соответствующие подъему на критическую высоту 10 500 м со скоростью 183 м/с [11]. Степень резистентности к гипоксии оценивали по времени жизни на «высоте» (T<sub>ж</sub>, мин), которое определялось от момента подъема на высоту до наступления смерти животного или появления второго агонального вдоха, и по времени потери позы (T<sub>пп</sub>, мин) — периода от начала подъема в барокамере до момента, когда животное принимает боковое положение и утрачивает способность поддерживать позу. T<sub>ж</sub> использовали для градации животных по степени устойчивости к гипоксии, разделяя их на три группы:

низкоустойчивые к гипоксии особи (T<sub>ж</sub> — менее 3 мин), среднеустойчивые (T<sub>ж</sub> — от 3 до 9 мин) и высокоустойчивые (T<sub>ж</sub> — более 9 мин без видимых проявлений гипоксического повреждения). Для сравнительной оценки эффективности антигипоксического действия применяли коэффициент защиты (K<sub>з</sub>), рассчитываемый по выживаемости животных на «смертельной площадке» более 10 мин.

$$K_z = (a/b + 1) / (v/d + 1),$$

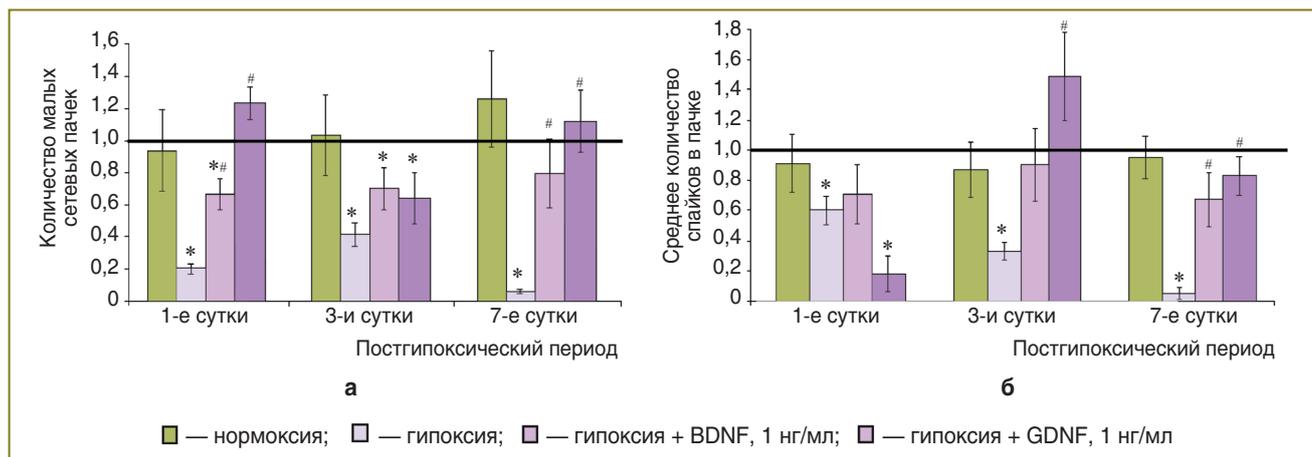
где *a* и *b* — число выживших животных в опытной и контрольной группах; *v* и *d* — общее число животных в опытной и контрольной группах [11].

Для оценки нейропротективных свойств нейротрофических факторов использовали тестирование животных в тесте «Водный лабиринт Морриса». Данный тест проводили по стандартной методике [12], модифицированной для мышей (диаметр бассейна — 90 см, диаметр скрытой в воде платформы — 10 см). Траекторию движения животного фиксировали с помощью установки для видеорегистрации объектов, анализ данных выполняли с помощью разработанного в программной среде Matlab оригинального пакета алгоритмов MouseTrack и Tracemap. Отбирались животные, способные к обучению и формированию пространственной памяти. Показателями эффективности научения служили время, затраченное на решение задачи, и форма траектории свободного плавания. Количественную оценку этого критерия выполняли с помощью коэффициента сохранения (K<sub>с</sub>), значение которого равняется отношению суммы длительностей периодов времени, затраченного на нахождение платформы (латентных периодов) в первом сеансе, к сумме латентных периодов в каком-либо из последующих сеансов (K<sub>с2</sub> — отражает выполнение задачи во втором сеансе научения по сравнению с первым; K<sub>с3</sub> — в третьем сеансе по сравнению с первым и т.д.). Соответственно, чем выше K<sub>с</sub>, тем быстрее происходит научение.

Через сутки после гипоксии проводили тестирование на сохранение долговременной памяти: тест состоял из одной пробы длительностью 60 с. При этом платформа в лабиринте отсутствовала. Определяли отсроченный коэффициент сохранения (оK<sub>с</sub>), т.е. долю времени пребывания животного в квадранте, где находилась платформа, по отношению к общему времени пребывания в водном лабиринте Морриса. При этом считалось нормой, если животное провело в квадранте, где находилась платформа, 23–27% общего времени пребывания в лабиринте [13, 14]. Также оценивали форму траектории свободного плавания при поиске платформы.

*Статистический анализ данных.* Достоверность различий между экспериментальными группами определяли с помощью пакета программ ANOVA. Различия считались статистически значимыми при *p* < 0,05.

**Результаты.** На первом этапе исследований проведена *оценка влияния нейротрофических факторов (BDNF, GDNF) на сохранение спонтанной биоэлектрической активности* первичных диссоциированных культур гиппокампа. К 14-му дню развития



**Рис. 1.** Спонтанная биоэлектрическая активность диссоциированных культур клеток гиппокампа после моделирования острой нормобарической гипоксии ( $n=36$ ). Данные нормированы относительно исходного уровня: *а* — количество малых сетевых пачек; *б* — количество спайков в пачке; \* — статистически значимые различия с исходным уровнем; # — с группой «гипоксия»; ANOVA,  $p < 0,05$

*in vitro* в первичных диссоциированных культурах гиппокампа развивается стабильная сетевая спонтанная биоэлектрическая активность [10]. Исследования морфофункциональной структуры нейронных сетей первичной диссоциированной культуры гиппокампа показали не только стабилизацию основных показателей биоэлектрической активности (числа малых сетевых пачек, количества спайков в пачке) к 14-му дню развития *in vitro*, но и появление сложных аксонодендрических и аксоно-сомических синапсов [15, 16]. Гипоксия приводит к необратимым деструктивным изменениям в функциональной сетевой активности первичных диссоциированных культур [8, 17]. Через 7 сут после воздействия гипоксии наблюдается полное разрушение спонтанной биоэлектрической сетевой активности. Только в 32,4% культур, подвергшихся действию гипоксии, сохраняется сетевая пачечная активность с измененным паттерном малых сетевых пачек (рис. 1).

Превентивное введение нейротрофических факторов BDNF (1 нг/мл) и GDNF (1 нг/мл) частично нивелирует отрицательное действие гипоксии на спонтанную биоэлектрическую активность диссоциированных культур. Установлено, что применение нейротрофических факторов статистически значимо ( $p < 0,05$ ) увеличивает количество малых сетевых пачек через сутки после воздействия. Изучение паттернов активности через сутки после моделирования нормобарической гипоксии показало, что превентивное введение нейротрофических факторов (BDNF, 1 нг/мл и GDNF, 1 нг/мл) способствует и сохранению структуры сетевой пачки, а следовательно, морфофункциональной структуры нейронных сетей первичной диссоциированной культуры гиппокампа (рис. 2).

Исследования, проведенные в более отдаленный период, показали, что в случае применения GDNF (1 нг/мл) среднее количество спайков в пачке через 3 сут после воздействия статистически значимо ( $p < 0,05$ ) выше, чем в группе «гипоксия» —

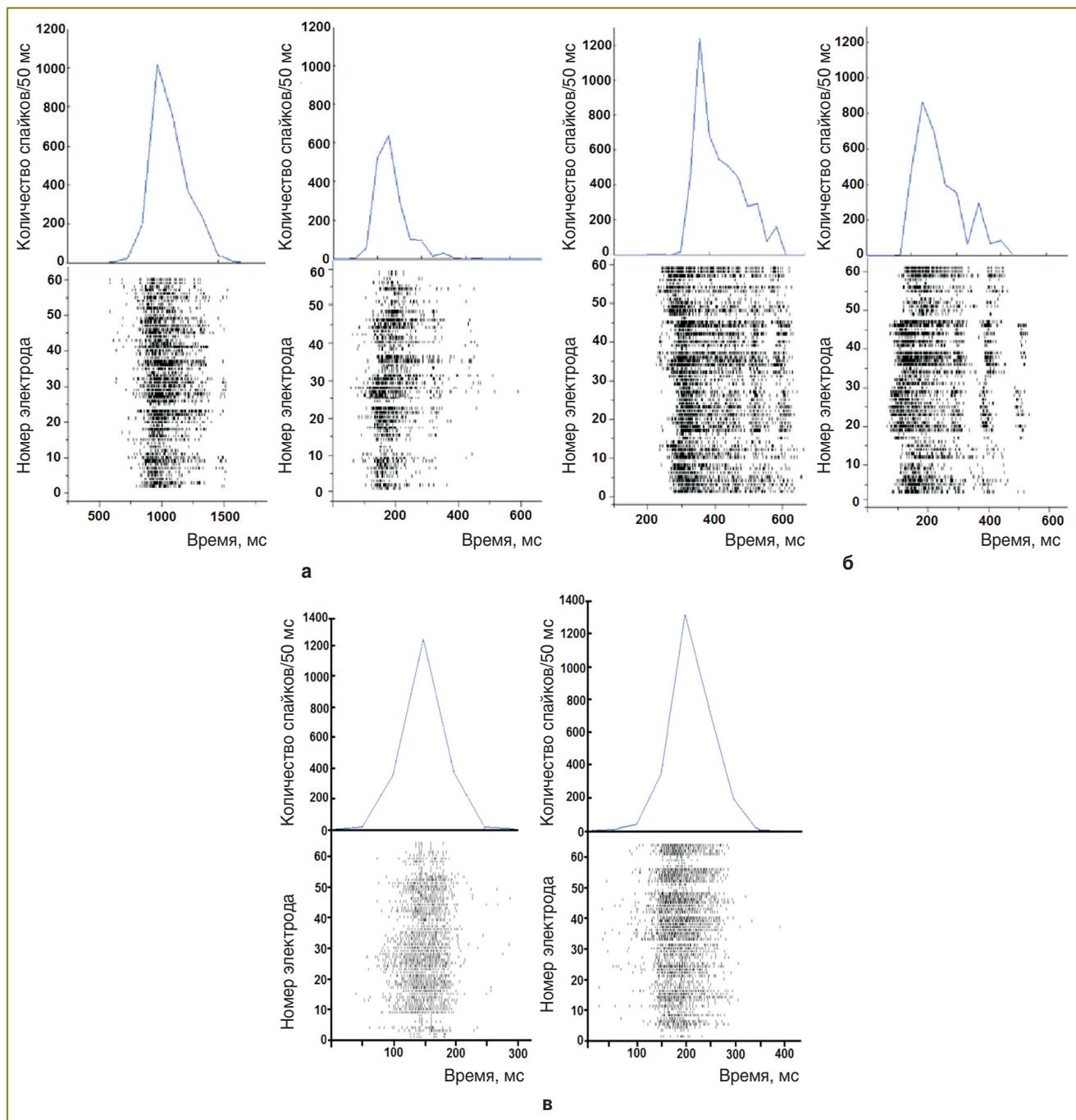
2213,54±256,43 и 465,67±97,21 соответственно. Количество малых сетевых пачек во всех опытных группах в данный период было статистически значимо ( $p < 0,05$ ) меньше, чем до воздействия.

Через 7 сут после воздействия гипоксии в группах с превентивным введением обоих нейротрофических факторов наблюдается восстановление количества малых сетевых пачек и среднего количества спайков в пачке до исходного уровня (статистически значимых различий с уровнем до воздействия не обнаружено). При этом показатели спонтанной биоэлектрической активности в группах с превентивным введением нейротрофических факторов оказались статистически значимо ( $p < 0,05$ ) выше, чем в группе «гипоксия».

На следующем этапе была проведена **оценка жизнеспособности клеток в первичной диссоциированной культуре гиппокампа** после моделирования нормобарической гипоксии. Установлено, что оба используемых нейротрофических фактора в дозе 1 нг/мл обладают выраженным цитозащитным действием, которое характеризуется уменьшением количества мертвых клеток в течение 7 сут постгипоксического периода.

При исследовании совместного действия нейротрофинов (BDNF, 1 нг/мл + GDNF, 1 нг/мл) не обнаружено усиления цитопротективного эффекта (рис. 3). Количественная оценка жизнеспособности клеток в культуре показала, что в группе с совместным применением нейротрофинов процент мертвых клеток выше, чем в группах с изолированным применением факторов. Таким образом, при исследовании жизнеспособности клеток в первичной диссоциированной культуре не обнаружено усиления действия нейротрофических факторов при их совместном применении.

Исследование дозозависимого действия нейротрофических факторов не обнаружило достоверных изменений в количестве мертвых клеток через 7 сут после моделирования гипоксии. Так, при увеличении концентрации BDNF в поздний постгипоксический период

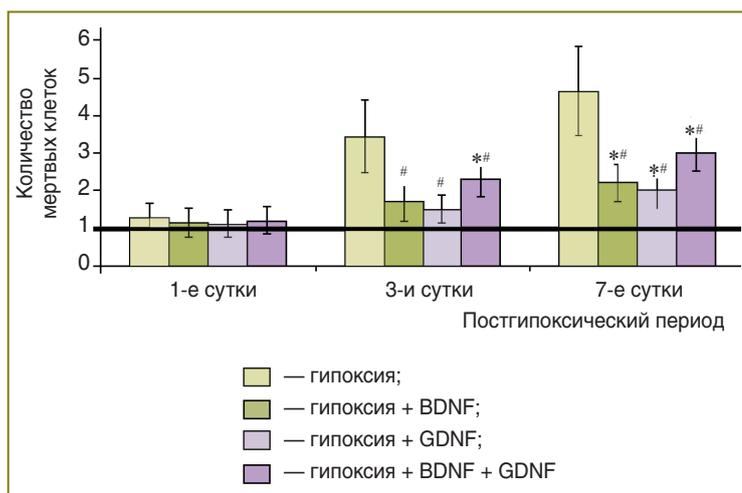


**Рис. 2.** Количество спайков за 50 мс (сверху) и растровые диаграммы спонтанной биоэлектрической активности диссоциированной культуры гиппокампа (снизу): *а* — активность контрольной культуры до гипоксии и через 24 ч после реоксигенации; *б* — активность культуры до аппликации BDNF (1 нг/мл) и гипоксии и через 24 ч после аппликации BDNF и реоксигенации; *в* — активность культуры до аппликации GDNF (1 нг/мл) и гипоксии и через 24 ч после аппликации GDNF и реоксигенации

до 10 нг/мл наблюдалась тенденция к уменьшению количества мертвых клеток (1 нг/мл —  $12,34 \pm 3,54\%$ , 10 нг/мл —  $9,65 \pm 2,87\%$ ). Повышение концентрации нейротрофического фактора GDNF, напротив, вызвало незначительное увеличение количества мертвых (пропидиум иодид-положительных) клеток через 7 сут после воздействия (1 нг/мл —  $11,15 \pm 3,14\%$ , 10 нг/мл —  $14,09 \pm 4,28\%$ ).

На следующем этапе проведено **исследование действия нейротрофических факторов (BDNF, GDNF) на устойчивость животных к условиям острой гипобарической гипоксии**. Выявлено, что превентивное введение нейротрофических факторов увеличивает устойчивость животных к условиям острой гипобарической гипоксии (табл. 1). Применение нейротрофических факторов BDNF (4 мг/кг) и GDNF

**Рис. 3.** Количество мертвых (пропидиум иодид-положительных) клеток в диссоциированных культурах гиппокампа на 1, 3 и 7-е сутки постгипоксического периода (n=36). Данные нормированы относительно группы «нормоксия»; \* — статистическая значимость различий с группой «нормоксия»; # — с группой «гипоксия»; ANOVA, p<0,05



Т а б л и ц а 1

### Основные показатели устойчивости животных к острой гипобарической гипоксии

Группа животных	Коэффициент защиты	Время жизни на высоте, мин	Время потери позы, мин	Время восстановления позы, мин
Контроль (NaCl, 0,9%) (n=15)	—	6,18±0,76	2,23±0,22	4,29±1,17
Группа сравнения (Реамберин, 150 мг/кг) (n=15)	1,4	8,35±0,59	2,50±0,11	3,60±0,98
BDNF, 4 мкг/кг (n=12)	1,3	<b>9,40±0,41*</b>	2,44±0,21	2,42±1,15
BDNF, 40 мкг/кг (n=12)	<b>1,6</b>	8,63±0,49*	2,72±0,23	3,92±1,11
GDNF, 4 мкг/кг (n=12)	<b>1,5</b>	<b>9,12±0,98*</b>	0,37±0,04*	3,29±1,01
GDNF, 40 мкг/кг (n=12)	1,2	8,22±0,72	1,15±0,9	3,55±1,08
BDNF, 4 мкг/кг + GDNF, 4 мкг/кг (n=10)	0,8	6,07±1,31	0,22±0,16*	8,30±1,45*

\* — статистически значимые различия с контрольной группой; ANOVA, p<0,05.

(4 мг/кг) статистически значимо увеличивает время жизни на высоте.

Особый интерес представляет исследование показателей устойчивости животных в группе GDNF (4 мг/кг). Несмотря на достоверное (p<0,05) увеличение времени жизни на высоте и коэффициента защиты в этой группе, время потери позы — показателя, характеризующего состояние рефлекторных реакций животных, оказалось наименьшим. Отмечено, что при увеличении концентрации глиального нейротрофического фактора устойчивость животных снижается. В группе с превентивным введением GDNF в дозе 40 мг/кг не выявлено статистически значимых различий в показателях устойчивости при сравнении со значениями контрольной группы.

Совместное применение нейротрофических факторов резко снижает показатели устойчивости животных к условиям острой гипобарической гипоксии. В этой группе отмечен самый низкий коэффициент защиты. Таким образом, установлен антагонистический эффект применения двух нейротрофических факторов.

Для оценки нейропротективных свойств BDNF и GDNF проведено *изучение процессов сохране-*

*ния пространственной памяти* в водном лабиринте Морриса после эпизода острой гипобарической гипоксии. При обучении мышей в водном лабиринте были установлены основные стратегии поиска животными скрытой под водой платформы: 1) прямое достижение цели — животное непосредственно направлялось к месту расположения платформы (время достижения платформы составляло 3–10 с); 2) активный поиск — животное осуществляло циркулярные и радиальные поисковые движения, достигая цели в течение 10–20 с; 3) хаотичный поиск — отсутствие выраженной стратегии достижения цели, более 20 с; 4) отрицательный результат — животное не нашло платформу в течение попытки.

При первом помещении в водный лабиринт большинство особей выбирали хаотичный поиск цели. Животные плавали вдоль стенок бассейна, что объяснялось врожденной программой поведения — тигмотаксисом. При анализе последующих попыток у мышей наблюдались процессы формирования пространственной памяти. По мере обучения время нахождения животными платформы сокращалось, поиск цели становился направленным, как правило,

Таблица 2

**Значения отсроченного коэффициента сохранения долговременной памяти у мышей после воздействия острой гипобарической гипоксии (M±m)**

Группа животных	оКс, %
Интактные	29,8±2,6
Контроль (NaCl, 0,9%)	24,5±3,9
Группа сравнения (Реамберин, 150 мг/кг)	25,6±3,1
BDNF, 4 мкг/кг	30,6±3,9
BDNF, 40 мкг/кг	35,5±4,1*#
GDNF, 4 мкг/кг	33,54±3,98
GDNF, 40 мкг/кг	36,06±4,3*#

\* — статистически значимые различия с группой «Реамберин»; # — с контрольной группой, ANOVA,  $p < 0,05$ .

характеризующимся циркулярными и радиальными движениями.

Через сутки после моделирования острой гипобарической гипоксии наблюдалось незначительное нарушение процессов воспроизведения долговременной памяти у мышей при отсроченном тестировании в водном лабиринте. Снижение оКс относительно значений в интактной группе было недостоверным (табл. 2). Применение Реамберина в качестве препарата с выраженными антигипоксическими свойствами не повлияло на процессы воспроизведения пространственной памяти после острой гипобарической гипоксии (оКс составил 25,6±3,1). Однако превентивное введение BDNF и GDNF предотвращало нарушение пространственной памяти в постгипоксическом периоде. Наилучшие результаты при отсроченном тестировании были получены в группах животных, которым интраназально вводили BDNF и GDNF в дозе 40 мкг/кг (оКс составил в группе BDNF, 40 мкг/кг — 35,5±4,1, в группе GDNF, 40 мкг/кг — 36,06±4,3). Интересно отметить, что оКс в обеих группах с превентивным введением BDNF и GDNF в дозе 40 мкг/кг был статистически значимо ( $p < 0,05$ ) выше показателей не только контрольной группы, но и группы сравнения. Применение нейротрофических факторов в малой дозировке (4 мг/кг) также способствовало снижению негативных эффектов гипоксии и сохранению следов пространственной памяти, однако обнаруженные тенденции не носят достоверный характер (оКс составил в группе BDNF, 4 мкг/кг — 30,6±3,9, а в группе GDNF, 4 мкг/кг — 33,54±3,98).

**Обсуждение.** Гипоксия — один из основных факторов поражения головного мозга при ишемии. Патологические реакции, запускаемые кислородным голоданием, связаны с разобщением окислительного фосфорилирования, нарушением энергетического обмена клетки, активацией свободно-радикальных процессов, стимуляцией апоптотических реакций. Особо губительно кислородное голодание сказывается именно на нервной системе, где потеря даже нескольких нейронов может вызвать необратимые нарушения в функционировании нейронных сетей. Возможность защиты клеток головного мозга от последствий кисло-

родного голодания — одна из важнейших проблем современной нейробиологии и биомедицины.

Полученные нами в ходе экспериментов *in vitro* и *in vivo* результаты показывают, что нейротрофические факторы BDNF и GDNF обладают ярко выраженными антигипоксическими и нейропротективными свойствами. Превентивное их введение частично нивелирует негативные последствия гипоксии как на клеточном, так и на организменном уровнях.

Нейротрофический фактор головного мозга способен активно изменять метаболизм клеток нервной системы во взрослом организме. BDNF связывается с двумя типами мембранных рецепторов: с низкоаффинным рецептором к фактору NGF (low-affinity nerve growth factor receptor, LNGFR), или p75, и с высокоаффинным тирозинкиназным рецептором B — TrkB [18]. Можно предположить, что защитные механизмы BDNF обусловлены способностью зрелой молекулы белка связываться с рецептором TrkB и активировать внутриклеточные сигнальные каскады [7, 19]. Одним из сигнальных путей, повышающих выживаемость нервных клеток в условиях гипоксии, является активация белкового комплекса NF-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). NF-kB1 отвечает за экспрессию антиапоптотических белков семейств Bcl2 и IAP (Inhibitors of Apoptosis) [20] и наряду с рядом других факторов (например, c-jun, cIAP1) служит основным тормозящим апоптоз агентом [21]. Увеличение синтеза мРНК NF-kB1 под влиянием BDNF рассматривается как один из возможных механизмов метаболической адаптации клетки к условиям кислородной депривации. Кроме того, антигипоксические эффекты BDNF могут быть обусловлены непосредственным действием данного нейротрофина на митохондриальную систему клетки. Исследование действия BDNF на метаболизм кислорода в митохондриях мозга показало, что BDNF концентрационно-зависимо повышает респираторный индекс (показатель эффективности дыхательной цепи, синтеза АТФ и целостности органелл) [22, 23]. Повышение респираторного индекса способствует адаптации клеток к условиям кислородного голодания.

Глиальный нейротрофический фактор головного мозга наряду с другими нейротрофинами участвует в процессах регуляции работы нейронных сетей во взрослом организме. Механизмы действия GDNF связаны с активацией сложных многокомпонентных нейрон-глиальных взаимодействий. Действие GDNF опосредовано активацией универсальных многокомпонентных рецепторов GFR1 [24]. Данный рецептор не имеет внутриклеточного домена, поэтому выполняет роль передатчика сигнала к другим белкам, в частности Ret-тирозинкиназы, которая в свою очередь активирует несколько внутриклеточных сигнальных каскадов: RAS/MAPK, фосфатидилинозитол-3 киназа (PK3-K)/Akt, фосфолипаза C [4, 5]. Активация RAS/MAPK, PK3-K/Akt сигнальных путей приводит к увеличению выживаемости различных популяций нейронов [5]. GDNF оказывает действие не только в месте синтеза, но и дистанционно [25, 26]. Поддержание функциональной активности нейронных

сетей и устойчивости животных к условиям кислородного голодания может быть связано с активацией комплексных и универсальных GDNF-ассоциированных сигнальных систем. Таким образом, данный нейротрофин является уникальной сигнальной молекулой, не только обеспечивающей поддержание жизнеспособности отдельных нейронов, но и объединяющей метаболические реакции отдельных компонентов нейрон–глиальной сети в единую функциональную структуру.

Проведенные исследования показывают, что применение нейротрофических факторов BDNF, GDNF может существенно скорректировать отрицательные последствия гипоксического повреждения головного мозга.

**Заключение.** Нейротрофический фактор головного мозга и глиальный нейротрофический фактор обладают выраженными антигипоксическими и нейропротективными свойствами. Как показали эксперименты *in vitro* и *in vivo*, совместная аппликация GDNF и BDNF при гипоксическом воздействии менее эффективна, чем применение каждого из этих нейротрофических факторов по отдельности.

**Финансирование исследования.** Работа поддержана грантами РФФИ №13-04-01871, №13-04-12067, №14-04-31601, грантом (соглашение от 27 августа 2013 г. №02.В.49.21.0003 между Минобрнауки России и ННГУ), Федеральной целевой программой «Уникальная научная установка для исследования информационных процессов в головном мозге с использованием методов оптогенетики» (соглашение о предоставлении субсидии от 01.12.2014 №14.591.21.0004).

**Конфликт интересов.** У авторов нет конфликта интересов.

## Литература

- Lin S., Ye S., Huang J., Tian Y., Xu Y., Wu M., Wang J., Wu S., Cai J. How do Chinese medicines that tonify the kidney inhibit dopaminergic neuron apoptosis? *Neural Regen Res* 2013; 8(30): 2820–2826, <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.30.004>.
- Wei L., Zhang J., Xiao X.B., Mai H.X., Zheng K., Sun W.L., Wang L., Liang F., Yang Z.L., Liu Y., Wang Y.Q., Li Z.F., Wang J.N., Zhang W.J., You H. Multiple injections of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells through the tail vein improve microcirculation and the microenvironment in a rat model of radiation myelopathy. *J Transl Med* 2014; 12(1): 246, <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-014-0246-6>.
- Han B.H., Holtzman D.M. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci* 2000; 20(15): 5775–5781.
- Airaksinen M.S., Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3(5): 383–394, <http://dx.doi.org/10.1038/nrn812>.
- Sariola H., Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 19): 3855–3862, <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00786>.
- Hetman M., Gozdz A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur J Biochem* 2004; 271(11): 2050–2055, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04133.x>.
- Sakharnova T.A., Vedunova M.V., Mukhina I.V. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its role in the functioning of the central nervous system. *Neurochemical Journal* 2012; 6(4): 251–259, <http://dx.doi.org/10.1134/S1819712412030129>.
- Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Митрошина Е.В., Мухина И.В. Антигипоксические свойства нейротрофического фактора головного мозга при моделировании гипоксии в диссоциированных культурах гиппокампа. *Современные технологии в медицине* 2012; 4: 17–23.
- Сахарнова Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Мухина И.В. Антигипоксическое и нейропротекторное действие нейротрофических факторов BDNF и GDNF в условиях острой гипобарической гипоксии *in vivo*. *Биомедицинская радиоэлектроника* 2014; 4: 71–72.
- Мухина И.В., Казанцев В.Б., Хаспеков Л.Г., Захаров Ю.Н., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Коротченко С.А., Корягина Е.А. Мультиэлектродные матрицы — новые возможности в исследовании пластичности нейрональной сети. *Современные технологии в медицине* 2009; 1: 8–15.
- Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств. Под ред. Лукьяновой Л.Д. М; 1990.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11(1): 47–60, [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4).
- Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Миронов А.А., Сахарнова Т.А., Пимашкин А.С., Бобров М.Ю., Хаспеков Л.Г., Мухина И.В. Нейропротекторное действие каннабиноида N-арахидоноилдофамина при моделировании острой гипобарической гипоксии мозга. *Неврологический вестник им. Бехтерева* 2012; 1: 14–19.
- D'Hooge R., De Deyn P.P. Application for the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 2001; 36(1): 60–90.
- Агрба Е.А., Мухина И.В. Пространственно-временная характеристика нейросетевой активности первичных культур гиппокампа. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского* 2013; 4(1): 139–144.
- Широкова О.М., Фрумкина Л.Е., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Захаров Ю.Н., Хаспеков Л.Г., Мухина И.В. Морфофункциональные закономерности развития нейронных сетей в диссоциированных культурах клеток гиппокампа. *Современные технологии в медицине* 2013; 5(2): 6–13.
- Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Sakharnova T.A., Bobrov M.Yu., Bezuglov V.V., Khaspekov L.G., Mukhina I.V. Effect of N-arachidonoyl dopamine on activity of neuronal network in primary hippocampus culture upon hypoxia modelling. *Bull Exp Biol Med* 2014; 156(4): 461–464, <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-014-2374-7>.
- Patapoutian A., Reichardt L.F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11(3): 272–280.
- Chen A., Xiong L.J., Tong Y., Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed Rep* 2013; 1(2): 167–176, <http://dx.doi.org/10.3892/br.2012.48>.

20. LaCasse E.C., Baird S., Korneluk R.G., MacKenzie A.E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17(25): 3247–3259.
21. Bogdał M.N., Hat B., Kochanczyk M., Lipniacki T. Levels of pro-apoptotic regulator Bad and anti-apoptotic regulator Bcl-xL determine the type of the apoptotic logic gate. *BMC Syst Biol* 2013; 7: 67, <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-7-67>.
22. Markham A., Cameron I., Bains R., Franklin P., Kiss J.P., Schwendimann L., Gressens P., Spedding M. Brain-derived neurotrophic factor-mediated effects on mitochondrial respiratory coupling and neuroprotection share the same molecular signaling pathways. *Eur J Neurosci* 2012, 35(3): 366–374, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07965.x>.
23. Markham A., Cameron I., Franklin P., Spedding M. BDNF increases rat brain mitochondrial respiratory coupling at complex I, but not complex II. *Eur J Neurosci* 2004, 20(5): 1189–1196, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03578.x>.
24. Jing S., Wen D., Yu Y., Holst P.L., Luo Y., Fang M., Tamir R., Antonio L., Hu Z., Cupples R., Louis J.C., Hu S., Altrock B.W., Fox G.M. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 1996, 85(7): 1113–1124, [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81311-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81311-2).
25. Rind H.B., Butowt R., von Bartheld C.S. Synaptic targeting of retrogradely transported trophic factors in motoneurons: comparison of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor, and cardiotrophin-1 with tetanus toxin. *J Neurosci* 2005, 25(3): 539–549, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4322-04.2005>.
26. Tsui C.C., Pierchala B.A. The differential axonal degradation of Ret accounts for cell-type-specific function of glial cell line-derived neurotrophic factor as a retrograde survival factor. *J Neurosci* 2010; 30(15): 5149–5158, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5246-09.2010>.
- References**
1. Lin S., Ye S., Huang J., Tian Y., Xu Y., Wu M., Wang J., Wu S., Cai J. How do Chinese medicines that tonify the kidney inhibit dopaminergic neuron apoptosis? *Neural Regen Res* 2013; 8(30): 2820–2826, <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.30.004>.
2. Wei L., Zhang J., Xiao X.B., Mai H.X., Zheng K., Sun W.L., Wang L., Liang F., Yang Z.L., Liu Y., Wang Y.Q., Li Z.F., Wang J.N., Zhang W.J., You H. Multiple injections of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells through the tail vein improve microcirculation and the microenvironment in a rat model of radiation myelopathy. *J Transl Med* 2014; 12(1): 246, <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-014-0246-6>.
3. Han B.H., Holtzman D.M. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci* 2000; 20(15): 5775–5781.
4. Airaksinen M.S., Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3(5): 383–394, <http://dx.doi.org/10.1038/nrn812>.
5. Sariola H., Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 19): 3855–3862, <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00786>.
6. Hetman M., Gozdz A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur J Biochem* 2004; 271(11): 2050–2055, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04133.x>.
7. Sakharnova T.A., Vedunova M.V., Mukhina I.V. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its role in the functioning of the central nervous system. *Neurochemical Journal* 2012; 6(4): 251–259, <http://dx.doi.org/10.1134/S1819712412030129>.
8. Vedunova M.V., Sakharnova T.A., Mitroshina E.V., Mukhina I.V. Antihypoxic properties of the brain-derived neurotrophic factor in the modeling of hypoxia in dissociated hippocampal cultures. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2012; 4: 17–23.
9. Sakharnova T.A., Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Mukhina I.V. The antihypoxic and neuroprotective action of neurotrophic factors BDNF and GDNF during acute hypobaric hypoxia in vivo. *Biomeditsinskaya radioelektronika* 2014; 4: 71–72.
10. Mukhina I.V., Kazantsev V.B., Khaspekov L.G., Zakharov Yu.N., Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Korotchenko S.A., Koryagina E.A. Multielectrode matrices — new possibilities in investigation of the neuronal network plasticity. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2009; 1: 8–15.
11. *Metodicheskie rekomendatsii po eksperimental'nomu izucheniyu preparatov, predlagaemykh dlya klinicheskogo izucheniya v kachestve antigipoksicheskikh sredstv* [Guidelines on experimental study of drugs offered for clinical study as antihypoxic agents]. Pod red. Luk'yanovoy L.D. [Luk'yanova L.D. (editor)]. Moscow; 1990.
12. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11(1): 47–60, [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4).
13. Mitroshina E.V., Vedunova M.V., Mironov A.A., Saharnova T.A., Pimashkin A.S., Bobrov M.Yu., Khaspekov L.G., Mukhina I.V. Neuroprotective effect of endocannabinoid N-arachidonoyldopamine in acute hypobaric hypoxia. *Nevrologicheskiy vestnik im. Bekhtereva* 2012; 1: 14–19.
14. D'Hooge R., De Deyn P.P. Application for the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 2001; 36(1): 60–90.
15. Agrba E.A., Mukhina I.V. Spatio-temporal characteristics of neuronal network activity of primary hippocampal cultures. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo* 2013; 4(1): 139–144.
16. Shirokova O.M., Frumkina L.E., Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Zakharov Y.N., Khaspekov L.G., Mukhina I.V. Morphofunctional patterns of neuronal network developing in dissociated hippocampal cell cultures. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2013; 5(2): 6–13.
17. Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Sakharnova T.A., Bobrov M.Yu., Bezuglov V.V., Khaspekov L.G., Mukhina I.V. Effect of N-arachidonoyl dopamine on activity of neuronal network in primary hippocampus culture upon hypoxia modelling. *Bull Exp Biol Med* 2014; 156(4): 461–464, <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-014-2374-7>.
18. Patapoutian A., Reichardt L.F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11(3): 272–280.
19. Chen A., Xiong L.J., Tong Y., Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed Rep* 2013; 1(2): 167–176, <http://dx.doi.org/10.3892/br.2012.48>.

20. LaCasse E.C., Baird S., Korneluk R.G., MacKenzie A.E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17(25): 3247–3259.

21. Bogdał M.N., Hat B., Kochanzyk M., Lipniacki T. Levels of pro-apoptotic regulator Bad and anti-apoptotic regulator Bcl-xL determine the type of the apoptotic logic gate. *BMC Syst Biol* 2013; 7: 67, <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-7-67>.

22. Markham A., Cameron I., Bains R., Franklin P., Kiss J.P., Schwendimann L., Gressens P., Spedding M. Brain-derived neurotrophic factor-mediated effects on mitochondrial respiratory coupling and neuroprotection share the same molecular signaling pathways. *Eur J Neurosci* 2012, 35(3): 366–374, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07965.x>.

23. Markham A., Cameron I., Franklin P., Spedding M. BDNF increases rat brain mitochondrial respiratory coupling at complex I, but not complex II. *Eur J Neurosci* 2004, 20(5): 1189–1196, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03578.x>.

24. Jing S., Wen D., Yu Y., Holst P.L., Luo Y., Fang M., Tamir R., Antonio L., Hu Z., Cupples R., Louis J.C., Hu S., Altrock B.W., Fox G.M. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 1996, 85(7): 1113–1124, [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81311-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81311-2).

25. Rind H.B., Butowt R., von Bartheld C.S. Synaptic targeting of retrogradely transported trophic factors in motoneurons: comparison of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor, and cardiotrophin-1 with tetanus toxin. *J Neurosci* 2005, 25(3): 539–549, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4322-04.2005>.

26. Tsui C.C., Pierchala B.A. The differential axonal degradation of Ret accounts for cell-type-specific function of glial cell line-derived neurotrophic factor as a retrograde survival factor. *J Neurosci* 2010; 30(15): 5149–5158, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5246-09.2010>.