

**Ланшаков Дмитрий Александрович**

**Эффекты гипоксии и глюкокортикоидов на  
программируемую гибель клеток неонатального мозга**

**03.03.01 - физиология**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Новосибирск – 2014**

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (Новосибирский государственный университет, НГУ).

Научный руководитель: доктор биологических наук,  
член-корр. РАН  
Дыгало Николай Николаевич

Официальные оппоненты: Рябчикова Елена Ивановна,  
доктор биологических наук, профессор,  
зав. лаборатории микроскопических  
исследований ФГБУ ИХБФМ СО РАН

Селяницкая Вера Георгиевна,  
доктор биологических наук, профессор,  
зав. лаборатории эндокринологии  
ФГБУ «НЦКЭ» СО РАМН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное  
учреждение «Научно-исследовательский  
институт молекулярной биологии и  
биофизики» Сибирского отделения  
Российской академии медицинских наук

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета по защите диссертаций (Д 001.014.01) на соискание ученой степени кандидата биологических наук в ФГБУ «НИИ ФФМ» СО РАМН в конференц-зале института по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4, тел. (383)335-98-01, факс (383)335-97-54, e-mail: dissovet@physiol.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ ФФМ» СО РАМН.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
к.б.н.

Бузуева И.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Основные события нейрогенеза, установления нейрональных связей и удаления избыточных клеток происходят в течение всего перинатального периода. В этот период развивающийся организм подвергается различным воздействиям, в том числе и гипоксии, связанной с процессом родов, а также с возможным недостатком сурфактанта в легких (респираторный дистресс синдром новорожденных) при их преждевременном наступлении. В настоящее время препараты глюкокортикоидов широко используют в перинатальной медицине, эта терапия направлена на интенсификацию образования сурфактанта легкими новорожденного (Halliday et al., 2009a, b; Roberts and Dalziel, 2006). Несмотря на свою неоспоримую эффективность по жизненным показателям, глюкокортикоидная терапия имеет негативные последствия для дальнейшего развития новорожденных и их психическое состояние (Whitelaw and Thoresen, 2000). На животных моделях перинатальное применение глюкокортикоидов приводит к возрастанию тревожности, нарушению полового поведения, нарушению функционирования ГГНС и ухудшению памяти во взрослом возрасте (Naumenko, Dygalo 1980; Holson et al., 1995; Hossain et al., 2008, Дыгало, 1993). Возможной причиной негативного влияния глюкокортикоидов на нейрокогнитивное развитие является влияние на процессы естественной программируемой клеточной гибели (ПКГ), протекающие в мозге в этот период. Глюкокортикоиды действуют через внутриклеточные рецепторы-транскрипционные факторы (Surjit et al., 2011). Значительной проблемой является выявление типов клеток ЦНС, в которых глюкокортикоиды индуцируют ПКГ.

Наряду с сообщениями о проапоптозном действии глюкокортикоидов в мозге (Noguchi et al., 2008), появляются свидетельства их антиапоптозного действия в ЦНС (Menshanov et al., 2013), что требует более полно установить механизмы, по которым глюкокортикоиды влияют на апоптоз в развивающемся мозге. Действуют ли они по прямому механизму, через изменение транскрипции как про- так и антиапоптозных генов глюкокортикоидными рецепторами, или же они вызывают ПКГ через более сложные не прямые механизмы. Одним из таких не прямых механизмов, с вовлечением нескольких типов клеток, может быть глутаматэргическая эксайтотоксичность: апоптоз нейронов вызванный излишним поступлением ионов  $Ca^{2+}$  в клетку при гиперактивации NMDA и AMPA рецепторов (Gasparini and Griffiths, 2013). Поступающий в нейрон избыточный кальций активирует ряд фосфолипаз, эндонуклеаз и протеаз, которые повреждают клетку, а также приводит к открытию митохондриальных MPT пор, что в свою очередь приводит к высвобождению активных форм кислорода и ряда белков,

индуцирующих апоптоз (Almeida and Bolanos, 2001). Функционирует ли этот механизм, с вовлечением двух связанных нейронных систем, при действии глюкокортикоидов на неонатальный головной мозг остается неясным.

Поскольку наряду с повышенным уровнем глюкокортикоидов на мозг новорожденного действует также и гипоксия, необходимо выяснить, как совместное действие этих двух факторов модулирует процесс ПКГ в неонатальном мозге. Первичное повреждающее действие гипоксии связано с истощением энергетических запасов клетки, после чего активируются транскрипционные факторы семейства NIF, изменяющие экспрессию генов. Взаимодействие гипоксии и активированных глюкокортикоидных рецепторов, которое при этом происходит, как и что происходит с экспрессией основных регуляторов апоптоза и основной протеазы апоптоза каспазы-3 остается во многом неясным.

**Цель исследования.** Целью работы было оценить влияние глюкокортикоидов и гипоксии на программируемую клеточную гибель (ПКГ) путем апоптоза в неонатальном мозге.

**Задачи.**

1. Исследовать экспрессию глюкокортикоидных рецепторов в нейрональных и глиальных клетках в коре, субикулуме и гиппокампе у крысят на третий день жизни.
2. Изучить эффекты гипоксии и глюкокортикоидов на экспрессию активной каспазы-3 в коре головного мозга неонатальных крысят.
3. Исследовать возможное участие глутаматэргической эксайтотоксичности в механизме гибели клеток, вызываемой глюкокортикоидами.

**Научная новизна.** В работе впервые исследована локализация глюкокортикоидных рецепторов в разных типах клеток неонатального мозга. Установлена наибольшая степень колокализации глюкокортикоидных рецепторов (GR) с кальретинином нейронов и наименьшая с GFAP астроглии.

Дексаметазон активирует клетки CA1 гиппокампа, о чем свидетельствует повышение уровня мРНК и белка гена раннего ответа c-fos в первые 1-2ч после введения гормона в этой структуре.

Впервые обнаружено, что дексаметазон вызывает гибель клеток дорзального субикулума через 6 часов после введения. Установлено участие механизма эксайтотоксичности в процессе гибели клеток субикулума при введении глюкокортикоида. Предварительное введение антагониста NMDA глутаматных рецепторов мемантина снижает гибель клеток субикулума, индуцированную дексаметазоном.

В работе впервые обнаружено, что предварительное введение глюкокортикоидов ослабляет повышение уровня активной формы ключевой протеазы апоптоза каспазы-3 в неонатальном кортексе, вызываемое гипоксией. Поэтому, применение дексаметазона перед наступлением реальной гипоксии, несмотря на известные побочные эффекты, может рассматриваться как в определенной мере нейропротективное.

**Теоретическое и практическое значение.** Результаты исследования вносят вклад в понимание механизмов действия глюкокортикоидов на процесс ПКГ в неонатальном мозге и механизмы, по которым оно может быть осуществлено. Полученные в работе данные развивают представления о модуляции процесса ПКГ в неонатальном мозге не только глюкокортикоидными гормонами, но и действием комплексного фактора - гормона и гипоксии.

**Положения выносимые на защиту.**

1. GR в неонатальном мозге наиболее колокализуется с маркером интернейронов – кальретенином, и наименее колокализован с маркером астроцитов – GFAP.
2. Предварительное введение глюкокортикоидов до эпизода гипоксии снижает индуцирующее действие гипоксии на экспрессию каспазы-3 в новой коре.
3. Нейроны гиппокампа активируются после введения глюкокортикоида – дексаметазона.
4. Глюкокортикоиды в короткие сроки (6ч) вызывают гибель клеток дорзального субикулума.
5. В процессе гибели клеток дорзального субикулума, индуцированной DEX, участвует глутаматэргическая эксайтотоксичность. Предварительное введение антагониста NMDA глутаматных рецепторов снижает гибель клеток дорзального субикулума, индуцированной глюкокортикоидом.

**Апробация работы.**

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи, из них 3 из списка ВАК. Материалы диссертации были доложены на конференциях: 4 Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов». Новосибирск, 2009; 9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen 2011; Международная конференция, организуемая ИХБФМ СО РАН «Фундаментальные науки – медицине», Новосибирск 2013; XXII Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова, Волгоград 2013.

### **Структура и объем работы.**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов, изложения результатов работы, их обсуждения, выводов и списка литературы (281 наименование). Работа изложена на 129 страницах, содержит 3 таблицы и иллюстрирована 34 рисунками.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Экспериментальные животные.** В экспериментах использовали крыс линии Wistar, содержащиеся в стандартных условиях вивария ИЦИГ СО РАН: при температуре 22-24 °С, естественном освещении и свободном доступе к воде и корму. День родов считали первым днем жизни крысят. Для определения уровня мРНК методом РТ-ПЦР каждая группа состояла из 10-12 крысят, а при иммуногистохимическом анализе – из 7-8 животных.

**Введение препаратов и воздействие гипоксией.** На третий день жизни крысятам подкожно вводили 0,2 мг/кг дексаметазона в 20-ти мкл физиологического раствора (Dexamethasone phosphate, KRKA, Словения), либо эквивалентный объем физиологического раствора. Часть крысят оставляли без каких-либо инъекций. Через 1, 2, 6 или 120 часов животных декапитировали для получения образцов ткани головного мозга, либо проводили транскардиальную перфузию для иммуногистохимического исследования. Антагонист глутаматных рецепторов мемантин вводили в дозе 5 и 20 мг/кг за два часа до введения дексаметазона, материал забирали через 6 часов после введения дексаметазона. В экспериментах с гипоксией через 4 часа после инъекций дексаметазона у половины животных, из групп с введением DEX и физ. р-ра, вызывали гипоксию, помещая их на 15 минут в атмосферу 100% азота. Половина животных оставалась на воздухе – в условиях нормоксии.

**Выделение образцов ткани мозга.** После декапитации животных из мозга на холоду выделяли гиппокамп и фронтальную кору. Эти образцы ткани сразу помещали в жидкий азот и в дальнейшем использовали для выделения тотальной РНК.

Для иммуногистохимического исследования крысят, наркотизированных авертином, транскардиально перфузировали 25 мл PBS, затем 30мл фиксирующего раствора 4% PFA в PBS. Извлеченный целый мозг постфиксировали ночь в 4% PFA в PBS. Затем мозг промывали трижды по 10 минут в PBS и помещали последовательно на сутки в 15 % и 30 % сахарозу. После чего мозг замораживали при температуре -40° С в изопентане. Срезы мозга (18 мкм) приготавливали на криостате при температуре -23° С и монтировали их на стекла super frost plus.

Границы анатомических структур мозга крысы определяли по атласу (Paxinos, Watson, 1998).

**Иммуногистохимия.** Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга проводили по общепринятой методике (Whiteside and Munglani, 1998) с небольшими модификациями. Срезы высушивали на воздухе в течение ночи. Далее их последовательно промывали 15 мин в PBS и дважды по 15 мин. в PBS с 0.2% Triton X-100 (PBST). Эндогенную пероксидазу блокировали 0.3 % перекисью водорода в метаноле. Затем срезы промывали PBST. Неспецифическое связывание блокировали инкубацией в 1.5% BSA в PBST в течение часа.

Анализируемые белки выявляли, инкубируя срезы мозга с первичными антителами в течение ночи при +4°C, разведенными в PBS, содержащим 1.5 % BSA и 0.2% Triton X-100. Далее срезы промывали дважды по 15 минут в PBS с 0.2% тритоном и инкубировали со вторичными антителами в течение часа при комнатной температуре и затем дважды промывали PBST.

Препараты, меченные флюоресцентными вторичными антителами, заключали в мовиол, содержащий DAPI. Препараты, меченные биотинилированными вторичными антителами, инкубировали час при комнатной температуре со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (Abcam, UK). После промывки срезов PBS пероксидазную активность на препаратах выявляли субстратным раствором, содержащим 5 мг/мл 3,3'-диаминобензидина и 0,03% раствор перекиси водорода в 0.2M трис-буфере pH 7.54. Обезвоженные срезы заключали в бальзам.

**TUNEL-метод.** Фрагментированную ДНК, признак апоптоза, выявляли TUNEL-методом 3'-концевого мечения ников с помощью терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы и dUTP, меченного биотином, используя наборы Roche, согласно протоколу изготовителя.

**Микроскопия.** Гистологические препараты исследовали в световом микроскопе Carl Zeiss "Axioskop" 2 Plus с автоматической камерой AxioCam. Панорамные изображения монтировали с помощью программы Adobe Photoshop. Для колокализационных экспериментов препараты исследовали на конфокальном микроскопе LSM 780 NLO фирмы Carl Zeiss, используя режимы tile scan и Z-stack. Уровень белков определяли по величине оптической плотности клеток, измеренной с помощью программы Fiji (ImageJ).

**Оценка уровня мРНК каспазы-3 и c-fos.** Для синтеза первой цепи кДНК использовали в качестве матрицы выделенную РНК. Количество мРНК каспазы-3 и c-fos определяли методом ПЦР в реальном времени (real-time PCR) с использованием технологии TaqMan на амплификаторе ABI Prism 7000 ("Applied

Biosystems”, США), с использованием наборов TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, США **c-fos**: Rn02396759\_m1, **caspase-3**: Rn00563902\_m1, **beta-actin**: Rn00667869\_m1), согласно протоколу производителя.

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA однофакторным или двухфакторным дисперсионным анализом с последующим post-hoc анализом межгрупповых различий по критерию Фишера LSD.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **Экспрессия глюкокортикоидных рецепторов в мозге неонатальных крысят.**

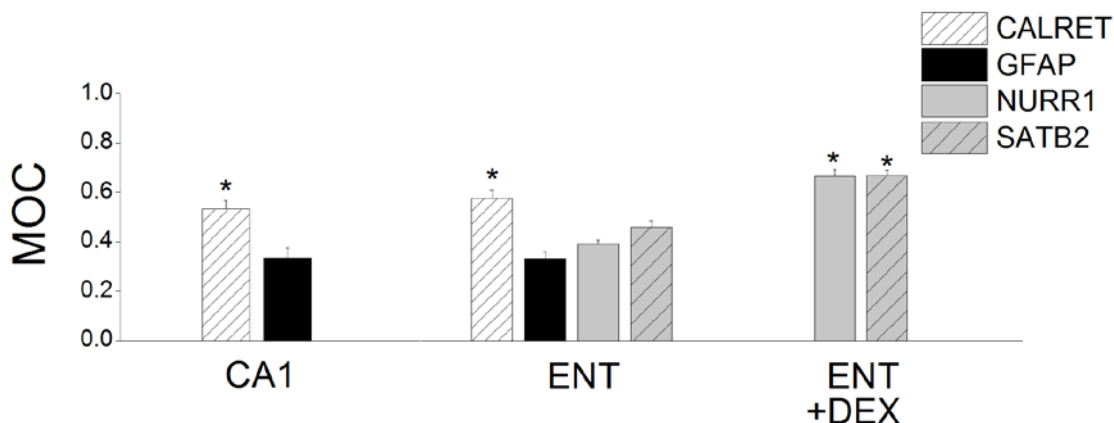
Имеется обширная информация о распределении глюкокортикоидных рецепторов (GR) в структурах и клетках мозга взрослых животных. Вместе с тем, об экспрессии этих рецепторов в неонатальном головном мозге и особенно типах клеток, в которых они присутствуют, сведений существенно меньше. Проведенный в работе анализ, также как и имеющиеся данные литературы свидетельствуют, что глюкокортикоидные рецепторы GR экспрессируются во многих структурах конечного мозга (telencephalon). В пирамидных клетках полей гиппокампа уровень рецепторов значительно выше, чем в остальных структурах. Иммуноокрашивание GR присутствует во 2, 3, 6-м слоях неокортекса и субпластинке.

Для определения ранее неизвестных типов клеток, экспрессирующих глюкокортикоидный рецептор в коре мозга крысят на третий день жизни, была проведена иммунофлуоресцентная колокализация GR со специфическими маркерами: астроцитов - GFAP (Forbes-Lorman et al., 2014), интернейронов – кальретенином (Zuloaga et al., 2011), маркером кортико-кортикальных проекционных нейронов верхних слоев – SATB2 (Baranek et al., 2012), маркером нейронов 6-го слоя и субпластинки – NURR1 (Zetterstrom et al., 1996). Колокализация с GFAP и кальретенином была определена также в области CA1 гиппокампа, в которой наблюдается наивысший уровень глюкокортикоидных рецепторов. (Bae et al., 2009; Perlmann and Wallen-Mackenzie, 2004; Rojas et al., 2010; Zetterstrom et al., 1996).

По коэффициенту перекрытия сигнала Мендерса (МОС) (рис. 1) из исследованных маркеров GR в наибольшей степени колокализован с кальретенином ( $F(5, 18)=11.600, p<0.05$ ), примерно на одном уровне



колокализован с SATB2 и NURR1, и меньше всего с GFAP. Наибольшая степень колокализации GR с кальретенином и наименьшая с GFAP также подтверждались коэффициентами корреляции Пирсона.



*Рис.1* Значение общего коэффициента колокализации Мендерса (MOC) для GR с маркерами типов клеток CALRET – кальретенин, GFAP – кислый астроцитарный белок, NURR1, SATB2 – транскрипционные факторы, специфичные для кортекса. CA1- поле гиппокампа, ENT – энторинальная кора у интактных животных, ENT+DEX – энторинальная кора у животных через 6 часов после введения дексаметазона в дозе 0.2 мг/кг. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с GFAP.

Соотношение колокализации GR с кальретенином и GFAP было сходным как в энторинальной коре, так и в поле CA1 гиппокампа. Невысокий уровень колокализации GR с другими транскрипционными факторами SATB2 и NURR1 может быть связан с тем, что в отсутствие стимуляции гормоном GR имеет в основном цитоплазматическую локализацию (рис. 2). Так, значение коэффициента перекрытия Мендерса (MOC) для SATB2 и NURR1 достоверно выросло и достигало значений этих коэффициентов для кальретенина в энторинальной коре через 6 часов после введения дексаметазона DEX в дозе 0.2 мг/кг. Через 6 часов после введения дексаметазона GR в основном имел ядерную локализацию (рис.3). Таким образом, можно сделать вывод, что из изученных маркеров типов клеток GR в энторинальной коре и CA1 поле гиппокампа на третий день постнатального развития наиболее часто колокализован с маркером кальретениновых интернейронов и в меньшей степени с маркером астроцитов.

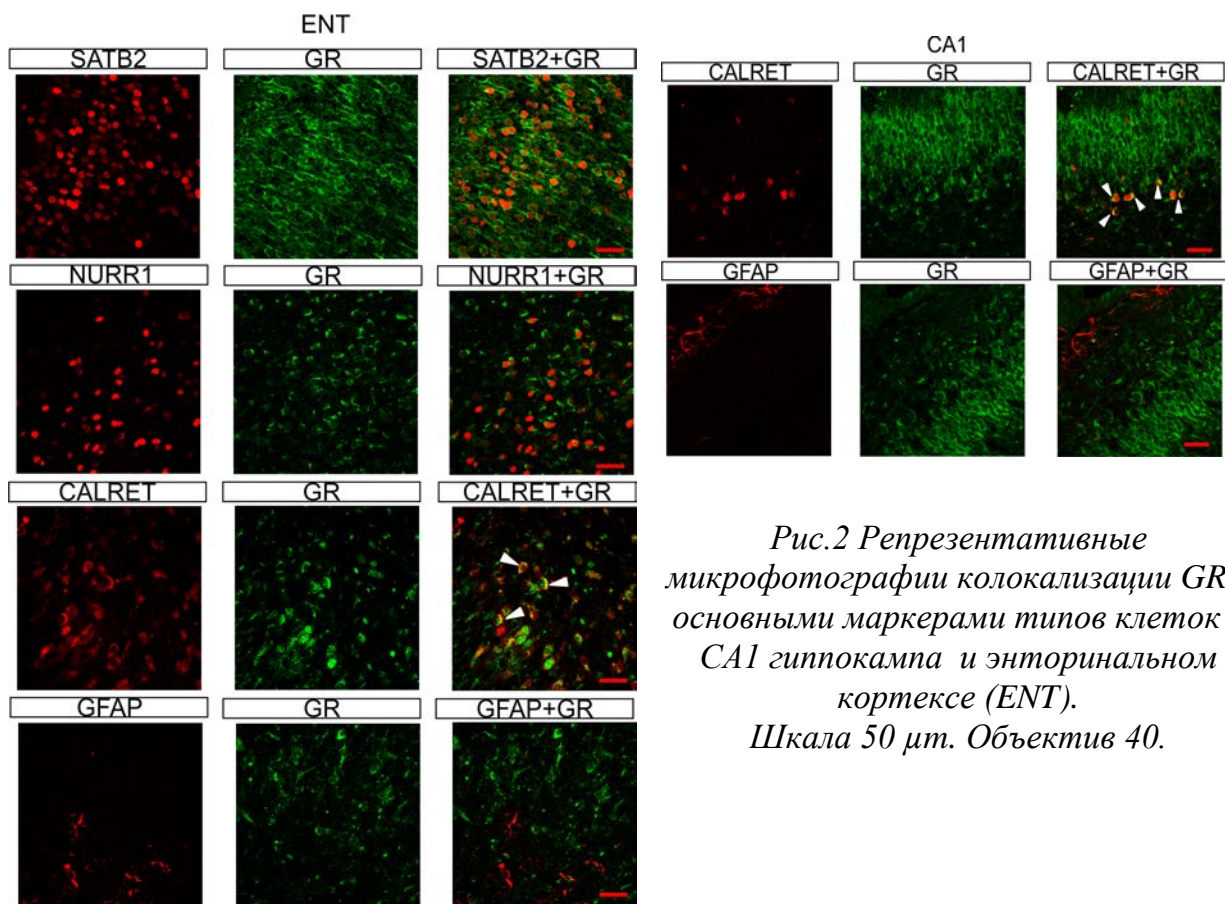


Рис.2 Репрезентативные микрофотографии колокализации GR с основными маркерами типов клеток в CA1 гиппокампа и энторинальном кортексе (ENT). Шкала 50  $\mu$ m. Объектив 40.

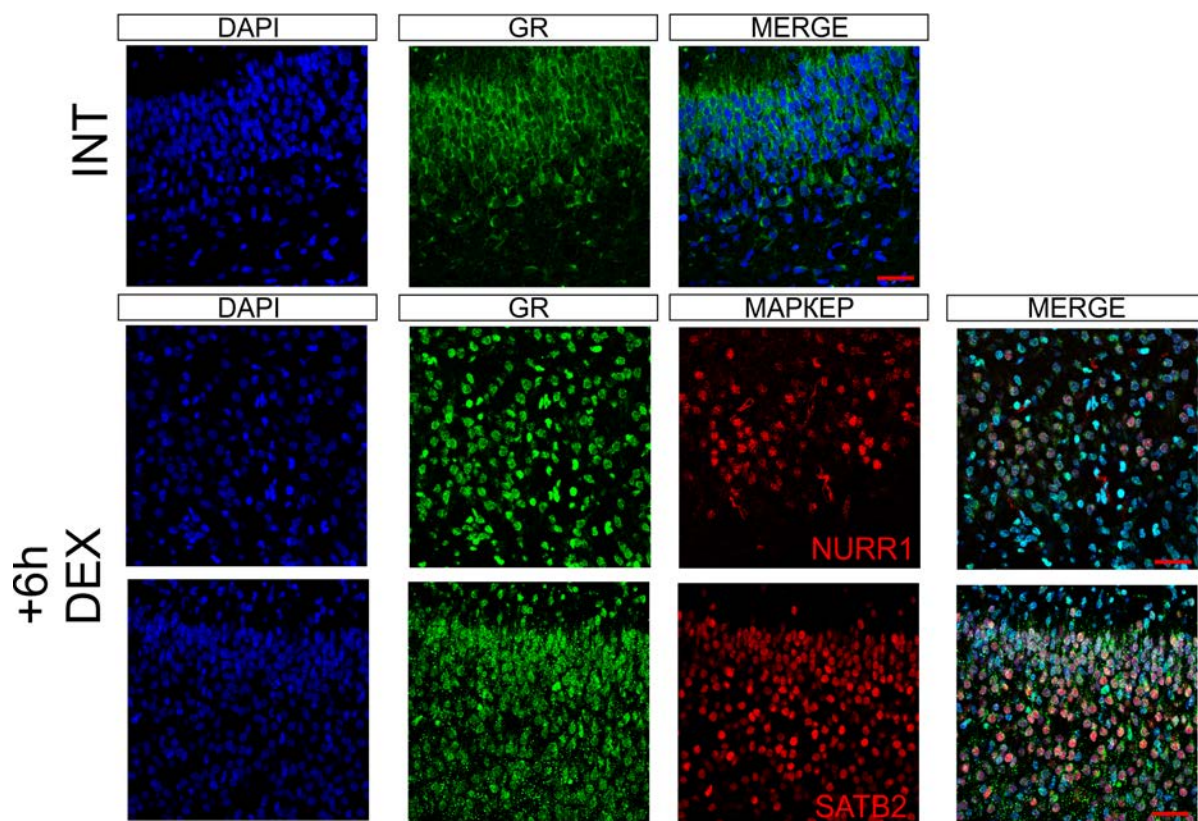


Рис.3 Транслокация глюкокортикоидных рецепторов GR в ядро через бч после введения дексаметазона в энторинальном коре. Показана колокализация с маркерами слоев новой коры SATB2 и NURR1. Шкала 50  $\mu$ m. Объектив 40.

## Экспрессия активной каспазы-3 после введения дексаметазона и гипоксии.

Для исследования как совместного, так и по отдельности действия глюкокортикоидов и гипоксии на процессы ПКГ в неонатальном мозге, мы провели анализ изменения уровня активной каспазы-3 во фронтальном коре через 120 часов после воздействия. Самое значительное повышение этой протеазы апоптоза наблюдалось при гипоксическом воздействии, при действии только гормона уровень активной каспазы-3 также повышался, но не достигал гипоксического значения (рис. 4). Предварительное, до гипоксии, введение дексаметазона снижало уровень активной каспазы-3, достигаемый при действии лишь одной гипоксии. Такой эффект гормона, очевидно, обусловлен взаимодействием активированного гормоном глюкокортикоидного рецептора (GR), являющегося транскрипционным фактором, дифференциально регулирующим экспрессию ряда генов (Polman et al., 2013; Surjit et al., 2011), с индуцируемыми гипоксией транскрипционными факторами (HIF). Без взаимодействия с факторами гипоксии сам по себе гормон вызывал повышение уровня активной каспазы-3.

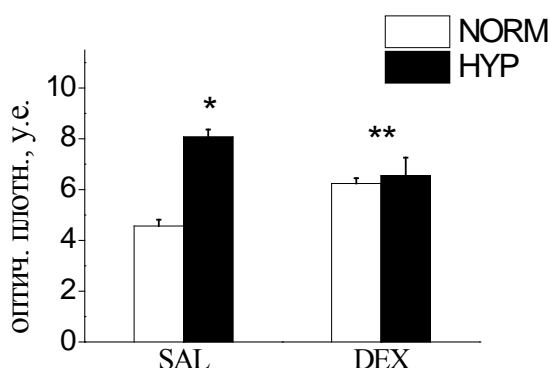


Рис.4 Результаты денситометрии иммуноокрашивания по активной каспазе-3 в неокортексе через 120 часов после введения дексаметазона (DEX) и гипоксии (HYP), NORM – нормоксия. \* -  $p < 0.05$  по сравнению со всеми остальными группами ; \*\* -  $p < 0.05$  по сравнению с группами только с введением физ. р-ра (SAL).

В целом, полученные данные свидетельствуют, что предварительное введение дексаметазона до эпизода гипоксии вызывает снижение уровня активной каспазы-3, индуцируемого в формирующемся головном мозге собственно гипоксией. Таким образом, применение дексаметазона в неонатологии перед наступлением реальной гипоксии, несмотря на известные побочные эффекты (Roberts and Dalziel, 2006), может рассматриваться не как усугубляющее патологию, но, напротив, как в определенной мере нейропротективное. Вместе с тем, применение дексаметазона без достаточно обоснованного ожидания наступления у новорожденного гипоксического состояния – с «профилактической

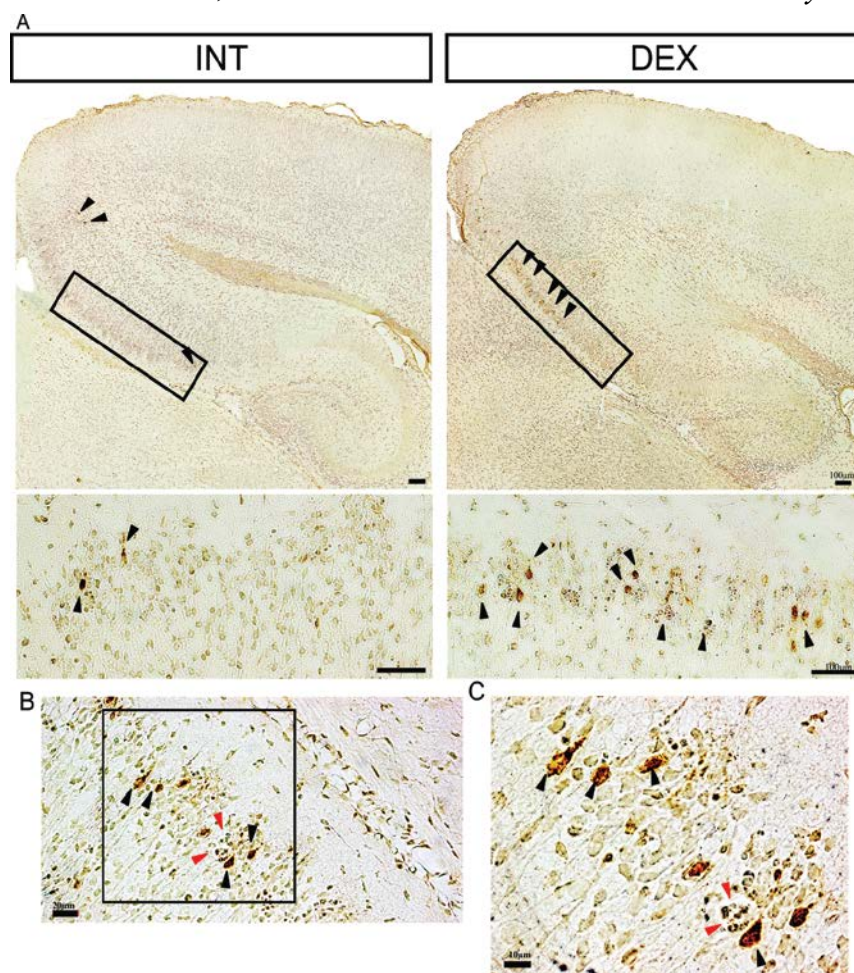


целью» способно активировать гибель клеток его головного мозга и поэтому является нежелательным.

### Апоптоз в дорзальном субикулуме через 6 часов после введения дексаметазона.

Дексаметазон уже через шесть часов после введения достоверно увеличивал в дорзальном субикулуме число апоптозных клеток, иммунопозитивных по активной каспазе-3 (рис. 5), клеток с фрагментированной ДНК (рис. 6), а также клеток с фрагментированными ядрами (рис. 6). Количество гибнущих клеток в дорзальном субикулуме через 6 часов после введения глюкокортикоида достоверно и существенно возросло по всем трем показателям апоптоза (для активной каспазы -  $F(2, 9)=12.019$ ,  $p<0.05$ , рис. 7А; для TUNEL -  $F(2,9)=30.091$ ,  $p<0.05$ , рис. 7В; для фрагментированных ядер -  $F(2, 9)=28.803$ ,  $p<0.05$ , рис. 7С).

Рис.5 Клетки, позитивные по активной каспазе-3 в субикулуме через 6ч после введения DEX



А. Репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания по активной каспазе-3 у групп с введением дексаметазона - DEX и интактных животных INT. Область субикулума, выделенная черным прямоугольником, представлена в увеличенном варианте ниже. Шкала 100µт.  
В. Объектив 40. Животное с введением DEX. Черными стрелками указаны клетки позитивные по активной каспазе-3, красными стрелками – клеточный мусор. Шкала 20µт  
С. Регион, выделенный

прямоугольником на рисунке В. Объектив 100. Животное с введением DEX. Черными стрелками указаны клетки позитивные по активной каспазе-3, красными стрелками – клеточный мусор. Шкала 10µт.

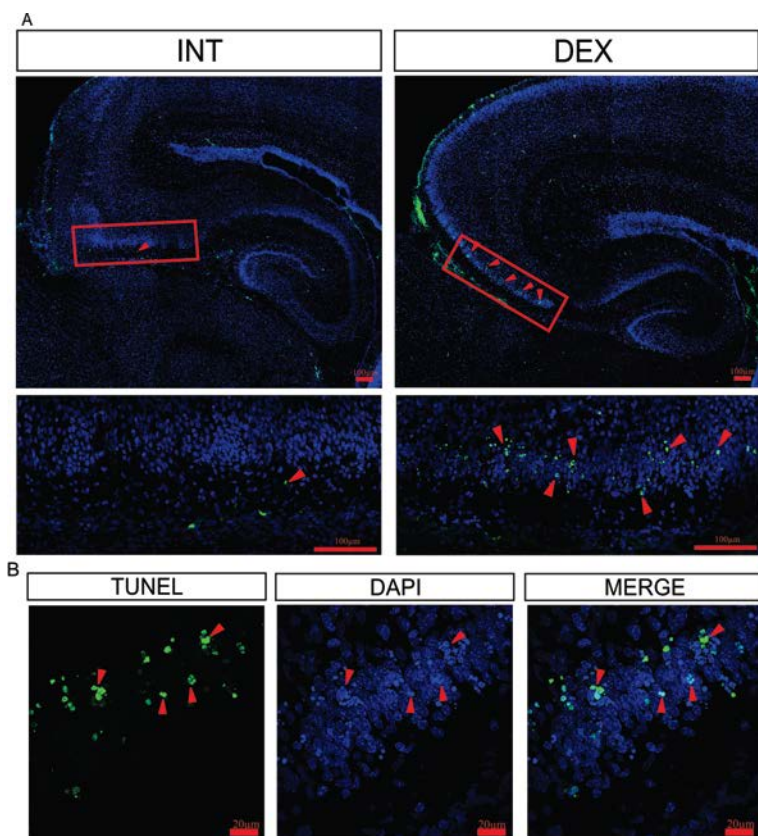


Рис.6 TUNEL позитивные клетки в субикулуме через бч после введения DEX

А. Репрезентативные микрофотографии TUNEL в группе с введением дексаметазона-DEX и интактных- INT животных. Область субикулума, выделенная красным прямоугольником, представлена в увеличенном варианте ниже. Шкала 100 мк. Красными стрелками показаны TUNEL-позитивные клетки.

В. Объектив 63. Животное с введением DEX. Проекция максимальной интенсивности конфокального изображения. Красными стрелками указаны

фрагментированные ядра, также положительные по реакции TUNEL (зеленый). Шкала 10 мк.

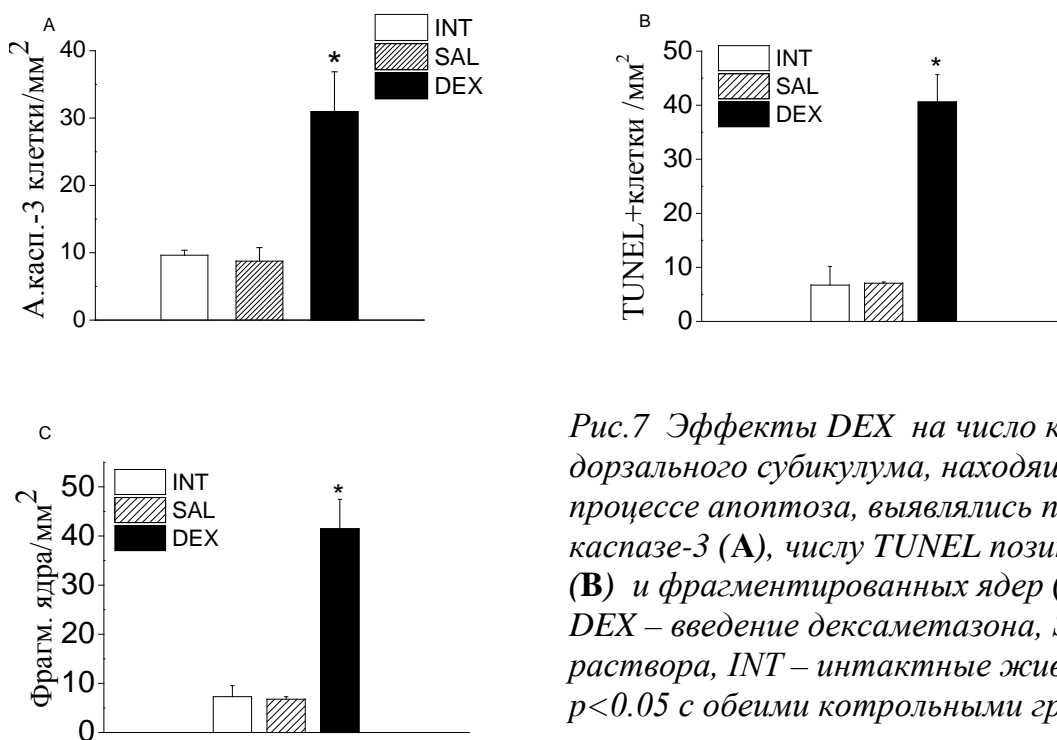


Рис.7 Эффекты DEX на число клеток дорзального субикулума, находящихся в процессе апоптоза, выявлялись по активной каспазе-3 (А), числу TUNEL позитивных ядер (В) и фрагментированных ядер (С) DEX – введение дексаметазона, SAL – физ. раствора, INT – интактные животные. \*-  $p < 0.05$  с обеими контрольными группами.

## Экспрессия гена раннего ответа c-fos в первые часы после введения гормона.

Наблюдаемое в субикулуме повышение числа клеток, положительных по активной каспазе-3, TUNEL-позитивных и фрагментированных ядер говорит об увеличении ПКГ в этой структуре после острого (6ч) введения дексаметазона. На основании того, что субикулум получает мощную иннервацию из СА1 гиппокампа (O'Mara, 2005; O'Mara et al., 2001), и глюкокортикоиды повышают уровень глутамата в гиппокампе *in vivo* (Abraham et al., 1996), а также повышают уровни внутриклеточного кальция и цинка в клетках переживающих срезов этой структуры мозга (Takeda et al., 2012), нами была предложена гипотеза смерти нейронов из-за эксайтотоксичности. Дексаметазон возбуждает нейроны гиппокампа и вызывает высвобождение из извилины СА1 в субикулум глутамата, который, в свою очередь, и вызывает обнаруженную нами гибель клеток. Чтобы удостовериться активируются ли нейроны гиппокампа после введения глюкокортикоидов, в работе мы использовали изменение экспрессии гена раннего ответа c-fos. Даже 5-ти минутный стимул достаточен для индукции экспрессии c-fos (Kornhauser et al., 1990). Максимальный уровень мРНК c-fos наблюдается через 1-2 часа после воздействия (Hansson and Fuxe, 2008). Так, мРНК c-fos возрастала в гиппокампе уже через 30 минут после введения дексаметазона и имела максимум через час после введения  $F(2, 32)=20.1189$ ,  $p<0.05$  и немного снижалось по истечении двух часов (рис. 8).

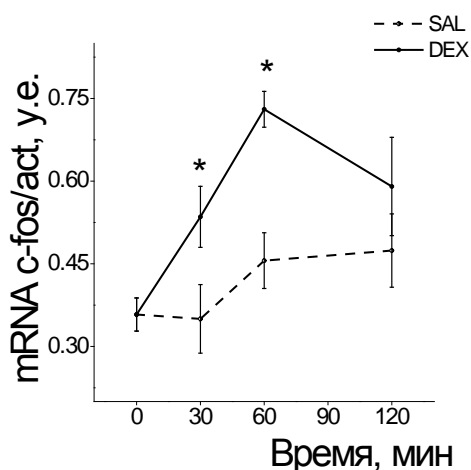


Рис.8 Уровень мРНК c-fos в гиппокампе через 30мин, 1ч и 2ч после введения дексаметазона – DEX, физ. р-ра –SAL и у интактных животных – время 0. \*,\*\* -  $p<0.05$  с контролем (SAL).

Для выяснения типов клеток, активируемых через час после введения дексаметазона, мы провели двойное иммуноокрашивание c-fos с нейрональным маркером MAP2 и астроцитарным маркером GFAP (рис. 9). Через час после введения дексаметазона активировались нейроны СА1 поля гиппокампа, а не астроциты (рис. 9). Активация нейронов от введения синтетического



глюкокортикоида DEX коррелировала с экспрессией GR в гиппокампе, с наибольшим уровнем в CA1 (рис. 9А). Активация глутаматэргических нейронов CA1 гиппокампа после введения DEX может приводить к повышению внеклеточного глутамата в субикулуле, и в итоге клетки в нем гибнут от эксайтотоксичности.

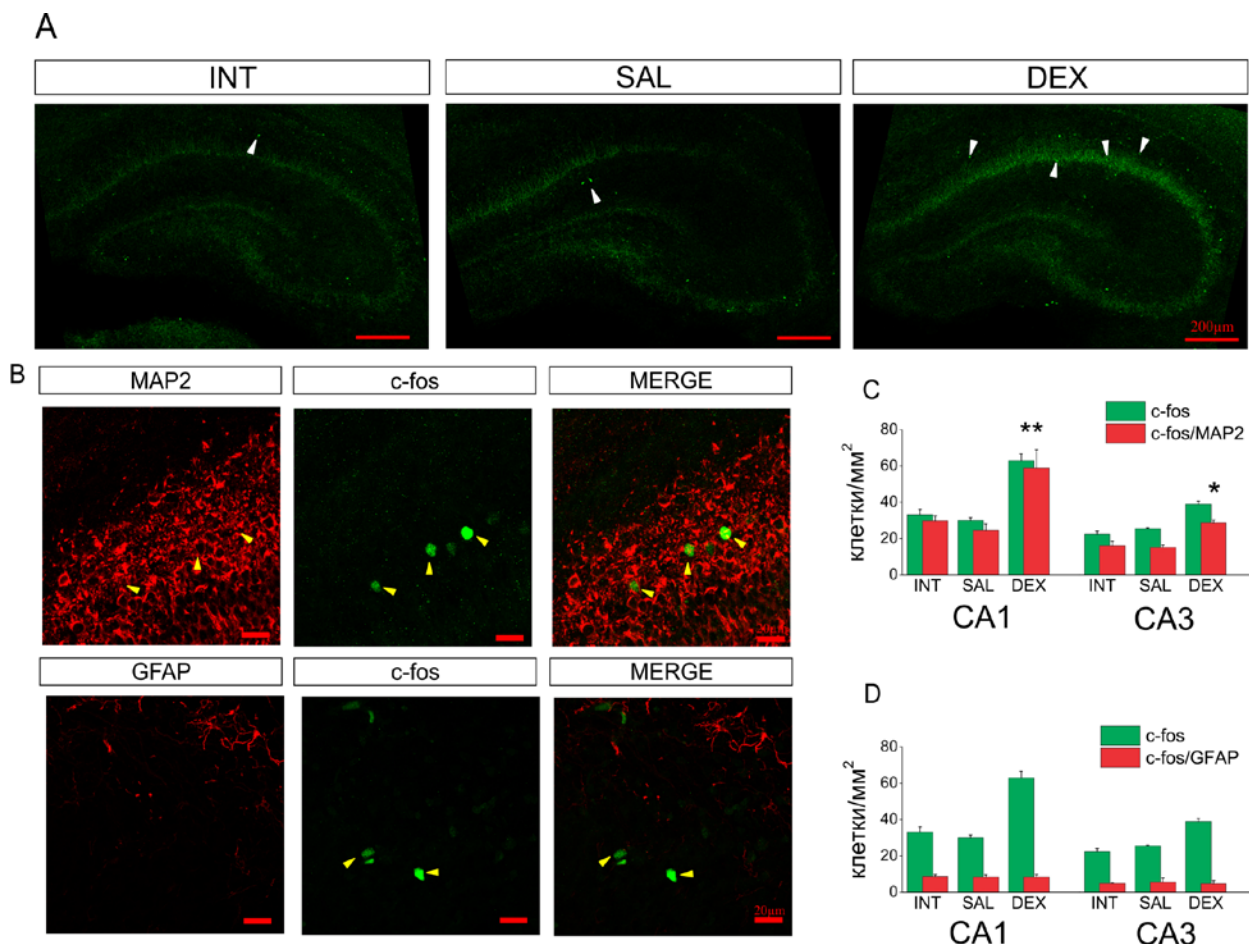


Рис.9 А. Репрезентативные панорамные микрофотографии иммуноокрашивания по *c-fos* в гиппокампе у интактных животных (INT) и через 1 час после введения физиологического раствора (SAL) или дексаметазона (DEX). Шкала 200 μm. Стрелками отмечены *c-fos* позитивные ядра. В. Объектив 63. Двойное иммуноокрашивание по *c-fos* с маркером нейронов MAP2 или астроцитов GFAP в поле CA1 гиппокампа у животных через час после введения дексаметазона. Шкала 20 μm. Стрелками отмечены *c-fos* позитивные ядра. С. Результаты подсчета *c-fos* и MAP2 позитивных ядер по полям гиппокампа \*\*, \* -  $p < 0.05$  с обоими контролями. D. Результаты подсчета *c-fos* и GFAP позитивных ядер по полям гиппокампа.

## Количество апоптозных клеток в дорзальном субикулуле после введения дексаметазона и предварительного введения антагониста NMDA глутаматных рецепторов- мемантина.

Для проверки предположения о вкладе эксайтотоксичности, вызванной глутаматом, нами были проведены эксперименты с предварительным введением антагониста NMDA глутаматных рецепторов – мемантином. Этот антагонист, в отличие от другого антагониста NMDA рецепторов МК-801 (Manning et al., 2011), в использованных дозах сам по себе не является апоптогенным, что позволяет установить опосредован ли индуцированный глюкокортикоидом апоптоз глутаматэргической эксайтотоксичностью. В результате предварительное введение антагониста достоверно и дозозависимо снижало количество апоптозных клеток в дорзальном субикулуле.

Дозозависимо уменьшалось как число клеток позитивных по активной каспазе-3 рис.10А, так и количество TUNEL-позитивных клеток (рис. 10В). Таким образом, наблюдаемая нами гибель клеток дорзального субикулула может быть следствием эксайтотоксичности от глутамата CA1 гиппокампа, высвобождаемого после введения дексаметазона, так как предварительное введение антагониста NMDA рецепторов уменьшает число гибнущих клеток в этой структуре мозга.

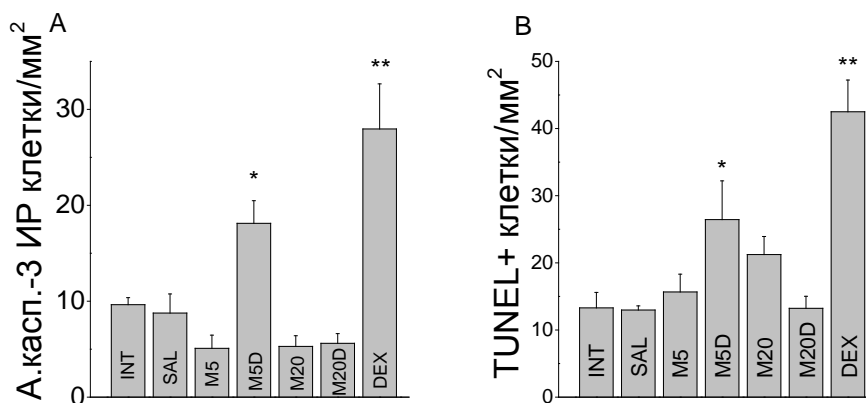


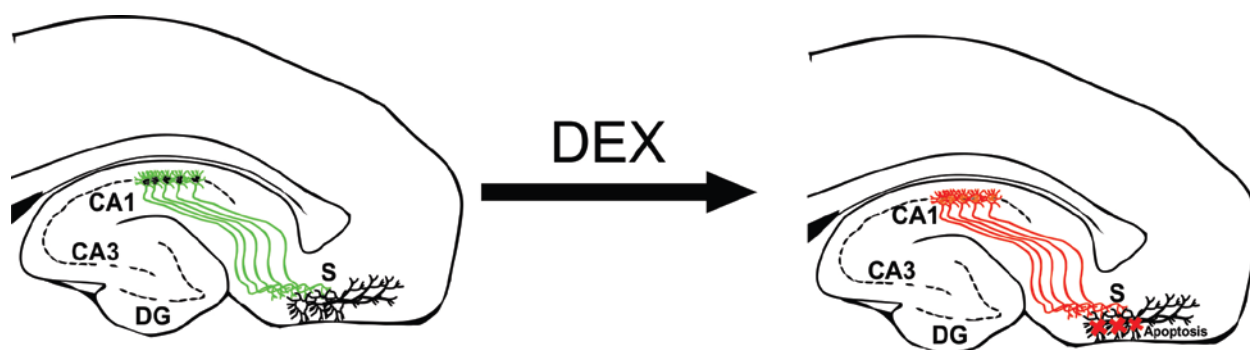
Рис. 10 Результаты подсчета клеток, позитивных по активной каспазе-3 (А) и по реакции TUNEL (В) в дорзальном субикулуле через 6 часов после введения дексаметазона -DEX, физ. р-ра – SAL, и предварительного введения мемантина в дозе 5мг\кг-M5 и 20 мг\кг – M20, и совместного введения мемантина и дексаметазона – M5DEX и M20DEX. \*,\*\* -  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

Обобщая, дексаметазон вызывал достоверное увеличение числа клеток позитивных по маркерам апоптоза в дорзальном субикулуле уже через шесть часов



после введения. В нашей работе эти клетки выявлялись с помощью иммуноокрашивания по активной-каспазе-3, мечения фрагментации ДНК *in situ* – TUNEL и оценке фрагментированных ядер по окраске DAPI. Количество клеток, находящихся в процессе апоптоза в дорзальном субикулуме через 6 часов после введения глюкокортикоидов, достоверно и существенно возросло согласно всем маркерам этого процесса, использованным в работе.

На основании этих результатов, а также учитывая, что субикулум получает мощную иннервацию из CA1 гиппокампа (O'Mara et al., 2001; O'Mara, 2005) и глюкокортикоиды повышают уровень глутамата в гиппокампе *in vivo* (Abraham et al., 1996), а также повышают уровни внутриклеточного кальция и цинка в клетках переживающих срезов этой структуры мозга (Takeda et al., 2012), нами предложено объяснение гибели этих нейронов по механизму эксайтотоксичности (Рис.11). Согласно этому механизму, дексаметазон возбуждает нейроны гиппокампа и вызывает высвобождение из аксонов клеток поля CA1 в субикулум глутамата, который, в свою очередь, вызывает гибель клеток этой структуры мозга (Рис.11).



*Рис.11 Введение дексаметазона возбуждает нейроны гиппокампа и приводит к высвобождению глутамата в субикулум, что в свою очередь приводит к гибели его клеток из-за глутаматэргической эксайтотоксичности.*

Таким образом, нами впервые показано, что в мозге крысят на третий день глюкокортикоидные рецепторы наиболее колокализуются с маркером интернейронов кальретенином и наименее колокализуются с маркером астроцитов GFAP. Установлено влияние как повышенного уровня глюкокортикоидов, так и гипоксии на ПКГ неонатальной новой коры. Также в ходе работы впервые показана активация нейронов гиппокампа в первые два часа после введения DEX. Впервые

идентифицировано участие глутаматэргической эксайтотоксичности, в процессе гибели клеток дорзального субикулума, индуцированной дексаметазоном.

## ВЫВОДЫ

1. В энторинальной коре и гиппокампе крысят на третий день жизни глюкокортикоидные рецепторы наиболее колокализуются с маркером субпопуляции интернейронов – кальретенином и наименее колокализуются с маркером астроцитов GFAP.

2. И гипоксия, и глюкокортикоиды вызывают повышение уровня активной каспазы-3 в неокортексе через 120 часов после воздействия. Однако предварительное введение дексаметазона до эпизода гипоксии достоверно ослабляет повышение уровня активной каспазы-3, индуцируемое собственно гипоксией.

3. Введение дексаметазона вызывает активацию нейронов гиппокампа в первые два часа после введения DEX.

4. Введение глюкокортикоида дексаметазона на третий день жизни приводит к увеличению апоптоза в дорзальном субикулуме уже через 6 часов.

5. В процессе гибели клеток дорзального субикулума, индуцированной DEX, участвует глутаматэргическая эксайтотоксичность.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из списка ВАК

1. **Ланшаков Д.А.**, Бульгина В.В., Романова И.В., Дыгало Н.Н. Иммуногистохимический анализ экспрессии активной каспазы-3 в структурах неонатального головного мозга. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2009. — Т. 147. — Вып. 5 — стр. 567-570.
2. Baranek C., Dittrich M., Parthasarathy S., Bonnon C.G., Britanova O., **Lanshakov D.**, Boukhtouche F., Sommer J.E., Colmenares C., Tarabykin V., Atanasoski S. Protooncogene Ski cooperates with the chromatin-remodeling factor Satb2 in specifying callosal neurons. // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2012. — Vol. 109. — N 9. — p. 3546-3551.
3. **Ланшаков Д.А.**, Дыгало Н.Н. Иммуногистохимический анализ эффектов гипоксии и дексаметазона на уровень активной каспазы-3 в коре неонатального головного мозга. // Вестник НГУ. Серия биология, клиническая медицина. 2013. Т. 11. Вып. 4. С. 50–55.

Статьи:

4. Дыгало Н.Н., Калинина Т.С., **Ланшаков Д.А.**, Меньшанов П.Н., Шишкина Г.Т. Воздействие адренергическими препаратами на экспрессию белков апоптоза в мозге с целью предотвращения нейродегенерации. В сб.: Фундаментальные науки – медицине. Новосибирск, Арта, 2008, стр. 124-128

Тезисы:

5. **Ланшаков Д.А.** Эффекты гипоксии и глюкокортикоидов на экспрессию каспазы-3 в мозге неонатальных крыс. // Материалы XLVI Международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс" г. Новосибирск, 2008 г.
6. Дыгало Н.Н., Калинина Т.С., **Ланшаков Д.А.**, Меньшанов П.Н., Шишкина Г.Т. Воздействие адренергическими препаратами на экспрессию белков апоптоза в

- мозге с целью предотвращения нейродегенерации.// Сборник тезисов ежегодной научной конференции «Фундаментальные науки – медицине» и научно-практической конференции «Новые материалы и методы для медицины», Новосибирск, ИХБ и ФМ СО РАН, 2008, стр. 36.
7. Музыка В.В., **Ланшаков Д.А.** Эффекты глюкокортикоидов на экспрессию каспазы-3 в формирующемся головном мозге. // Материалы XLVII Международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс" г.Новосибирск, 2009 г.
  8. **Ланшаков Д.А.**, Калинина Т.С., Меньшанов П.Н., Дыгало Н.Н. Апоптоз в мозге и двигательная активность неонатальных крыс после введения глюкокортикоидов на фоне гипоксии. /Материалы 4 всероссийской конф. «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов», Новосибирск, 2009, стр.125.
  9. **Ланшаков Д.А.**, Меньшанов П.Н., Калинина Т.С., Дыгало Н.Н. Эффекты глюкокортикоидов и гипоксии на локомоторную активность и экспрессию каспазы-3 в мозге неонатальных крысят.// Материалы VII Всеросс. конф. с междунар. участием «Механизмы функционирования висцеральных систем», 2009, Санкт-Петербург, стр.242.
  10. Баннова А.В., Меньшанов П.Н., **Ланшаков Д.А.**, Калинина Т.С., Булыгина В.В., Шишкина Г.Т., Дыгало Н.Н. Эффекты нейролептика LiCl и глюкокортикоидов на психомоторное развитие и головной мозг неонатальных крысят. // Сборник тезисов научной конференции «Фундаментальные науки – медицине: актуальные проблемы молекулярной медицины», посвященной 10-летию Медицинского факультета НГУ. Новосибирск, издательство ИХФБМ: 2013, стр. 20-21.
  11. Калинина Т.С., Сухарева Е.В., Булыгина В.В., **Ланшаков Д.А.**, Дыгало Н.Н. Механизм программирующего действия глюкокортикоидов на экспрессию тирозингидроксилазы головного мозга в онтогенезе. // Материалы XXII Съезда физиологов России, Волгоград 16-20 сентября 2013 г., стр. 208.
  12. Булыгина В.В., Калинина Т.С., **Ланшаков Д.А.**, Меньшанов П.Н., Дыгало Н.Н. Влияние глюкокортикоидов и гипоксии на поведение неонатальных крысят и экспрессию ключевых белков апоптоза в развивающемся мозге.// Материалы XXII Съезда физиологов России, Волгоград 16-20 сентября 2013 г., стр. 82-83.
  13. **Ланшаков Д.А.**, Калинина Т.С., Булыгина В.В., Дыгало Н.Н. Дексаметазон индуцирует гибель клеток дорзального субикулула в мозге 3-х дневных крысят.// Материалы XXII Съезда физиологов России, Волгоград 16-20 сентября 2013 г., стр. 291.
  14. Bulygina V., Kalinina T., **Lanshakov D.**, Menshanov P., Dygalo N. Effects of dexamethasone and hypoxia on apoptosis in the cerebellum and behavior in neonatal rats.// FENS Featured Regional Meeting, 11–14 September 2013, Prague, Czech Republic, p. 243
  15. Сухарева Е.В., **Ланшаков Д.А.** Роль соотношения белков Jun/Fos для проявления глюкокортикоидной индукции тирозингидроксилазы мозга в раннем онтогенезе. XXI Международная Научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Тезисы докладов. //М.: Издательство Московского университета. – 2014. – С.276-277.
  16. Kalinina T.S., Sukhareva E.V., Bulygina V.V., **Lanshakov D.A.**, Dygalo N.N. The ratio of jun/ fos determines the ability of dexamethasone to induce of tyrosine hydroxylase expression in the neonatal rat brain. // 9<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience, 5-9 July, Milan, Italy, 2014, Abstract Number: FENS-0906 - Poster Board Number: E012.
  17. V. Bulygina, T. Kalinina, **D. Lanshakov**, P. Menshanov, N. Dygalo. Brain expression of neuroplasticity-related proteins and behavior in neonatal rats: effects of dexamethasone and hypoxia. // 9<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience, 5-9 July, Milan, Italy, 2014, Abstract Number: FENS-0915 - Poster Board Number: E002

Подписано к печати  
Формат бумаги 60 x 90 1/16 Печ. л. 1. Уч. изд. л. 0,7  
Тираж 120 экз. Заказ №

---