

АДАПТАЦИОННАЯ РОЛЬ ГЛИАЛЬНОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

DOI: 10.17691/stm2017.9.1.08

УДК 577.25:616.831–005.4

Поступила 17.02.2016 г.



Е.В. Митрошина, к.б.н., старший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ¹; доцент кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины²;
Б.Ж. Абогессимгане, аспирант кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины²;
М.Д. Уразов, аспирант кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины²;
И. Хамрауй, аспирант кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины²;
Т.А. Мищенко, старший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ¹; старший научный сотрудник Института биологии и биомедицины²;
Т.А. Астраханова, аспирант кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины²;
Н.А. Щелчкова, к.б.н., зав. отделом молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ¹;
Р.Д. Лапшин, к.б.н., зав. отделом экспериментального моделирования ЦНИЛ¹;
Т.В. Шишкина, аспирант кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины²;
И.И. Белоусова, научный сотрудник отдела экспериментального моделирования ЦНИЛ¹;
И.В. Мухина, д.б.н., профессор, зав. ЦНИЛ¹; зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова¹; профессор кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины²; руководитель Центра трансляционных технологий²;
М.В. Ведунова, д.б.н., старший научный сотрудник Института биологии и биомедицины; доцент кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины; директор Института биологии и биомедицины²

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23

Цель исследования — изучение влияния глиального нейротрофического фактора (GDNF) на устойчивость животных к повреждающему действию ишемии головного мозга.

Материалы и методы. Исследования *in vivo* выполнены на самцах мышей линии С3Н массой 18–40 г. Для моделирования ишемии проводили двустороннюю необратимую окклюзию общих сонных артерий. Изучали неврологический статус животных при действии ишемии, а также ориентировочно-исследовательскую активность и способность к обучению в тестах «Открытое поле» и «Условный рефлекс пассивного избегания». Оценивали скорость потребления кислорода митохондриями мозга при действии ишемии с помощью респирометра высокого разрешения Oxygraph-2k (Oroboros, Австрия).

Результаты. Установлено, что применение GDNF при двусторонней окклюзии сонных артерий способствует восстановлению неврологического статуса. Он также нормализует скорость потребления кислорода митохондриями клеток головного мозга после ишемического повреждения.

Заключение. GDNF оказывает выраженное нейропротекторное и антигипоксическое действие при моделировании ишемии *in vivo*.

Ключевые слова: глиальный нейротрофический фактор; GDNF; нейропротекция; ишемия головного мозга.

Как цитировать: Mitroshina E.V., Abogessimengane B.Zh., Urazov M.D., Hamraoui I., Mishchenko T.A., Astrakhanova T.A., Shchelchikova N.A., Lapshin R.D., Shishkina T.V., Belousova I.I., Mukhina I.V., Vedunova M.V. Adaptive role of glial cell line-derived neurotrophic factor in cerebral ischemia. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(1): 68–77, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.1.08>

English

Adaptive Role of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Cerebral Ischemia

E.V. Mitroshina, PhD, Senior Researcher, Molecular Cellular Technologies Department, Central Scientific Research Laboratory¹; Associate Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine²;

B.Zh. Abogessimengane, PhD Student, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine²;

Для контактов: Митрошина Елена Владимировна, e-mail: Helenmitroshina@gmail.com

M.D. Urazov, PhD Student, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine²;
I. Hamraoui, PhD Student, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine²;
T.A. Mishchenko, Senior Researcher, Molecular Cellular Technologies Department, Central Scientific Research Laboratory¹; Senior Researcher, Institute of Biology and Biomedicine²;
T.A. Astrakhanova, PhD Student, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine²;
N.A. Shchelchkova, PhD, Head of Molecular Cellular Technologies Department, Central Scientific Research Laboratory¹;
R.D. Lapshin, PhD, Head Experimental Modeling Department, Central Scientific Research Laboratory¹;
T.V. Shishkina, PhD Student, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine²;
I.I. Belousova, Researcher, Experimental Modeling Department, Central Scientific Research Laboratory¹;
I.V. Mukhina, DSc, Professor, Head of Central Scientific Research Laboratory¹; Head of the Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov¹; Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine²; Head of the Center of Translational Technology²;
M.V. Vedunova, DSc, Senior Researcher, Institute of Biology and Biomedicine; Associate Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine; Director, Institute of Biology and Biomedicine²

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation;

²Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

The aim of the investigation was to study the effect of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on animals` resistance to cerebral-ischemia-induced damage.

Materials and Methods. *In vivo* studies were carried out on C3H male mice weighing 18–40 g. Ischemia modeling was performed by bilateral irreversible occlusion of both carotid arteries. A neurological status as well as an orientative-exploratory behavior of experimental animals and their learning capability in the post-ischemic period were analyzed by using “Open field” and “Passive avoidance” tests. In addition, high-resolution respirometer Oxygraph-2k (Oroboros, Austria) was applied to study an oxygen uptake rate of brain mitochondria in ischemic conditions.

Results. GDNF application in bilateral occlusion of carotid arteries was found to contribute to the neurological status recovery. Moreover, it normalizes oxygen uptake rate of mitochondria in the post-ischemic period.

Conclusion. GDNF has a marked neuroprotective and antihypoxic effect under ischemia modeling *in vivo*.

Key words: glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF; neuroprotection; cerebral ischemia.

Последствиями перенесенного ишемического поражения головного мозга являются резкое ухудшение памяти и неврологического статуса, нарушения способностей к обучению, когнитивных функций, что обуславливает разработку современных способов защиты нервной системы.

Перспективным подходом для повышения адаптационных возможностей нервной системы представляется активация эндогенных систем, способствующих выживанию нервных клеток при действии стресс-факторов и поддержанию их функциональной активности. Большой интерес вызывает использование нейротрофинов, таких как глиальный нейротрофический фактор (GDNF). Установлено, что нейротрофины регулируют процессы нейрогенеза и функционирования нервных клеток не только в раннем онтогенезе, но и во взрослом, сформировавшемся мозге. Они вовлечены в формирование синапсов и оказывают сильное влияние на рост, реконструкцию и стабильность дендритов и аксонов нейронов коры больших полушарий и гиппокампа [1, 2].

GDNF выделяется нервными клетками для поддержания жизнеспособности нейронов в стрессогенных условиях. Введение его в культуральную среду при ишемическом повреждении способствует сохранению

и восстановлению функциональной активности нейронных сетей *in vitro* [1, 3]. Это открывает перспективы коррекции нейродегенеративных заболеваний и нарушений функции мозга такой этиологии, как ишемическое повреждение и травмы, с помощью применения синтетических аналогов нейротрофинов [4].

Одним из ведущих факторов повреждения клеток головного мозга при ишемии является гипоксия. Снижение концентрации кислорода вызывает нарушение процессов окислительного фосфорилирования на мембране митохондрий, разобщение компонентов дыхательной цепи и приводит к активации свободно-радикальных процессов, что служит одной из основных причин гибели клеток. Чрезвычайно важным является поддержание функционального состояния митохондрий после перенесенного ишемического воздействия.

На сегодняшний день большинство исследований *in vivo* преимущественно выполнены с применением таких моделей, как окклюзия среднемозговой артерии или введение в нее нейлоновой нити [5–7]. Данные модели характеризуются тем, что создают локальный очаг ишемии в головном мозге. В нашем исследовании мы использовали модель глобальной ишемии, выполненную посредством необратимой окклюзии сон-

ных артерий, таким образом акцент сделан на поиск способа защиты мозга от глобальной ишемии. Кроме того, в настоящее время особый интерес вызывает выявление индивидуальных особенностей реакции на ишемию отдельных линий животных, поскольку позволяет наиболее эффективно разрабатывать модели различных патологий.

Цель исследования — оценка влияния глиального нейротрофического фактора на устойчивость животных к повреждающему действию ишемии.

На сегодняшний день большая часть исследований проводится на культурах клеток *in vitro*. Имеющиеся исследования *in vivo* выполнены преимущественно на крысах.

Материалы и методы. Эксперименты *in vivo* по исследованию устойчивости различных линий мышей к ишемии были выполнены на мышах линий СЗН (n=10), СВА (n=10), SHK (n=10) и С57BL/6 (n=10) массой 28–36 г. Исследование воздействия GDNF на устойчивость животных к ишемическому повреждению головного мозга проводили на 173 самцах мышей линии СЗН. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, приведенным в приказе Минздрава России №708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации», и 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.), были согласованы с Этическим комитетом НижГМА.

Ранее нами было показано, что наиболее эффективными являются низкие концентрации GDNF [8], в связи с этим исследуемыми дозами стали 4 и 0,4 мкг/кг.

Животные линии СЗН были разделены на следующие группы: 1-я группа — интактные (n=16); 2-я группа — ложнооперированные животные, которым проводили разрез тканей и нахождение артерии без осуществления окклюзии (n=16); 3-я группа — контрольные животные с осуществленной двусторонней окклюзией сонных артерий без введения GDNF (n=61); 4-я группа — животные с двусторонней окклюзией сонных артерий и интраназальным введением GDNF (0,4 мкг/кг) за 45 мин до проведения операции и затем ежедневно в течение 3 сут после операции (n=38); 5-я группа — животные с двусторонней окклюзией сонных артерий и интраназальным введением GDNF (4 мкг/кг) за 45 мин до проведения операции и затем ежедневно в течение 3 сут после операции (n=42). Выбор дозы исследуемого вещества был основан на результатах предшествующих исследований [8].

Животным линий СВА, SHK и С57BL/6 моделирование ишемии проводилось без введения исследуемых соединений.

Моделирование ишемического повреждения головного мозга. С целью развития у животных ишеми-

ческих повреждений различных структур мозга в эксперименте применяли модель двусторонней окклюзии сонных артерий. Животных наркотизировали с помощью пентобарбитала в концентрации 70 мг/кг. Для исключения влияния суточных ритмов эксперимент осуществляли в одно и то же время суток. С передней поверхности шеи удаляли шерсть, вслед за этим проводили надрез мягких тканей. В операционном поле выделяли сначала левую, затем правую общие сонные артерии, после чего выполняли одновременную перевязку сосудов с помощью нерассасывающихся лигатурных нитей. После раны зашивали и посыпали порошком Стрептоцида. Все операционные действия занимали 10–15 мин.

Определение неврологического статуса. Для оценки функционального состояния нервной системы животных после ишемического повреждения головного мозга проводили определение неврологического статуса по Шкале оценки неврологического дефицита у мелких лабораторных животных [9] и по шкале Гарсии [10, 11] в модификации для мышей. Неврологический статус определяли до моделирования ишемии, затем ежедневно в течение 10 сут после моделирования и также на 14-е сутки после операции.

При оценке неврологического статуса по Шкале оценки неврологического дефицита у мелких лабораторных животных тестируют 10 произвольных врожденных поведенческих реакций, каждую из которых оценивают от нуля до двух баллов, где два балла — отсутствие реакции. Полученные баллы суммируют.

Интерпретация результатов оценки неврологического статуса:

от 10 до 20 баллов — выраженное повреждение ЦНС;

от 6 до 9 баллов — умеренное повреждение ЦНС;

от 1 до 5 баллов — легкое повреждение ЦНС.

При определении неврологического статуса по шкале Гарсии используется 6 тестов для оценки асимметрии движений и реакций животного в баллах, которые затем суммируются. Количество баллов, присвоенное каждой мышце по завершении испытания, представляет собой сумму результатов всех шести отдельных тестов. Минимальный неврологический результат — 3 балла (максимальные нарушения), а максимальный — 18 баллов (отсутствие нарушений).

Тест «открытое поле». Тестирование общей двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных проводили в установке «открытое поле» (OpenField LE800S; Panlab Harvard Apparatus, Испания) до моделирования ишемии, а также на 1, 7 и 14-е сутки после моделирования. Видеорегистрацию поведенческих реакций животного осуществляли с помощью видеокамеры Sony SSC-G118 (Япония). Регистрацию и анализ данных проводили с помощью программы Smart v. 3.0.03 (Panlab Harvard Apparatus, Испания; Stoelting, США).

Тест заключается в количественном измерении компонентов поведения животного, помещенного в

новое открытое пространство. Регистрировали следующие показатели поведенческой активности мышей: горизонтальную двигательную активность, которая включает в себя пробежки животного внутри поля; вертикальную двигательную активность с фиксацией суммарного количества вертикальных стоек с опорой и без опоры на борт; количество и длительность актов груминга; длительность времени замирания; а также количество актов дефекации и мочевых точек, что является показателем, характеризующим уровень «эмоциональности» животного.

Формирование условного рефлекса пассивного избегания. Способность животных к обучению определяли исходя из оценки латентного времени перехода мыши из светлого в темный отсек челночной камеры. Для этого использовали камеру (60×20×25 см) с электрифицированным решетчатым полом, разделенную перегородкой с отверстием на два одинаковых отсека — затемненный и освещенный (Shuttle Box LE918; Panlab Harvard Apparatus, Испания). Обучение проводили однократно на 12-й день после моделирования ишемии. Животное помещали в светлый отсек камеры спиной к темному отсеку (стартовое положение). Под влиянием исследовательского поведения и врожденного предпочтения темных участков пространства (фотофобии) мыши, как правило, достаточно быстро заходят в темный отсек. Регистрировали латентный период захода в темный отсек камеры. Как только мышь переходила в него, она получала электрокожное раздражение на лапы (ток 0,08 мА) в течение 5 с, после чего помещалась в жилую клетку. На 14-й и 18-й день после ишемии проверяли сохранность памятного следа. Для этого животных тестировали в той же камере, но без подачи тока. Мышь помещали в светлый отсек камеры, после чего фиксировали латентный период захода в темный отсек. Если животное не переходило в темный отсек камеры в течение 180 с, то считали, что памятный след полностью сохранен.

Выделение митохондрий головного мозга. Для исследования молекулярных механизмов действия нейротрофинов проводили выделение митохондрий из клеток головного мозга и определение их функциональных параметров. Выделение митохондрий осуществляли стандартным дифференциальным центрифугированием. Все манипуляции выполняли на льду. Оборудование и среды выделения были охлаждены. После декапитации животных быстро вскрывали черепную коробку, иссекали головной мозг (не более 20 с), помещали его в предварительно охлажденную фарфоровую ступку и промывали ледяной средой выделения следующего состава: 70 мМ сахара, 210 мМ маннитол, 30 мМ Hepes, 0,1 мМ ЭДТА (pH=7,4), после чего удаляли мозжечок. Большие полушария и стволу часть мозга подвергали гомогенизации в среде выделения в стеклянной гомогенизаторной пробирке, помещенной в лед. Тefлоновый пестик гомогенизатора с клиренсом, исключавшим

разрушение митохондрий, приводили в движение электромотором. Соотношение массы ткани и среды выделения — 1:7. Полученный гомогенат мозга подвергали предварительному центрифугированию при 2700 об./мин (температурный интервал от –3 до 0°C, 10 мин). Супернатант сливали в пробирку и подвергали центрифугированию в течение 15 мин при 8500 г. Осажденные митохондрии промывали холодной (+4°C) средой выделения и ресуспендировали в среде, содержащей 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозы, 0,1 мМ ЭГТА, 10 мМ Hepes (pH=7,4) и вновь центрифугировали в течение 15 мин при 8500 г. Полученную суспензию митохондрий хранили на льду, не допуская замораживания.

Определение параметров дыхания митохондрий мозга проводили по оценке скорости поглощения ими кислорода. Скорость потребления кислорода митохондриями регистрировали при помощи респирометра высокого разрешения Oxygraph-2k (Oroboros, Австрия) в закрытой ячейке объемом 2 мл при постоянном перемешивании и термостатировании (37°C). Среда инкубации митохондрий содержала 120 мМ KCl, 5 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Hepes, 5 мМ глутамата, 5 мМ малата и 14 мМ MgCl₂ (pH=7,4). Концентрация белка митохондрий в кислородной ячейке составляла 0,5 мг/мл.

Оценку состояния дыхательной цепи митохондрий выполняли, используя следующие параметры: а) V4 — высокое содержание в среде инкубации субстратов — 5 мМ глутамата и 5 мМ малата (субстраты I комплекса) при отсутствии АДФ; б) V3 — условия те же, что и при определении V4, но в присутствии 5 мМ АДФ (при этом фактором, лимитирующим скорость дыхания, является сама дыхательная цепь). Интенсивность работы II комплекса дыхательной цепи оценивали после ингибирования работы I комплекса 0,5 мкМ ротеноном и стимулированием II комплекса 10 мМ сукцинатом натрия.

Статистическая обработка данных. Полученные результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM). Достоверность различий между экспериментальными группами определяли с помощью пакета ANOVA в программе SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., США). Различия считались статистически значимыми при p<0,05.

Результаты. На первом этапе было проведено сравнение устойчивости различных линий мышей к повреждающему действию ишемии.

Эффективность поиска способов коррекции негативного воздействия ишемии на нервную ткань зависит от удобства и адекватности экспериментальных моделей ишемии на лабораторных животных. В настоящее время используются несколько способов моделирования ишемии головного мозга (остановка сердца, введение во внутреннюю сонную артерию монофиламентного волокна, перевязка средней мозговой артерии через трепанационное окно, фотоиндуцированный тромбоз и т.д.) [12–14]. У всех этих моделей

Таблица 1

Воздействие GDNF на выживаемость мышей при моделировании необратимой ишемии головного мозга

Группы животных	Смертность животных после ишемии, %			
	на 1-е сутки	на 5-е сутки	на 7-е сутки	на 10-е сутки
Контроль (ишемия)	84,2±4,3	93,4±2,1	94,5±2,6	94,5±2,3
GDNF 0,4 мкг/кг	77,6±3,9	84,5±1,5*	84,0±2,5*	84,1±4,3
GDNF 4 мкг/кг	81,0±4,1	87,6±2,3	95,3±4,3	95,9±4,7

* — статистически значимое различие значений с контрольной группой, $p < 0,05$; ANOVA.

наряду с преимуществами существуют и недостатки. Нами была модифицирована и адаптирована для мышей модель ишемии головного мозга, вызванной окклюзией основных сосудов, которые снабжают кровью головной мозг, — модель двусторонней необратимой окклюзии общих сонных артерий. Преимуществом ее является развитие выраженных обширных ишемических повреждений мозга, поскольку на долю сонных артерий приходится 70–75% объема кровоснабжения головного мозга. Применение подобной модели позволяет оценить эффект применения различных веществ, предположительно обладающих нейропротекторным, антигипоксическим и репаративным действиями.

После моделирования необратимой ишемии головного мозга проводили анализ выживаемости и определение неврологического статуса у мышей линий СЗН, СВА, SHK и C57BL/6. Установлено, что среди исследованных линий мыши СЗН наиболее устойчивы к воздействию ишемии.

На 10-е сутки после моделирования ишемии их выживаемость была 60,5±8,95%, тогда как у других линий она составила от 33,33±11,2% (СВА) до 20,2±7,55% (C57BL/6) уже на 4-е сутки постишемического периода. Оценка неврологического статуса показала, что на 4-е сутки после ишемического повреждения у мышей линии СВА и C57BL/6 развиваются статистически значимые нарушения неврологического статуса средней степени тяжести как по шкале оценки неврологического дефицита у мелких лабораторных животных, так и по шкале Гарсии, тогда как у мышей линий SHK и линии СЗН статистически значимых нарушений не выявлено.

Также было проведено сравнение различных линий мышей по сохраненности у них следов памяти при формировании условного рефлекса пассивного избегания. Наименьшая длительность латентного периода перехода между камерами была зарегистрирована у животных линии СЗН — 98,23±26,15 с, а наибольшая — у линии SHK (148,82±31,18 с).

Для оценки действия GDNF на двигательную активность животных и их способность к обучению в отдаленном постишемическом периоде нами была выбрана линия СЗН, демонстрирующая достаточно высокую выживаемость после тяжелого

ишемического повреждения головного мозга. Исследование действия нейротрофина на устойчивость животных к ишемическому повреждению проводили на 173 мышах линии СЗН массой 25–40 г. Для исключения влияния фаз гормонального цикла на поведенческую активность и способность к обучению исследование выполняли на самцах.

Интересно отметить, что выживаемость самцов линии СЗН после моделирования необратимой ишемии статистически значимо ($p < 0,05$, ANOVA) ниже, чем у самок, что связано, по всей вероятности, с большими адаптационными резервами организма самок.

Степень резистентности к ишемии оценивали по выживаемости и неврологическому статусу животных в течение 10 сут после моделирования ишемии (табл. 1). Применение GDNF повышало устойчивость мышей в постишемическом периоде. Наибольший эффект оказывало применение GDNF в дозе 0,4 мкг/кг. После прекращения поддерживающего введения препарата в течение трех суток в группе «GDNF 4 мкг/кг» смертность увеличивалась.

При моделировании ишемии наиболее выраженный неврологический дефицит наблюдается на 1-е сутки после операции (рис. 1). При оценке неврологического статуса по шкале неврологического дефицита выявлены статистически значимые различия на 1-е и 7-е сутки после операции между интактной и контрольной группами. У контрольной группы на 1-е сутки были зарегистрированы средние и тяжелые нарушения неврологического статуса, он составил 8,10±1,21 балла. У животных отмечались выраженный птоз, нарушения в выполнении двигательных и поведенческих тестов (выход из круга, движение вдоль перекладки и т.д.). Статистически значимых различий между интактной группой и группами «GDNF 0,4» и «GDNF 4 мкг/кг» не обнаружено, неврологический дефицит у животных, получавших GDNF, был выражен умеренно.

При анализе неврологического статуса по шкале Гарсии выявлено статистически значимое различие между интактной и контрольной группами (рис. 1, б). У животных, перенесших ишемическое повреждение, наблюдались асимметрия движений и нарушения реакций в тестах спонтанной активности, проприорецепция тела и реакции на прикосновение к вибриссам. Неврологический дефицит у этих животных был средней и выраженной степени тяжести и составил на 1-е сутки 10,70±1,31 балла. У животных, получавших GDNF в обеих исследуемых дозах, на 1-е сутки после проведения операции зарегистрировано статистически значимое снижение показателей, характеризующих неврологический статус относительно интактной группы (11,20±1,45 и 7,75±1,88 балла соответственно), в дальнейшем постишемическом перио-

де эти показатели нормализовались и уже на 5-е сутки достоверно не отличались от параметров интактной группы.

Таким образом, GDNF способствует выживаемости животных при моделировании ишемии головного мозга и нормализации неврологического статуса в постшемическом периоде. Наилучший результат был продемонстрирован для низкой концентрации GDNF 0,4 мкг/кг. Это согласуется с ранее полученными данными [8]. В связи с этим дальнейшие исследования были проведены в группе с превентивным введением GDNF 0,4 мкг/кг.

Для оценки общей двигательной активности и ориентировочно-исследовательской деятельности животных проводили тестирование в установке «Открытое поле» на 1, 7 и 14-е сутки после ишемического воздействия. Анализ исследуемых поведенческих реакций показал, что у животных, перенесших тотальную ишемию, на 1-е сутки после операции длительность реакции замирания увеличивается в 9,8 раза по сравнению с интактными животными (табл. 2), что свидетельствует о снижении исследовательской активности и повышении уровня стрессорности животного. К 5-м суткам данный показатель нормализуется. У животных, получавших перед операцией и в постшемическом периоде GDNF 0,4 мкг/кг, длительность реакции замирания сопоставима с показателями интактной группы. По другим регистрируемым параметрам ориентировочно-исследовательской активности (горизонтальная и вертикальная двигательная активность, количество и длительность реакций груминга, количество актов дефекации и мочеиспускания) статистически значимых различий между группами не зарегистрировано. Введение GDNF 0,4 мкг/кг помогает снизить продолжительность реакции замирания и нормализовать двигательную активность животных в постшемическом периоде.

Для оценки сохранения когнитивных функций и способности животных к обучению после перенесения ишемии головного мозга было проанализировано сохранение следов памяти при выработке условного рефлекса пассивного избегания и при тестировании его сохранности (длительность

латентного периода). Обучение животных проводили на 12-й день после моделирования ишемии, воспроизведение рефлекса — через 2 сут и на 5-е сутки после обучения. Данные по длительности латентного периода перехода между светлой и темной камера-

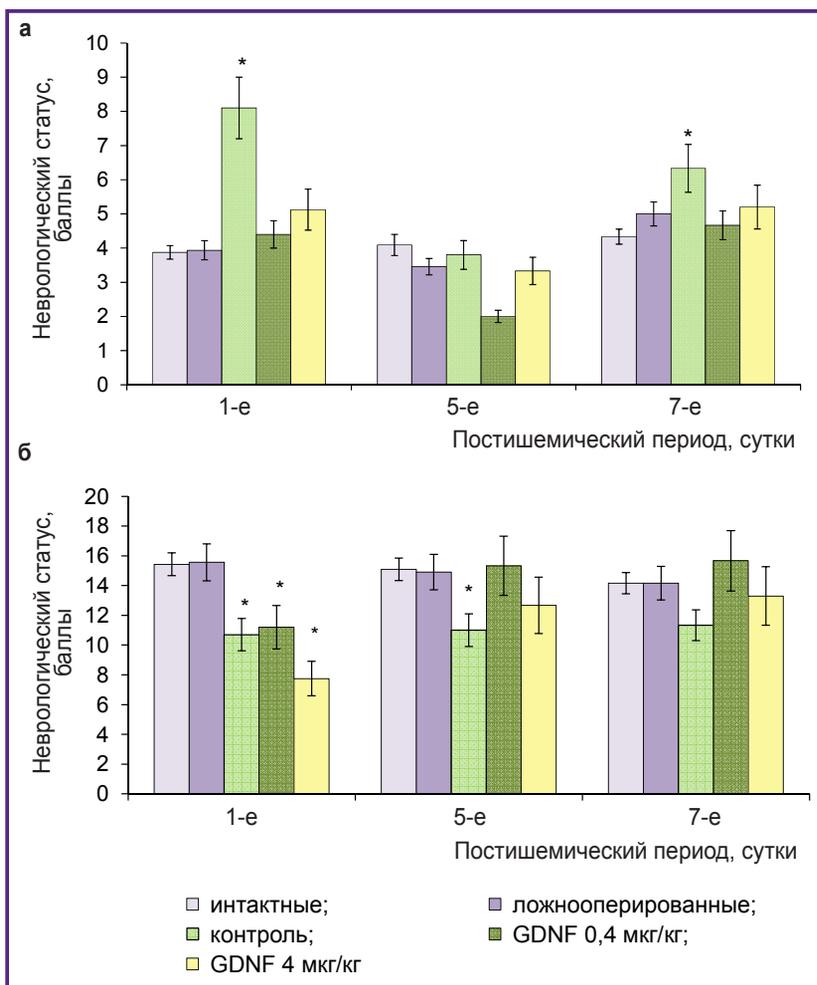


Рис. 1. Неврологический статус мышей линии С3Н после моделирования ишемии головного мозга: а — по шкале оценки неврологического дефицита у мелких лабораторных животных; б — по шкале Гарсии; * — статистически значимое различие значений с группой интактных животных; $p < 0,05$; ANOVA

Т а б л и ц а 2

Длительность реакции замирания животных в тесте «Открытое поле» после моделирования ишемии

Группы животных	Длительность реакции замирания после ишемии, с		
	на 1-е сутки	на 7-е сутки	на 14-е сутки
Интактные	13,170±6,396	15,63±8,56	20,20±11,94
Ложнооперированные	27,96±17,37	12,88±7,38	26,59±17,49
Контроль (ишемия)	129,11±38,89*	6,52±1,85	5,02±5,11
GDNF 0,4 мкг/кг	3,64±2,77	11,92±6,05	7,95±4,18

* — статистически значимое различие значений с интактной группой, $p < 0,05$; ANOVA.

Таблица 3

Исследование воспроизведения условного рефлекса пассивного избегания после моделирования ишемии

Группы животных	Длительность латентного периода после ишемии, с		
	Обучение (12-е сутки)	Воспроизведение 1 (14-е сутки)	Воспроизведение 2 (18-е сутки)
Интактные	72,68±24,44	119,12±27,92	127,53±23,20
Ложнооперированные	84,73±22,60	141,50±22,08	165,40±21,01
Контроль (ишемия)	68,80±20,16	169,10±38,51	154,73±35,37
GDNF 0,4 мкг/кг	139,4±40,6	118,27±42,89	104,87±37,48

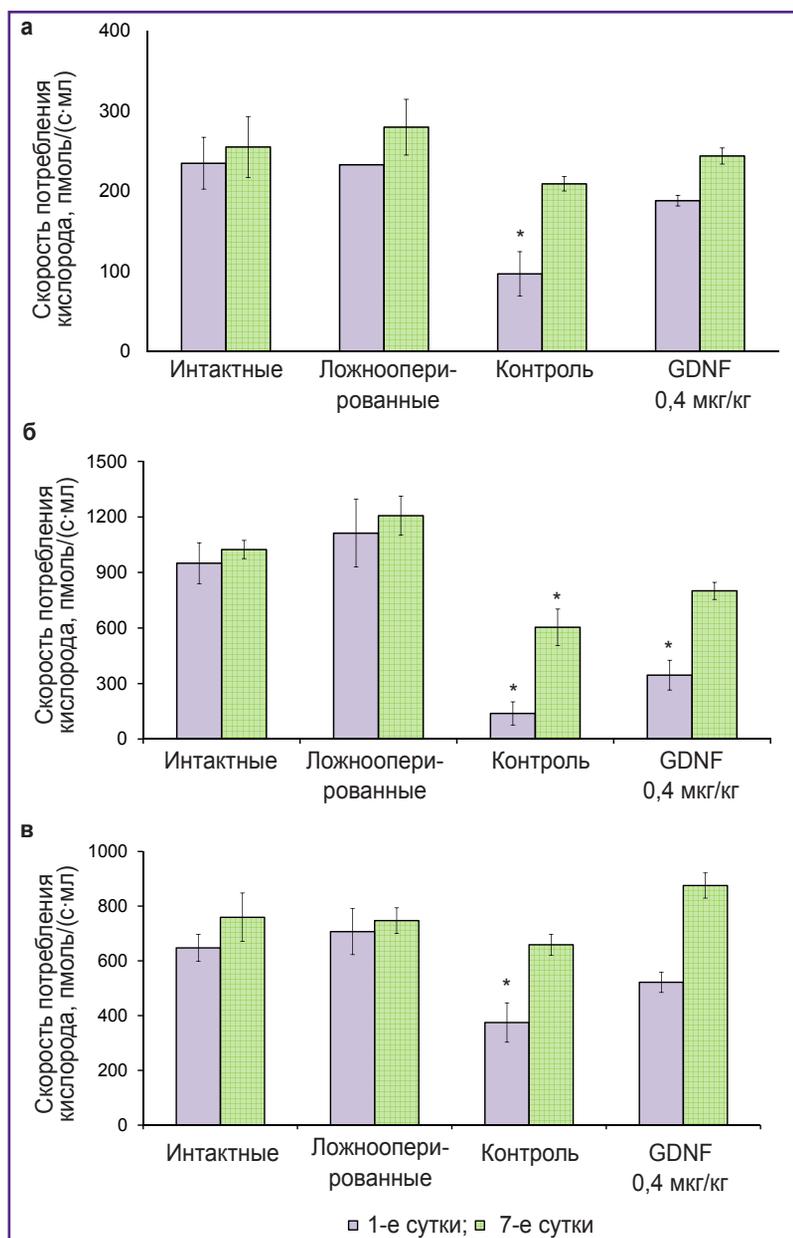


Рис. 2. Изменение скорости потребления кислорода митохондриями: а — скорость потребления кислорода митохондриями; б — состояние активной деятельности, стимулированное добавкой АДФ; в — показатели скорости потребления кислорода митохондриями при работе II комплекса дыхательной цепи митохондрий; * — статистически значимое различие значений с группой интактных животных, $p < 0,05$; ANOVA

ми приведены в табл. 3. Длительность латентного периода после обучения во всех исследуемых группах увеличилась в 1,7–2,5 раза. Показатели экспериментальных групп во время обоих сеансов воспроизведения не отличались от параметров интактных животных.

Таким образом, проведенные исследования показали, что GDNF повышает устойчивость животных к воздействию ишемии. Превентивное интраназальное введение GDNF в сочетании с поддерживающим введением в постишемическом периоде способствует поддержанию жизнеспособности животных, нормализации неврологического статуса и двигательной активности. Наиболее эффективной оказалась доза GDNF 0,4 мкг/кг.

Для изучения молекулярных механизмов нейропротекторного действия GDNF была исследована скорость потребления кислорода митохондриями на 1-е и 7-е сутки после моделирования необратимой ишемии головного мозга (рис. 2). Оценка скорости потребления кислорода митохондриями является важнейшим показателем функционального состояния данной органеллы, так как зависит не только от количества митохондрий, но и от состояния ферментов дыхательной цепи.

В ходе исследований на 1-е сутки после моделирования ишемии установлено, что скорость потребления кислорода митохондриями в интактной группе составила $234,50 \pm 32,36$ пмоль/(с·мл). Ишемическое воздействие вызывало снижение скорости потребления кислорода митохондриями через 24 ч в 2,4 раза по сравнению с интактной группой — до $96,47 \pm 6,64$ пмоль/(с·мл) (рис. 2, а), что свидетельствует об угнетении работы дыхательной цепи митохондрий после ишемического повреждения. На 7-е сутки

происходит нормализация скорости потребления кислорода митохондриями — $208,85 \pm 9,01$ $\mu\text{моль}/(\text{с}\cdot\text{мл})$. Это может служить доказательством постишемической адаптации в долгосрочном периоде, когда запускаются компенсаторные реакции, приводящие к увеличению количества митохондрий и синтезу белков *de novo*.

Исследование воздействия GDNF на метаболизм кислорода в митохондриях мозга показало, что данный фактор повышает скорость потребления кислорода митохондриями при моделировании ишемии головного мозга. Через 24 ч после ишемического воздействия скорость поглощения кислорода составила $187,75 \pm 40,90$ $\mu\text{моль}/(\text{с}\cdot\text{мл})$ и не отличалась от показателей интактной группы.

Оценка функционального состояния дыхательной цепи в присутствии АДФ показала, что ишемическое повреждение вызывает резкое угнетение активности I дыхательного комплекса. Через 24 ч после моделирования ишемии поглощение кислорода в присутствии АДФ снизилось по сравнению с интактной группой в 6,9 раза (рис. 2, б). В группе животных, получавших GDNF, активная деятельность дыхательной цепи снизилась только в 2,7 раза. Важно отметить, что в группе GDNF на 7-е сутки скорость потребления кислорода митохондриями при добавлении АДФ нормализовалась, в то время как в контрольной группе оставалась достоверно ниже, чем в группе интактных животных.

Исследование скорости потребления кислорода митохондриями при работе II комплекса дыхательной цепи митохондрий выявило статистически значимое снижение данного параметра на следующие сутки после моделирования ишемии (рис. 2, в). В группе GDNF не обнаружено отличий от интактной группы.

Таким образом, GDNF поддерживает эффективность работы дыхательной цепи, функциональное состояние митохондрий, способствуя адаптации клеток к действию ишемии.

Обсуждение. При поиске веществ, способных повысить резистентность животных к негативному действию ишемии, необходимо учитывать особенности чувствительности к ишемическому повреждению, свойственные конкретным линиям животных. Известно, что реакция животных различных линий на одни и те же стрессогенные воздействия может значительно различаться [15–17], поэтому в работе было проведено сравнение устойчивости различных линий мышей к действию ишемии.

В настоящее время метод двусторонней окклюзии сонных артерий является наиболее часто используемым при моделировании глобальной ишемии головного мозга у лабораторных животных [13]. Однако у мышей данная модель является достаточно сложно воспроизводимой и имеет свои особенности. Недостаток ее в этом случае — высокая изменчивость ишемического исхода [18, 19], поэтому устойчивость к ишемическому инсульту у разных линий мышей является проблемным вопросом [17, 20, 21]. Наше исследование показало, что линия СЗН наиболее устойчива

к ишемическому повреждению среди всех исследованных животных (СЗН, СВА, SHK и С57BL/6). Одной из возможных причин такой вариабельности могут служить индивидуальные различия коллатерального кровотока через виллизиев круг [22, 23], поскольку даже в пределах одного генотипа могут встречаться значительные различия артериальных цереброваскулярных структур, в частности наличие или отсутствие задней соединительной артерии [23]. В связи с этим при изучении различных аспектов ишемических поражений необходимо предварительное тестирование конкретной линии на устойчивость к ишемии. Особо интересным с точки зрения исследования нервной системы является вопрос об особенностях когнитивных реакций отдельных видов лабораторных животных. СЗН характеризуется не только как самая устойчивая линия, но и как линия, имеющая выраженные особенности в формировании условного рефлекса пассивного избегания, качественно отличающие эту линию от всех других.

Исследование влияния GDNF на устойчивость мышечной линии СЗН к повреждающему действию ишемии показало, что данный фактор в дозах 0,4 и 4 $\mu\text{кг}/\text{кг}$ повышает выживаемость животных, способствует нормализации неврологического статуса и двигательной ориентировочной активности. Наилучший эффект при этом был достигнут при использовании GDNF в дозе 0,4 $\mu\text{кг}/\text{кг}$. Таким образом, GDNF обладает выраженными нейропротекторными и антигипоксическими свойствами. Ранее в ряде работ на моделях фокальной и глобальной ишемии *in vivo* продемонстрировано, что превентивное введение GDNF либо его применение сразу после ишемического воздействия снижает тяжесть ишемического повреждения [24, 25]. Полученные нами результаты согласуются с имеющимися литературными данными. Механизмы выявленных эффектов могут быть связаны со способностью GDNF частично блокировать вызванную ишемией глутаматную эксайтотоксичность и генерацию активных форм кислорода, а также ингибировать апоптотическую активность каспаз, активировать гены раннего ответа и тем самым повышать адаптацию клеток к стресс-факторам [26, 27]. GDNF является универсальной биоактивной молекулой, которая может не только обеспечить поддержание жизнеспособности отдельных нейронов, но и объединяет метаболические реакции отдельных компонентов нейрон-глиальной сети в единую функциональную структуру. В различных экспериментальных моделях местной и общей ишемии мозга было выявлено, что GDNF способствует выживанию клеток, сохранению отростков и синаптогенезу [3]. Известно, что активация универсальных многокомпонентных рецепторов GFR1 активирует внутриклеточные метаболические каскады, препятствующие активации процессов гибели клетки [28–30].

Повреждающее действие ишемии на организм складывается из ряда компонентов, ключевым из которых для нервных клеток является гипоксия. Для

поддержания высокого уровня метаболизма нейроны постоянно нуждаются в большом количестве богатых энергией соединений (АДФ), что делает их чувствительными к дефициту кислорода и нарушениям работы дыхательной цепи митохондрий. При снижении концентрации кислорода в тканях головного мозга запускаются патогенетические процессы, приводящие к разобщению окислительного фосфорилирования, нарушению работы митохондрий и, как следствие, к снижению энергетического обмена клетки, вызывающего в дальнейшем резкое усиление свободнорадикальных процессов и запуску апоптоза. Одним из механизмов защитного действия GDNF может служить снижение количества свободных радикалов, образующихся при ишемии [26, 31–33]. Нами установлено, что GDNF в дозе 0,4 мкг/кг способствует сохранению скорости потребления кислорода митохондриями клеток и поддерживает нормальную активность ферментативных дыхательных комплексов. Следовательно, нейропротекторный и антигипоксический эффекты GDNF реализуются путем воздействия на функциональное и метаболическое состояние митохондрий. Полученные данные являются экспериментальным основанием для дальнейшего исследования GDNF как потенциальной субстанции, используемой для коррекции тяжелых ишемических повреждений мозга.

Заключение. Глиальный нейротрофический фактор обладает выраженным нейропротекторным и антигипоксическим действием. В экспериментах *in vivo* интраназальное применение его при моделировании тяжелой формы ишемии способствует увеличению выживаемости, нормализует неврологический статус и двигательную активность животных. Действие данного фактора не ограничивается описанными ранее внутриклеточными метаболическими каскадами, глиальный нейротрофический фактор влияет также на функциональное состояние митохондрий.

Финансирование исследования. Статья подготовлена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №16-04-00245 А, №16-34-00301 мол_а) в рамках выполнения государственной работы «Обеспечение проведения научных исследований», а также при поддержке государственного задания (проекты 17.3335.2017/ПЧ и 6.6379.2017/БЧ).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Vedunova M.V., Shishkina T.V., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Astrakhanova T.A., Pimashkin A.S., Mukhina I.V. Antihypoxic and neuroprotective effects of glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) in cultures of dissociated hippocampal cells under conditions of experimental hypoxia. *Bull Exper Biol Med* 2016; 161(1): 168–174, <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3369-3>.
2. Shishkina T.V., Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Mukhina I.V. The role of glial cell line-derived neurotrophic factor in the functioning of the nervous system (review).

Sovremennye tehnologii v medicine 2015; 7(4): 211–220, <https://doi.org/10.17691/stm2015.7.4.27>.

3. Duarte E.P., Curcio M., Canzoniero L.M., Duarte C.B. Neuroprotection by GDNF in the ischemic brain. *Growth Factors* 2012; 30(4): 242–257, <https://doi.org/10.3109/08977194.2012.691478>.

4. Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Mukhina I.V. TrkB-mediated neuroprotective and antihypoxic properties of brain-derived neurotrophic factor. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 1–9, <https://doi.org/10.1155/2015/453901>.

5. Васильев И.А., Ступак В.В., Черных В.А., Зайдман А.М., Половников Е.В., Черных Е.Р., Шевела Е.Я., Дергилев А.П. Экспериментальные модели сосудистых поражений головного мозга (обзор литературы). *Успехи современного естествознания* 2015; 1(3): 366–369. Vasilyev I.A., Stupak V.V., Chernykh V.A., Zaidman A.M., Polovnikov E.V., Chernykh E.R., Shevela E.Y., Dergilev A.P. Experimental models of vascular lesions of the brain (literature review). *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya* 2015; 1(3): 366–369.

6. Kaya A.H., Erdogan H., Tasdemiroglu E. Searching evidences of stroke in animal models: a review of discrepancies. *Turk Neurosurg* 2016, <https://doi.org/10.5137/1019-5149.jtn.15373-15.2>.

7. Kumar A., Aakriti, Gupta V. A review on animal models of stroke: an update. *Brain Res Bull* 2016; 122: 35–44, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.02.016>.

8. Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Митрошина Е.В., Шишкина Т.В., Астраханова Т.А., Мухина И.В. Антигипоксические и нейропротективные свойства нейротрофических факторов BDNF и GDNF при гипоксии *in vitro* и *in vivo*. *Современные технологии в медицине* 2014; 6(4): 38–47. Vedunova M.V., Sakharnova T.A., Mitroshina E.V., Shishkina T.V., Astrakhanova T.A., Mukhina I.V. Antihypoxic and neuroprotective properties of BDNF and GDNF *in vitro* and *in vivo* under hypoxic conditions. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2014; 6(4): 38–47.

9. Кульчиков А.Е., Макаренко А.Н., Новикова Ю.Л., Добычина Е.Е. Способ определения неврологического дефицита у мелких лабораторных животных при поражении головного мозга. А.с. 2327227 С2. 2008. Kul'chikov A.E., Makarenko A.N., Novikova Yu.L., Dobychina E.E. *Sposob opredeleniya neurologicheskogo defitsita u melkikh laboratornykh zhivotnykh pri porazhenii golovnogo mozga*. А.с. 2327227 С2 [Neurologic impairment determination method in small laboratory animals with brain lesions. А.с. 2327227 С2]. 2008.

10. Garcia J.H. Early reperfusion as a rationale of therapy in ischemic stroke. *Rev Neurol* 1995; 23(123): 1067–1073.

11. Kuster G.W., Baruzzi A.C., Pacheco Ede P., Domingues R.B., Pieruccetti M., Giacomini L.M., Garcia J.C., Furlan V., Massaro A.R. Early reperfusion therapy in acute ischemic stroke after recent myocardial infarction. *Arq Neuropsiquiatr* 2016; 74(8): 690–691, <https://doi.org/10.1590/0004-282x20160099>.

12. Манухина Е.Б., Терехина О.Л., Белкина Л.М., Абрамочкин Д.В., Буданова О.П., Машина С.Ю., Смирин Б.В., Якунина Е.Б., Дауни Г.Ф. Вазопротекторный эффект адаптации к гипоксии при ишемическом и реперфузионном повреждении сердца. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2013; 4: 26–31. Manukhina E.B., Terekhina O.L., Belkina L.M., Abramochkin D.V., Budanova O.P., Mashina S.Yu., Smirin B.V., Yakunina E.B., Downey H.F. Vasoprotective effect of

adaptation to hypoxia in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya* 2013; 4: 26–31.

13. Onken M., Berger S., Kristian T. Simple model of forebrain ischemia in mouse. *J Neurosci Methods* 2012; 204(2): 254–261, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.11.022>.

14. Tang Y., Wang L., Wang J., Lin X., Wang Y., Jin K., Yang G.Y. Ischemia-induced angiogenesis is attenuated in aged rats. *Aging Dis* 2016; 7(4): 326, <https://doi.org/10.14336/ad.2015.1125>.

15. Пшенникова М.Г., Бахтина Л.Ю., Буданова О.П., Малышев И.Ю. Влияние адаптации к не повреждающим стрессорным воздействиям на устойчивость к острому стрессу у крыс линии Август и популяции Вистар. *Патогенез* 2014; 12(4): 31–34. Pshennikova M.G., Bakhtina L.Yu., Budanova O.P., Malyshev I.Yu. Effect of adaptation to not damaging stress influences on resistance to acute stress in rats August line and Wistar population. *Patogenez* 2014; 12(4): 31–34.

16. Watanabe A., Sasaki T., Yukami T., Kanki H., Sakaguchi M., Takemori H., Kitagawa K., Mochizuki H. Serine racemase inhibition induces nitric oxide-mediated neurovascular protection during cerebral ischemia. *Neuroscience* 2016; 339: 139–149, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.09.036>.

17. Sheldon R.A., Sadjadi R., Lam M., Fitzgerald R., Ferriero D.M. Alteration in downstream hypoxia gene signaling in neonatal glutathione peroxidase overexpressing mouse brain after hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci* 2015; 37(4–5): 398–406, <https://doi.org/10.1159/000375369>.

18. Kitagawa K., Matsumoto M., Yang G., Mabuchi T., Yagita Y., Hori M., Yanagihara T. Cerebral ischemia after bilateral carotid artery occlusion and intraluminal suture occlusion in mice: evaluation of the patency of the posterior communicating artery. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18(5): 570–579, <https://doi.org/10.1097/00004647-199805000-00012>.

19. Yang G., Kitagawa K., Ohtsuki T., Kuwabara K., Mabuchi T., Yagita Y., Takazawa K., Tanaka S., Yanagihara T., Hori M., Matsumoto M. Regional difference of neuronal vulnerability in the murine hippocampus after transient forebrain ischemia. *Brain Res* 2000; 870(1–2): 195–198, [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02319-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02319-2).

20. Wellons J.C. 3rd, Sheng H., Laskowitz D.T., Mackensen G.B., Pearlstein R.D., Warner D.S. A comparison of strain-related susceptibility in two murine recovery models of global cerebral ischemia. *Brain Res* 2000; 868(1): 14–21, [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02216-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02216-2).

21. Soria F.N., Pérez-Samartin A., Martin A., Gona K.B., Llop J., Szczupak B., Chara J.C., Matute C., Domercq M. Extrasynaptic glutamate release through cystine/glutamate antiporter contributes to ischemic damage. *J Clin Invest* 2014; 124(8): 3645–3655, <https://doi.org/10.1172/jci71886>.

22. Beckmann N. High resolution magnetic resonance angiography non-invasively reveals mouse strain differences in the cerebrovascular anatomy in vivo. *Magn Reson Med* 2000; 44(2): 252–258, [https://doi.org/10.1002/1522-2594\(200008\)44:2<252::aid-mrm12>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/1522-2594(200008)44:2<252::aid-mrm12>3.0.co;2-g).

23. Zhen G., Doré S. Optimized protocol to reduce variable outcomes for the bilateral common carotid artery occlusion model in mice. *J Neurosci Methods* 2007; 166(1): 73–80, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.06.029>.

24. Hermann D.M., Zechariah A., Kaltwasser B., Bosche B., Caglayan A.B., Kilic E., Doeppner T.R. Sustained neurological recovery induced by resveratrol is associated with angioneurogenesis rather than neuroprotection after focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 2015; 83: 16–25, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.018>.

25. Katsuragi S., Ikeda T., Ikenoue T. A strategy to treat neonatal hypoxic encephalopathy using glial cell line-derived neurotrophic factor. *No To Hattatsu* 2011; 43(4): 265–272.

26. Cheng H., Fu Y.-S., Guo J.-W. Ability of GDNF to diminish free radical production leads to protection against kainate-induced excitotoxicity in hippocampus. *Hippocampus* 2004; 14(1): 77–86, <https://doi.org/10.1002/hipo.10145>.

27. Wang E., Gao J., Yang Q., Parsley M.O., Dunn T.J., Zhang L., DeWitt D.S., Denner L., Prough D.S., Wu P. Molecular mechanisms underlying effects of neural stem cells against traumatic axonal injury. *J Neurotrauma* 2012; 29(2): 295–312, <https://doi.org/10.1089/neu.2011.2043>.

28. Liao Y., Zhong D., Kang M., Yao S., Zhang Y., Yu Y. Transplantation of neural stem cells induced by all-trans-retinoic acid combined with glial cell line derived neurotrophic factor and chondroitinase ABC for repairing spinal cord injury of rats. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2015; 29(8): 1009–1015.

29. Chao M.V. Intercellular networks underlying developmental decisions. *Neuron* 2016; 91(5): 947–949, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.025>.

30. Costantini F., Shakya R. GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *BioEssays* 2006; 28(2): 117–127, <https://doi.org/10.1002/bies.20357>.

31. Shang J., Deguchi K., Yamashita T., Ohta Y., Zhang H., Morimoto N., Liu N., Zhang X., Tian F., Matsuura T., Funakoshi H., Nakamura T., Abe K. Antiapoptotic and antiautophagic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and hepatocyte growth factor after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Res* 2010; 88(10): 2197–2206, <https://doi.org/10.1002/jnr.22373>.

32. Yamashita T., Abe K. Recent progress in therapeutic strategies for ischemic stroke. *Cell Transplantation* 2016; 25(5): 893–898, <https://doi.org/10.3727/096368916x690548>.

33. Szydłowska K., Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 2010; 47(2): 122–129, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.01.003>.