

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего профессионального  
образования  
«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
(НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ, НГУ)

На правах рукописи

**Ланшаков Дмитрий Александрович**

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

*03.03.01 - физиология*

диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
д.б.н., член-корр. РАН Дыгало Н. Н.

**Новосибирск – 2014**

## Оглавление

Оглавление .....	2
Список сокращений .....	4
Введение.....	6
Глава 1. Обзор литературы.....	12
1.1 Глюкокортикоиды и их влияние на развитие организма. ....	12
1.1.1 Рецепторы глюкокортикоидов.....	12
1.1.2 Экспрессия глюкокортикоидных рецепторов в головном мозге.....	18
1.1.3 Генетические модели для изучения функции глюкокортикоидных рецепторов.....	19
1.1.4 Влияние глюкокортикоидов на развитие головного мозга. ....	22
1.2 Апоптоз и его роль в развитии организма. ....	23
1.3 Особенности некроза, аутофагии и апоптоза.....	26
1.3.1 Некроз .....	26
1.3.2 Аутофагия .....	28
1.3.3 Апоптоз.....	31
1.3.4 Молекулярные механизмы апоптоза .....	32
1.3.5 Основные пути запуска апоптоза. ....	38
1.3.6 Апоптоз в развивающейся ЦНС.....	39
1.3.7 Участие каспазы-3 и ВНЗ белков в синаптической пластичности. ....	40
1.3.8 Другие формы клеточной гибели. ....	41
1.4 Клеточная гибель в результате эксайтотоксичности.....	43
1.4.1 Рецепторы глутамата.....	43
1.4.2 Смешанные формы клеточной гибели при эксайтотоксичности.....	45
1.4.3 Роль внутриклеточного баланса ионов в механизме эксайтотоксичной гибели клеток. .....	46
1.4.4 Роль митохондрий в эксайтотоксической гибели клеток. ....	47
1.4.5 Эндоплазматический ретикулум и эксайтотоксичность.....	48
1.4.6 Роль лизосом в эксайтотоксической гибели клеток. ....	49
1.5 Влияние глюкокортикоидов на апоптоз.....	50
1.6 Гипоксия и глюкокортикоиды. ....	53
1.6.1 Транскрипционные факторы индуцируемые гипоксией HIF. ....	53
1.6.2 Гипоксия и глюкокортикоиды.....	54
Глава 2. Материалы и методы.....	56
2.1 Экспериментальные животные. ....	56
2.2 Введение препаратов и воздействие гипоксией .....	56
2.3 Выделение образцов ткани мозга и приготовление его срезов для гистологического анализа.....	57
2.4 Окраска по Ниссля. ....	57
2.5 Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга.....	58

2.6 TUNEL-метод.....	60
2.8 Микроскопия.....	60
2.7 Выделение РНК.....	61
2.8 Оценка уровня мРНК каспазы-3 и c-fos методом ПЦР-РВ.....	61
2.9 Иммуноблот.....	62
2.10 Статистическая обработка результатов.....	63
Глава 3. Результаты.....	64
3.1 Экспрессия глюкокортикоидных рецепторов в мозге неонатальных крысят.....	64
3.2 Влияние дексаметазона и гипоксии на общее развитие и морфологию головного мозга.....	72
3.2.1 Вес тела после введения дексаметазона и гипоксии.....	72
3.2.2 Морфология мозга после введения дексаметазона.....	73
3.3 Влияние дексаметазона и гипоксии на апоптоз клеток головного мозга.....	76
3.3.1 Морфология мозга после введения дексаметазона и эпизода гипоксии.....	76
3.3.2 Экспрессия активной каспазы-3 после введения дексаметазона и гипоксии через 120 часов после воздействия.....	77
3.4 Острое действие глюкокортикоидов на активность клеток гиппокампа и апоптоз клеток дорзального субикулума.....	80
3.4.1 Экспрессия каспазы-3 в гиппокампальной формации через 6ч. после введения дексаметазона.....	80
3.4.2 Количество клеток позитивных по реакции на фрагментированную ДНК (TUNEL) в дорзальном субикулуме через 6ч. после введения дексаметазона.....	82
3.4.3 Экспрессия каспазы-3 в неокортексе через 6ч. после введения дексаметазона.....	84
3.4.4 Экспрессия гена раннего ответа c-fos в первые часы после введения гормона.....	87
3.5 Влияние блокады рецепторов глутамата на индуцируемую дексаметазоном гибель клеток субикулума.....	91
3.5.1 Количество клеток позитивных по активной каспазе-3 в дорзальном субикулуме через 6ч. после введения дексаметазона и антагониста глутаматных рецепторов мемантина.....	91
3.5.2 Количество клеток позитивных по реакции TUNEL в дорзальном субикулуме через 6ч. после введения дексаметазона и антагониста глутаматных рецепторов мемантина.....	94
Глава 4. Обсуждение.....	97
ВЫВОДЫ.....	108
Библиография.....	109

## Список сокращений

- 3-МА — 3-Метиладенин
- АКТГ — адренкортикотропный гормон.
- БЛД — бронхолёгочная дисплазия
- ГГНС – гипоталамо гипофизарно надпочечниковая система
- ДЦП — детский церебральный паралич
- ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.
- ПКГ — программируемая клеточная гибель.
- аПКГ — аутофагическая программируемая клеточная гибель.
- РДС — респираторный дистресс синдром
- ЦНС — центральная нервная система
- ЭР — Эндоплазматический ретикулум
- Araf (**A**popotic **p**rotease-**a**ctivating **f**actor) — апоптозный протеазо-активирующий фактор.
- АМРА рецептор — рецептор  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты
- Bax (**B**cl-2-associated **x** protein) — Bcl-2-ассоциированный x белок.
- Bcl (**B**-Cell **L**ymphoma) — В-клеточная лимфома.
- Bcl-X<sub>L</sub> (**B**cl-2 **X**-linked protein) — Bcl-2 X-связанный белок.
- ВН домен (**B**cl-2 **H**omology) — домен Bcl-2 гомологии.
- СА (**C**ornu **A**mmonis) — Аммонов рог
- CAD (**C**aspase-**A**ctivated **D**Nase) — каспазо-активируемая ДНКаза.
- CARD (**C**aspase-**A**ssociated **R**ecruitment **D**omain) — каспазо-ассоциированный домен взаимодействия.
- CED ген (**C**aenorhabditis **E**legans **D**eath) — ген гибели Caenorhabditis elegans.
- DBD (**D**N**A** **B**inding **D**omain) — ДНК-связывающий домен.
- DED (**D**eath **E**ffector **D**omain) — домен эффектора гибели.
- DEX (**D**examethasone) — дексаметазон
- E\_дата
- GFAP (**G**lial **F**ibrillary **A**cidic **P**rotein) — глиальный фибриллярный кислый белок
- GR (**G**lucocorticoid **R**ecceptor) — глюкокортикоидный рецептор.
- GRE (**G**lucocorticoid **R**esponse **E**lement) — глюкокортикоид-респонсивный элемент.
- HIF (**H**ypoxia **I**nducible **F**actors) транскрипционные факторы, индуцируемые гипоксией
- HRE (**H**ypoxia **R**esponse **E**lement) гипоксия респонсивные элементы
- IAP (**I**nhibitor of **A**poposis **P**rotein) — белки-ингибиторы апоптоза.



ICAD (**I**nhibitor of **C**aspase-**A**ctivated **D**Nase) — ингибитор каспазо-активируемой ДНКазы.

INT (**I**ntact) Интактные

IPCs (**I**ntermediate **P**rogenitors **C**ells) интермедиальные клетки предшественники

LBD (**L**igand **B**inding **D**omain) — лиганд-связывающий домен.

MR (**M**ineralcorticoid **R**eceptor) — минералкортикоидный рецептор.

NCX (**N**a<sup>+</sup>/**C**a<sup>2+</sup> **e**Xchanger) — Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> обменник

NMDA рецептор (**N**-**M**ethyl-**D**-**A**spartate Receptor) — N-метил-D-аспаратат рецептор

NSPC's (**N**eural **S**tem and **P**rogenitor **C**ells) — нейральные стволовые и клетки предшественники

NPC (**N**eural **P**rogenitor **C**ell) — нейральные клетки предшественники

P\_день — Постнатальный\_день жизни

PMCA(**P**lasma **M**embrane **C**a<sup>2+</sup> **A**Tase) — плазматический мембранный кальциевый насос

PVN (**P**ara**V**entricular **N**ucleus) — Паравентрикулярное ядро гипоталамуса

ROS (**R**eactive **O**xxygen **S**pecies) — Активные формы кислорода

SAL (**S**aline) — Физиологический раствор

SVZ (**S**ub**V**entricular **Z**one) — Субвентрикулярная зона

TM домен (**T**rans**M**embrane) — трансмембранный домен.

TUNEL (**T**erminal dUTP **N**ick **E**nd **L**abeling) — концевое мечение фрагментированной ДНК

RGC (**R**adial **G**lial **C**ells) — Клетки радиальной глии

VZ (**V**entricular **Z**one) — Вентрикулярная зона

β-актин — бета-актин.

## **Введение**

---

### 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 - РДС) при их преждевременном наступлении. В настоящее время препараты глюкокортикоидов широко используют в перинатальной медицине, эта терапия направлена на интенсификацию образования сурфактанта легкими новорожденного (Roberts, Dalziel, 2006; Halliday et al., 2009a, b). Несмотря на свою неоспоримую эффективность по жизненным показателям, глюкокортикоидная терапия имеет негативные последствия для дальнейшего развития новорожденных и их психического состояния (Whitelaw, Thoresen, 2000). На животных моделях перинатальное применение глюкокортикоидов приводит к возрастанию тревожности, нарушению полового поведения, нарушению функционирования ГГНС и ухудшению памяти во взрослом возрасте (Holson et al., 1995; Hossain et al., 2008; Nagano et al., 2008). 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 оценка на какие типы клеток ЦНС глюкокортикоиды оказывают своё действие на ПКГ в них в большей степени.

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 неонатальном мозге. Действуют ли они по прямому механизму, через изменение транскрипции как про- так и антиапоптозных генов активированными 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, Griffiths, 2013). Поступающий в нейрон избыточный кальций активирует ряд фосфолипаз, эндонуклеаз и протеаз, которые повреждают клетку. Избыточный уровень ионов  $Ca^{2+}$  также приводит к открытию пор в митохондриях, что в свою очередь вызывает высвобождение активных форм кислорода и ряда других белков, индуцирующих апоптоз (Almeida, Bolanos, 2001). Функционирует ли этот механизм, с вовлечением двух связанных нейронных систем, при действии глюкокортикоидов на неонатальный головной мозг остается неясным.

Вместе с тем, как было сказано выше, наряду с повышенным уровнем глюкокортикоидов на мозг новорожденного действует также и гипоксия. Как совместное действие этих двух факторов модулирует процесс ПКГ в неонатальном мозге остаётся не до конца понятным и открытым. Первичное повреждающее действие гипоксии связано с истощением энергетических запасов клетки, а также активацией транскрипционных факторов семейства NIF, изменяющие экспрессию генов. Кросстоук транскрипционных факторов NIF и активированных глюкокортикоидных рецепторов, которой может происходить при этом охарактеризован мало. Мало изучено совместное действие гипоксии и глюкокортикоидов на экспрессию генов основных регуляторов апоптоза и его основной исполняющей протеазы – каспазы-3.

Является ли предварительное, до эпизода гипоксии, введение глюкокортикоидов нейропротективным – этот вопрос также малоизучен и требует внимательного рассмотрения.

Для исследования влияния глюкокортикоидов на ПКГ в неонатальном мозге были выбраны умеренно клинические дозы, используемые в перинатальной медицине. Формирование головного мозга крысят в течение первой недели жизни соответствует стадии развития мозга человека в предродовой период (Whitelaw, Thoresen, 2000; Fligel et al., 2002). Используемая нами в работе модель неонатальных крысят широко используется для исследования воздействия гипоксии и глюкокортикоидов, которым подвергаются новорожденные в клинике.

#### 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 колокализация глюкокортикоидных рецепторов по типам клеток в неонатальном мозге. Наибольшая степень колокализации была с кальретинином и наименьшая с GFAP в астроглии.

В результате исследования впервые обнаружено, что введение дексаметазона вызывает гибель клеток дорзального субикулума через 6 часов после введения. Глюкокортикоиды вызывали активацию нейронов CA1 гиппокампа в первые 2 часа после инъекции и повышали экспрессию гена раннего ответа c-fos в этой структуре.

Впервые обнаружена гибель клеток субикулума, при введении глюкокортикоидов по механизму глутаматной эксайтотоксичности, от глутамата гиппокампа, высвобождаемого при введении гормона.

Это подтверждается снижением гибели клеток субикулума при предварительном введении антагониста NMDA глутаматных рецепторов мемантина.

В работе впервые обнаружено, что предварительное введение глюкокортикоидов до эпизода гипоксии снижает уровень активной формы ключевой протеазы апоптоза каспазы-3 в неонатальной коре головного мозга. Таким образом, применение дексаметазона перед наступлением реальной гипоксии, несмотря на известные побочные эффекты, 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.

### Теоретическое и практическое значение.

Результаты исследования вносят вклад в понимание механизмов действия глюкокортикоидов на процесс ПКГ в неонатальном мозге и на механизмы по которым оно может быть осуществлено. Полученные в работе данные развивают представления о модуляции процесса ПКГ путем апоптоза в неонатальном мозге не только глюкокортикоидными гормонами, но и действием комплексного фактора, совместно с гипоксией.

### 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 17 печатных работ, из них 4 статьи. 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 139 страницах, содержит 4 таблицы и иллюстрирована 38 рисунками.

## **Глава 1. Обзор литературы.**

### **Молекулярные и клеточные механизмы действия глюкокортикоидов и гипоксии на гибель клеток в головном мозге.**

---

#### **1.1 Глюкокортикоиды и их влияние на развитие организма.**

##### ***1.1.1 Рецепторы глюкокортикоидов.***

Стероидные гормоны глюкокортикоиды играют важную роль в эндокринной регуляции многих органов и систем. Они влияют на углеводный, белковый и липидный обмен (McKay, Cidlowski, 1999). Базальный уровень глюкокортикоидов в крови необходим, например, для поддержания нормального уровня сахара в крови, а также предотвращения артериальной гипотензии (Bamberger et al., 1996; Sapolsky et al., 2000). Повышение уровня этих гормонов вызывает рост уровня глюкозы в крови, индуцирует гибель лимфоцитов и эозинофилов, угнетает воспалительные процессы в организме, изменяет водный и солевой обмен (Bamberger et al., 1996; Sapolsky et al., 2000; Czock et al., 2005).

Глюкокортикоиды синтезируются в клетках пучковой зоны коры надпочечников под контролем адренокортикотропного гормона (АКТГ) гипофиза, кортиколиберина гипоталамуса и центральной нервной системы. Свое действие глюкокортикоиды реализуют через внутриклеточные рецепторы, являющиеся активируемыми лигандами факторами транскрипции (Bamberger et al., 1996; Aranda, Pascual, 2001). У млекопитающих имеется два основных типа рецепторов, связывающих эти гормоны: собственно глюкокортикоидные рецепторы (GR- Glucocorticoid Receptor) и минералокортикоидные рецепторы (MR – Mineralocorticoid Receptor).

Эти рецепторы имеют общее происхождение в эволюции, схожие аминокислотные последовательности и различаются по способности связывать естественные и синтетические стероиды.



В таблице 1 приведены константы диссоциации для основных синтетических глюкокортикоидов, используемых в терапии. MR обладают более высокой аффинностью к естественным глюкокортикоидам, чем собственно GR, поэтому уже при базальных концентрациях кортикостерона 80% MR рецепторов находится в связанном с этим гормоном состоянии (Lan et al., 1982).

Таблица 1. Константы диссоциации основных лигандов с глюкокортикоидным и минералокортикоидным рецептором [по (Lan et al., 1982)]

<b>Лиганд</b>	<b>K<sub>d</sub> GR, nM</b>	<b>K<sub>d</sub> MR, nM</b>
альдостерон	92	0.86
11-деоксикортикостерон	77	1.07
кортизол	61	43.8
преднизолон	27	24.8
бетаметазон	11	9.8
дексаметазон	9.8	23.9

Помимо характеристик связывания различных лигандов для транскрипционных факторов важна также способность изменять экспрессию генов, в ответ на активацию лигандом. Функциональную активность можно измерить, поместив репортерный ген люциферазы под гормон-отвечающий промотор гена MTV. На рис. 1 приведены зависимости функциональной активности (ED50), определяемой по дозе лиганда, вызывающей активацию экспрессии репортера, от аффинности связывания в эксперименте с котрансфекцией GR или MR с люциферазной репортерной конструкцией MTV-LUC для основных лигандов. Способность тех или иных лигандов изменять экспрессию гормон-отвечающих генов хорошо коррелирует со сродством лигандов к рецептору (Рис.1). (Rupprecht et al., 1993)

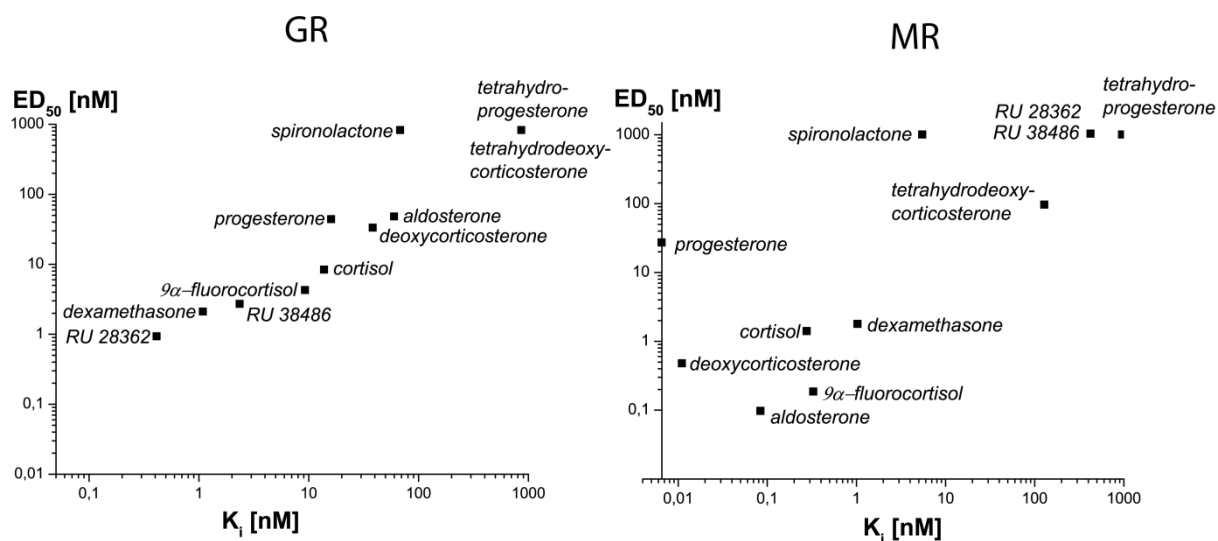


Рис. 1 Зависимости функциональной активности  $ED_{50}$  от аффинности связывания большинства доступных лигандов для GR и MR рецепторов (Rupprecht et al., 1993).

Активированные лигандом глюкокортикоидные рецепторы, освобождаются от белков-шаперонов, ассоциированных с ними, транслоцируются в ядро, димеризуются и изменяют экспрессию генов мишеней, связываясь со специфическими последовательностями в промоторах (+GRE- глюкокортикоид респонсивными элементами рис.2) (Surjit et al., 2011; Hudson et al., 2013). Доменная структура рецептора хорошо охарактеризована, он состоит из центрального ДНК-связывающего домена (60-70ак.), фланкированного с С-терминального конца примерно 250ак. лиганд-связывающим доменом и с N- конца доменом вариабильной степени гомологичности у разных представителей семейства лиганд активируемых транскрипционных факторов (Yudt, Cidlowski, 2002).

Наряду с трансактивацией экспрессии, посредством связывания с +GRE (Рис.2), возможна также GC-индуцированная прямая трансрепрессия посредством связывания GR с недавно обнаруженными «негативными» nGRE (Рис.2). Эти элементы отличаются по последовательности от активирующих +GRE и селективно рекрутируют корепрессоры NCoR и SMRT (Surjit et al., 2011). Также связывание GR с nGRE препятствует

димеризации рецептора из-за его ориентации. До этого были описаны случаи не прямой транскрепрессии, опосредованной взаимодействием активированных GR с другими транскрипционными факторами: AP-1 и NF-κB (Polman et al., 2013). Эти модели действия GR приведены на рисунке 2.

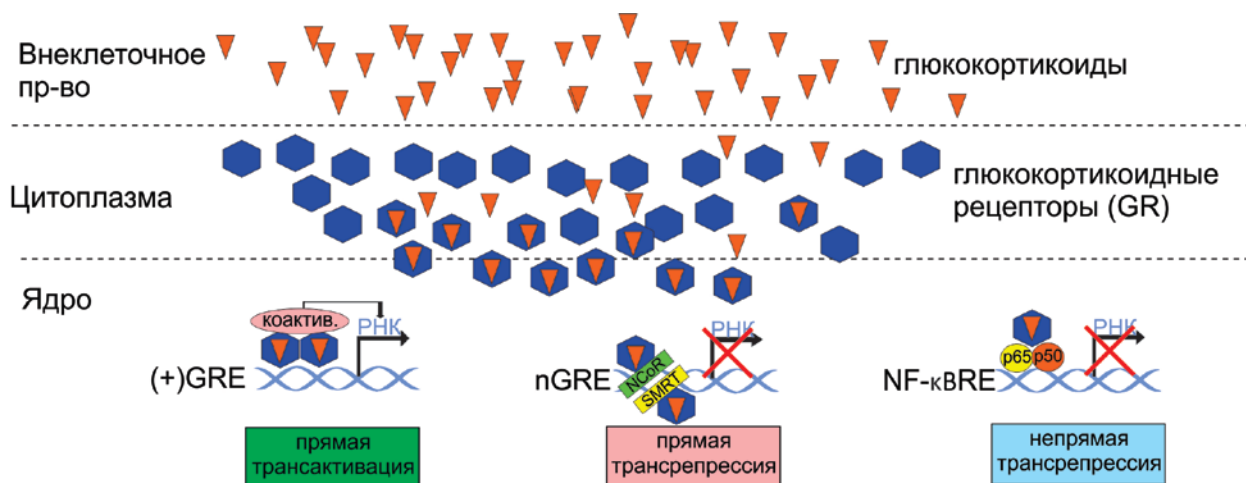


Рис. 2 Пути трансактивации и транскрепрессии глюкокортикоидными рецепторами по (Surjit et al., 2011) Коатив.-коактиваторы, привлекаемые GR; p65, p50-субъединицы NF-κB; SMRT, NCOR – корепрессоры рекрутируемые GR при связывании nGRE

В геноме у млекопитающих присутствует один ген глюкокортикоидного рецептора. У человека ген включает 9 экзонов с белок кодирующей частью, начинающейся во 2-м экзоне (см рис. 3А). Промоторный район содержит множественные GC-боксы и не содержит ТАТА и ССААТ боксы. Анализ промотрного региона ( начиная с -2300) показал, что в нём также содержатся сайты связывания для транскрипционных факторов Sp1, AP-1, YY 1, NF-κB и свой собственный GRE, вероятно обеспечивающий авторегуляцию (Breslin, Vedeckis, 1998). У человека и мыши найдено 3 разных промотора, дающие мРНК с разной 5'-нетранслируемой областью (Yudt, Cidlowski, 2002). Разные последовательность экзона 1 не влияют на рамку считывания ( Рис3А ). Альтернативный сплайсинг дает две изоформы глюкокортикоидного рецептора GRα и GRβ (Рис. 3В), с GRα экспрессирующейся на более высоком уровне в большинстве тканей. GRβ изоформа отличается от GRα только С-

концом, в результате альтернативного сплайсинга 8-го и финального экзонов. В результате GR $\beta$  не может связать лиганд и активировать транскрипцию. Таким образом формируя неактивные гетеродимеры GR $\alpha$ GR $\beta$   $\beta$ -изоформа может ослаблять действие гормона по доминантно-негативному принципу.

Каждый транскрипт гена GR может давать еще несколько изоформ из-за механизма альтернативной инициации трансляции (Рис. 3С). Рибосомальное шунтирование и «leaky scanning» ответственны за появление GR $\alpha$  -A, -B, -C1, -C2, -C3, -D1, -D2, и -D3 изоформ. Эти изоформы GR $\alpha$  различно распределены по тканям. Максимальный уровень GR $\alpha$ -C изоформы в поджелудочной железе и кишечнике, а GR $\alpha$ -D изоформы в селезенке и легких. Так в экспериментах с линиями клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих различные трансляционные изоформы GR $\alpha$ , было показано что они изменяют экспрессию различных генов, в ответ на активацию лигандом (Wu et al., 2013).

Также глюкокортикоидные рецепторы могут регулироваться на посттрансляционном уровне (Рис. 3D). GR является мишенью для нескольких киназ и фосфатаз и может быть полифосфолирован по остаткам серина и треонина N-конца полипептидной цепи. Также GR может быть убиквитилирован и сумоилирован. Функциональная значимость этих модификаций остаётся не до конца изученной. Все разнообразие форм и модификаций GR может объяснять неоднозначность действия глюкокортикоидов и иметь свое значение для развития организма (Yudt, Cidlowski, 2002).

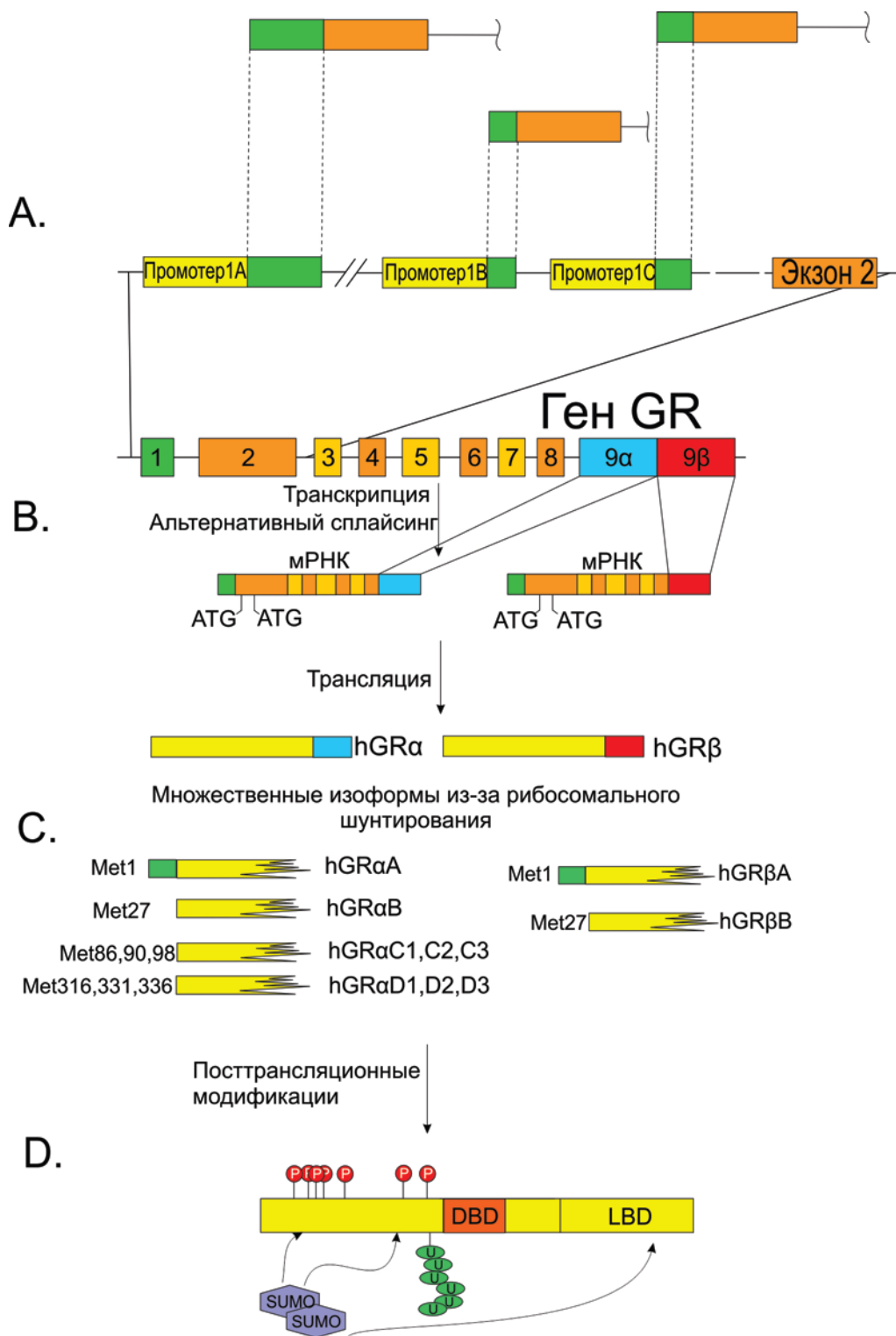


Рис. 3 Изоформы глюкокортикоидного рецептора человека по (Yudt, Cidlowski, 2002)  
 А. 3 разных промотора дают мРНК с разными 5'UTR .  
 В. Альтернативный сплайсинг дает две изоформы рецептора GRα и GRβ.  
 С. Трансляционные изоформы, возникают в результате рибосомального шунтирования и «leaky scanning» .  
 D. Рецепторы могут подвергаться также ряду посттрансляционных модификаций.

### *1.1.2 Экспрессия глюкокортикоидных рецепторов в головном мозге.*

В экспериментах с *in situ* гибридизацией было показано, в каких структурах мозга экспрессируются GR и MR рецепторы (Aronsson et al., 1988; van Eekelen et al., 1991). На второй день жизни у крыс высокая плотность мРНК MR выявляется во всех пирамидных (CA1-4) и гранулярных клетках (DG) гиппокампа, и во 2-м слое коры. Умеренное мечение мРНК MR наблюдалось в субфорникальном органе и переднем гипоталамусе. В других структурах переднего мозга наблюдалось лишь слабое мечение и практически отсутствовало в промежуточном мозге. С возрастом, вплоть до взрослого состояния региональное распределение мРНК MR не изменяется.

На второй день жизни высокое мечение мРНК GR широко распространено в конечном и промежуточном мозге, с наивысшей плотностью в полях CA1-CA2 гиппокампа и мелкоклеточной области паравентрикулярного ядра гипоталамуса. Умеренное мечение GR мРНК наблюдается в слоях 2, 3 и 6 неокортекса, различных ядрах таламуса и гипоталамуса, базальных ганглиях, латеральном септуме и миндалине (Aronsson et al., 1988; van Eekelen et al., 1991).

С возрастом и у взрослых животных интенсивность мечения возрастает в гиппокампе. На E18 GR и MR мРНК экспрессируются на одинаковом уровне, но к моменту рождения уровень MR в 3 раза превышает GR и остаётся выше до 60 дня жизни (Bohn et al., 1994). В поздний эмбриональный и ранний постнатальный период половых различий по мРНК GR и MR не выявлено. Только лишь к P60 уровень мРНК GR у самок становится выше, чем у самцов. (Bohn et al., 1994).

Недавно были получены данные о различной субклеточной локализации глюкокортикоидных рецепторов в ходе раннего развития головного мозга (Tsiarli et al., 2013). На более ранних стадиях, в эмбриогенезе, на E11,5 день развития у мыши в большинстве Pax6 позитивных клетках радиальной глии (RGC) и Tbr2 позитивных интермедиальных предшественниках (IPCs)

глюкокортикоидные рецепторы локализируются в ядре, и лишь у небольшой части клеток RGC, в апикальной вентрикулярной зоне (aVZ) GR локализованы цитоплазматически. Однако на E13,5 эта популяция RGC увеличивается в размерах. В паравентрикулярных нейральных стволовых/клетках предшественниках (NSPC's) и нейронах кортикальной пластинки GR локализованы в ядре. Подобный паттерн локализации наблюдается в вентральном переднем мозге, гиппокампе и обонятельных луковицах. Перед рождением ядерно локализованный GR наблюдается в 5-м слое коры, субпластинке, поле CA1 гиппокампа. Таким образом субклеточная локализация GR подвержена регион- и стадий специфическому контролю в ходе развития (Tsiarli et al., 2013).

### ***1.1.3 Генетические модели для изучения функции глюкокортикоидных рецепторов.***

Для изучения функции глюкокортикоидных рецепторов было создано большое количество генетически модифицированных линий мышей, в которых либо отсутствует экспрессия GR/MR полностью или же частично, либо рецепторы были оверэкспрессированы (см Таблицу 2). Полные нокауты по глюкокортикоидному рецептору ( $GR^{null}$ ,  $GR^{hypo}$ ) умирают вскоре после рождения из-за ателектаза легких, поскольку функция глюкокортикоидных рецепторов важна для выработки сурфактанта легкими (Cole et al., 1995; Kellendonk et al., 1999). В то же время у мышей  $GR^{dim}$  с точечной мутацией A458T в ДНК связывающем домене, препятствующей димеризации активированных GR рецепторов и прямой трансактивации через +GRE не наблюдается ателектаза легких при рождении. При этом у мышей  $GR^{dim}$  рецептор может изменять транскрипцию взаимодействуя с другими транскрипционными факторами AP-1 и NF- $\kappa$ B, а также связываясь с nGRE, не требующего димеризации рецептора. Таким образом, прямая трансактивация через +GRE не является жизненно необходимой для созревания легких (Reichardt et al., 1998). Апоптоз лимфоцитов при стимуляции глюкокортикоидами отсутствует у

Таблица 2. Генетические модели для исследования GR и MR рецепторов. (по Kellendonk et al., 1999; Gass et al., 2000; Kellendonk et al., 2002)

	<b>GR<sup>hypo</sup></b>	<b>GR<sup>null</sup></b>	<b>MR<sup>null</sup></b>	<b>GR<sup>cond</sup></b>	<b>MR<sup>cond.</sup></b>	<b>GR<sup>dim</sup></b>	<b>AGR</b>	<b>YGR</b>
<b>Ген. модификация</b>	Инсерция Neo кассеты во второй экзон	Делеция третьего экзона (DBD)	Делеция третьего экзона (DBD)	Фланкирован третий экзон Loxr сайтами	Фланкирован третий экзон Loxr сайтами	Точечная мутация A458T в 4-м экзоне	Трансген экспрессирующий антисмысловую РНК против 3' UTR мРНК GR под промотором NF-L	YAC трансген, несущий 2 дополнительные копии гена GR
<b>Экспрессия GR (MR)</b>	Экспрессируется неполная С-концевая форма.	Не детектируема	Не детектируема	Не детектируема в определенной популяции клеток и временной промежуток, в зависимости от экспрессии Cre рекомбиназы	Не детектируема в определенной популяции клеток и временной промежуток, в зависимости от экспрессии Cre рекомбиназы	Не изменена	40–50% - уровень мРНК. 60-70% - уровень белка.	150 % - уровень мРНК. 150 % - уровень белка.
<b>Фенотип</b>	Респираторный дистресс, большинство мутантов умирает перинатально. Хотя пенетрантность меньше чем у GR <sup>null</sup> . Нарушено развитие легких. Надпочечники увеличены и нарушена их функция, без нарушения стратификации Мозг имеет нормальную морфологию. Нарушена работа ГГНС. Отсутствует глюкокортикоид индуцируемый апоптоз тимоцитов	Более тяжелый чем в GR <sup>hypo</sup> , но с теми же признаками. Отсутствует глюкокортикоид индуцируемый апоптоз тимоцитов	Имеют симптомы псевдогипоальдостеризма, умирают на P8-13.	Зависит от Cre линии.	Зависит от Cre линии.	Развитие легких проходит нормально. Отсутствует связывание GR с GRE. Отсутствует глюкокортикоид индуцируемый апоптоз тимоцитов.	Увеличенное отложение жира, но едят на 15% меньше дикого типа. Повышенный уровень АКТГ и кортикостерона в плазме.	Значительно уменьшен уровень КРГ и АКТГ. Уровень глюкокортикоидов в уменьшен в 4 раза. Более слабый ответ на иммобилизационный стресс. Повышен апоптоз тимоцитов от глюкокортикоидов.



полных нокаутов по GR (Reichardt et al., 1998; Kellendonk et al., 1999), и у мышей GR<sup>dim</sup> (Reichardt et al., 1998), а также уменьшен у трансгенных мышей экспрессирующих антисенс к 3'UTR GR в клетках иммунной системы (King et al., 1995) и увеличен у мышей с 3-мя копиями глюкокортикоидного рецептора (Reichardt et al., 2000). Отсутствие индуцируемого апоптоза у мышей GR<sup>dim</sup> говорит что он реализуется через прямую трансактивацию по +GRE (Reichardt et al., 1998; Kellendonk et al., 1999) в то же время сообщений об изменении глюкокортикоид зависимого апоптоза лимфоцитов у нокаутов по MR в литературе найдено не было. Нокауты по MR рецепторам имеют признаки псевдоальдостеризма и умирают в неонатальный период на P8-11 день жизни, что преодолимо введением NaCl (Berger et al., 1998; Gass et al., 2000). Также у мышей с инактивированным MR ухудшен нейрогенез гиппокампа наблюдается дегенерация гранулярных клеток (Gass et al., 2000).

У всех линий с изменениями по GR и MR остается нормальная морфология мозга и ЦНС, присутствуют все структуры, но нарушено функционирование ГГНС, реакция на стресс и изменена тревожность. GR и MR рецепторы гиппокампа вовлечены в глюкокортикоид-опосредованную обратную связь регуляции ГГНС, являющуюся неотъемлемым и важным элементом её нормального функционирования. Из-за различий в аффинности, GR активируются только при повышении уровня глюкокортикоидов при стрессе или суточном цикле, поэтому предполагалось, что MR важен для функции ГГНС в нормальном состоянии, а GR при стрессорной стимуляции. Однако анализ мышей с полной инактивацией GR, показал, что глюкокортикоидный рецептор необходим и для базального функционирования ГГНС (Kellendonk et al., 2002).

Инактивация глюкокортикоидного рецептора в норадренергических нейронах у направленных мутантов GR<sup>DBHCre</sup> вызывало депрессивно-подобное поведение и тревожность только у самок (Chmielarz et al., 2013). В то же время у мышей с более широкой инактивацией глюкокортикоидного рецептора в головном мозге, экспрессирующих Cre-рекомбиназу под

промотором нестина обнаружено снижение тревожности в тесте приподнятого крестообразного лабиринта и тесте светлого-темного поля (Tronche et al., 1999). Эти данные подтверждаются снижением тревожности в этих тестах у мышей AGR (Montkowski et al., 1995).

#### ***1.1.4 Влияние глюкокортикоидов на развитие головного мозга.***

Глюкокортикоидные рецепторы экспрессируются во многих структурах формирующегося мозга, поэтому можно ожидать, что повышение уровня этих гормонов может модулировать процессы созревания нормального мозга.

Хронический стресс матерей является источником повышенного уровня глюкокортикоидов у плода. В постнатальном периоде стрессорные факторы в жизни самого ребенка могут провоцировать повышенную эндогенную секрецию этих гормонов (Matthews, 2000; Edwards, Burnham, 2001). Действительно, разнообразные стрессорные воздействия повышают уровни АКТГ и кортизола в крови новорожденных крыс (Edwards, Burnham, 2001). Спровоцированное стрессом воздействие глюкокортикоидов на мозг плодов крыс активирует апоптоз в паравентрикулярном ядре гипоталамуса (PVN) и приводит к потере части его нейронов (Welberg, Seckl, 2001). Пренатальный стресс и глюкокортикоиды влияют на развитие нейромедиаторных систем, вызывает в последующие периоды жизни поведенческие нарушения: аномалии сна, дефицит внимания, познавательной деятельности, усиления тревожности, искажения полового поведения (Edwards, Burnham, 2001; Welberg, Seckl, 2001).

Распространенной причиной повышенного уровня глюкокортикоидов в развивающемся организме является также и гормонотерапия. Синтетический глюкокортикоид дексаметазон широко применяется в клинике для терапии респираторного дистресс синдрома (РДС) новорожденных а также бронхолёгочной дисплазии (БЛД). Ежедневное введение синтетических

глюкокортикоидов дексаметазона или бетаметазона макакам-резусам, крысам, овцам в третьем триместре беременности приводит к существенному снижению массы мозга, сердца, печени, легких плода (Whitelaw, Thoresen, 2000; Edwards, Burnham, 2001). В ранний период после рождения глюкокортикоиды назначаются детям при ряде таких заболеваний, как аутоиммунные гемолитические анемии, травмы ЦНС. (Matthews, 2000; Edwards, Burnham, 2001). Введение дексаметазона недельным крысятам также уменьшает массу их мозга, снижает миелинизацию волокон ЦНС (Benesova, Pavlik, 1989; Edwards, Burnham, 2001; Welberg, Seckl, 2001). Воздействие глюкокортикоидами снижает нейрогенез в коре и гиппокампе (Kanagawa et al., 2006), вызывает атрофию дендритов нейронов гиппокампа (Edwards, Burnham, 2001), нарушает миграцию нейронов и способствует развитию кортикальной дисплазии (Edwards, Burnham, 2001). Неонатальное введение синтетических аналогов гормонов вызывает также необратимые изменения поведенческих реакций: гиперактивность, высокую эмоциональную реактивность, снижение способности к адаптации, нарушения пространственной координации (Ferguson et al., 2001).

«Cochrane Collaborative Study Group» обобщила исследования о риске развития детского церебрального паралича (ДЦП) при ранней постнатальной (<8 дней жизни) и поздней постнатальной (>7 дней жизни) глюкокортикоидной терапии при предотвращении БЛД. Ранняя постнатальная терапия повышала риск ДЦП, при применении избирательного лиганда GR дексаметазона, но не гидрокортизона, действующего и через GR и через MR. Поздняя постнатальная терапия не изменяла риск возникновения ДЦП значительно (Roberts, Dalziel, 2006; Halliday et al., 2009a, b).

## **1.2 Апоптоз и его роль в развитии организма.**

Гибель клеток, наряду с ростом и дифференцировкой является естественной частью их жизненного цикла. Предполагается, что

поддержание постоянного количества клеток обеспечивается за счет динамического равновесия между пролиферацией клеток и их гибелью (Schwartzman, Cidlowski, 1993). Такой вид «естественной» гибели клетки, называемый программируемой клеточной гибелью (ПКГ), очень широко распространенное явление в физиологических и патофизиологических процессах.

Развитие многоклеточных организмов базируется на митотическом делении, дифференцировке, функциональном созревании и гибели части его клеток. Динамичный баланс этих процессов приводит к формированию индивида. Во всех тканях на определенных стадиях развития происходит ПКГ. Тогда возникает закономерный вопрос: зачем организму терять драгоценные ресурсы на производство огромного количества клеток, которым суждено умереть? Один из ответов на этот вопрос может состоять в повышении пластичности онтогенеза животных в результате ПКГ, что позволяет решить широкий спектр проблем, возникающих в ходе развития (Milligan, Schwartz, 1997).

Первое, по сути случайное, описание ПКГ было опубликовано около века назад и интерпретировалось тогда как процесс устранения поврежденных клеток в эмбрионах. Сейчас ПКГ привлекает всеобщее внимание. Масштабы этого процесса, согласно оценкам ряда исследователей оказались весьма существенными. Так, например, около 50% симпатических нейронов и мотонейронов, возникающих в раннем эмбриогенезе цыпленка, гибнет в дискретные периоды эмбриогенеза и постнатальный период. (Milligan, Schwartz, 1997). Сам термин «программируемая клеточная гибель» впервые был введен Lockshin и Williams для описания регулируемой утраты специальных мышц у личинки бабочки в завершающей стадии метаморфоза (Lockshin, Williams, 1965; Milligan, Schwartz, 1997). Этот термин первоначально означал гибель клеток в пространственно временной воспроизводимой манере в ответ на физиологический сигнал, как часть программы развития или поддержания гомеостаза организма. Затем этот

термин стали употреблять в более широком смысле - для обозначения смерти клетки, осуществляемой по генетически заданной программе, и независимой от сигналов, инициирующих этот процесс.

Термины ПКГ и апоптоз, зачастую используемые как синонимы, которые в полной мере изначально таковыми не являлись. Термин апоптоз был впервые применен Керр с соавторами для описания общих характерных морфологических изменений, наблюдаемых в умирающих клетках тканей организмов самых разных видов (Kerr et al., 1972). Древнегреческое слово «апоптоз» в переводе означает естественную потерю лепестков цветов или листьев деревьев - листопад.

ПКГ это процесс, в то время как термин апоптоз, первоначально введенный цитологами, изначально описывал в основном лишь его морфологические проявления. В большинстве случаев ПКГ осуществляется с проявлениями апоптоза, но это не является обязательным правилом. ПКГ может происходить и через аутофагию. Также как и процесс ПКГ в современном ее понимании, проявление структурных и биохимических признаков апоптоза осуществляется достаточно автономно и не требует неременной целостности клеток. Многие характерные признаки апоптоза могут быть индуцированы в изолированных ядрах и цитоплазме апоптозных клеток (Nicholson et al., 1995).

Сейчас становится ясным, что апоптоз является необходимым компонентом развития животных, установления, а у позвоночных и поддержания архитектоники всех тканей организма (Meier et al., 2000). В общем, при развитии многоклеточного животного происходит сверхпродукция клеток с последующей отбраковкой избыточных путем апоптоза в течение последующих этапов развития, чтобы достигнуть соизмеримого числа клеток для правильной работы органа (Jacobson et al., 1997). Например, Мюллеров проток, дающий начало матке и яйцеклеткам у самок, но ненужный самцам, деградирует. С другой стороны, Вольфов проток – зачаток мужских репродуктивных органов, деградирует у самок

(Saxen, Sariola, 1987). В ходе развития апоптоз часто используется для удаления подобных структур, которые были необходимы на предшествующих стадиях формирования организма и у его эволюционных предшественников, но утратили свое значение на данной стадии фило- и онтогенеза. Такой тип дегенерации можно назвать филогенетической клеточной гибелью (Oppenheim, 1991). У насекомых и амфибий в ходе их метаморфоза, апоптоз удаляет органы, которые больше не нужны, такие как мышцы и нервы, но были необходимы для локомоции личинки насекомого или управления хвостом головастика. Такой тип дегенерации можно назвать метаморфической клеточной гибелью (Oppenheim, 1991). Апоптоз также действует как часть системы контроля качества и компенсаторных механизмов, способствующих высокому уровню пластичности в течение развития, компенсируя многие генетические и случайные ошибки развития. Например, у *Drosophila melanogaster* с повышенной дозой морфогена bicoid (bcd) происходит нарушение формирования эмбрионов – разрастание передних областей тела. Тем не менее, эти эмбрионы развиваются в сравнительно нормальных личинок и взрослых особей, потому что разрастание тканей компенсируется гибелью клеток (Namba et al., 1997). Такой вид клеточной гибели можно назвать морфогенетическим (Oppenheim, 1991).

Во взрослом организме апоптоз является неременным участником построения, поддержания клеточного состава и репарации тканей организма, например, эпителия, мышечной и костной ткани, а также крови (Schwartzman, Cidlowski, 1993; Saile et al., 1997; Manolagas, 2000; Meier et al., 2000; Sylvia, 2003; Coleman, 2007).

### **1.3 Особенности некроза, аутофагии и апоптоза.**

#### ***1.3.1 Некроз***

Длительное время считалось, что основной причиной гибели клеток является патологический процесс, возникающий при воздействии на нее

повреждающих факторов. Такая клеточная гибель, называемая некрозом, не относится к прогаммируемым типам гибели клетки может происходить в ответ на широкий круг вредных факторов: гипертермию (Buckley, 1972), гипоксию (Trump et al., 1980), ишемию (Borgers et al., 1987), атаку комплементом (Hawkins et al., 1972), метаболические яды (Trump et al., 1984), а также повреждение целостности клетки (Trump, Vulger, 1967).

Некротические клетки обычно имеют характерные морфологические признаки. На ранних стадия некроза наблюдается разбухание цитоплазмы и органелл, особенно митохондрий, и лишь незначительные изменения в морфологии ядра. Эти изменения вызывают в конечном счете распад органелл и разрушение плазматической мембраны, что приводит к выходу клеточного содержимого во внеклеточное пространство. Морфологические изменения возникают из-за потери контроля над селективной проницаемостью мембраны клетки (Trump et al., 1984). Последнее может быть результатом угасания активности ионных насосов мембраны, ее непосредственного повреждения (Schanne et al., 1979) или же энергетического голодания клетки (Jennings, Reimer, 1981). Катионы начинают проникать через мембрану по градиенту своей концентрации, а сопутствующий поток жидкости вызывает критическое разбухание клеток. Возрастание концентрации свободного кальция в цитозоле активирует фосфолипазы, связанные с мембраной, и ее широкомасштабное разрушение (Chien et al., 1978; Smith et al., 1980). Высвобождение гидролаз из разрушенных лизосом вызывает на поздних стадиях некроза быструю дезинтеграцию клетки (Hawkins et al., 1972). При некрозе обычно погибает целая группа смежных клеток. Воспалительная реакция развивается в соседних жизнеспособных тканях в ответ на воздействие остатков уже погибших клеток. В очаге некроза происходит быстрое снижение уровней белка, ДНК и РНК (Trump et al., 1984). Гистоны хроматина подвергаются протеолитическому перевариванию, и его ДНК разрезается лизосомальными дезоксирибонуклеазами на фрагменты

разнообразных размеров (Afanas'ev et al., 1986). Некроз не относится к программируемым видам гибели леток (Gunther et al., 2013).

### ***1.3.2 Аутофагия***

Аутофагия, наряду с апоптозом, является одной из форм ПКГ (аутофагическая ПКГ, аПКГ), хотя в её первоочередные задачи входит не только избирательная элиминация органелл, клеток и клеточного мусора (Tsujimoto, Shimizu, 2005; Mei et al., 2014), это прежде всего динамичная утилизационная система, служащая для обеспечения клеток энергией и материалом для синтеза белков и мембран (Mei et al., 2014). В эукариотических клетках аутофагия может индуцироваться голоданием (Kroemer et al., 2010), гипоксией (Gurusamy et al., 2009), гормонами (Kroemer et al., 2010), ЭР стрессом, окислительным стрессом (Patel et al., 2013), повреждением митохондрий. По субстрату, который подвергается аутофагии, она может быть классифицирована как селективная и неселективная (Mei et al., 2014). Являясь частью неспецифического ответа клетки на недостаток питательных веществ неселективная аутофагия приводит к массивной деградации цитоплазмы и органелл предоставляя аминокислоты и липиды для промежуточного обмена клетки. Селективная аутофагия приводит к деградации определённых органелл и белковых агрегатов. Аутофагия пероксисом и белковых агрегатов включает в себя убиквитинилирование их белков, которые узнаются аутофагическими рецепторами p62 или Nbr1, которые связываются с белком LC3, ассоциированным с микротрубочками и доставляют их для деградации в аутофагосому. При определенных условиях происходит аутофагия тех или иных органелл: митохондрий (митофагия), рибосом (рибосомафагия), ЭР (ретикулофагия), пероксисом (пероксисомафагия). Например митофагия происходит при открытии в мембране митохондрий пор (permeability transition pore - РТР) и снижении её мембранного потенциала (Gurusamy et al., 2009; Kroemer et al., 2010; Mei et al., 2014).



Аутофагию можно разделить на три типа: микроаутофагию, макроаутофагию и шаперон-зависимую аутофагию, каждый из которых приводит к деградации элементов клетки в лизосомах (Tsujiimoto, Shimizu, 2005; Mei et al., 2014).

При макроаутофагии растворимый материал цитозоля и органеллы доставляются в лизосому через образование промежуточной органеллы аутофагосомы. Участок цитоплазмы (часто содержащий какие-либо органоиды) окружается мембранным компартментом (фагофор), похожим на цистерну эндоплазматической сети, в результате он отделяется от остальной цитоплазмы мембраной с образованием аутофагосомы. Затем аутофагосома сливается с лизосомой образуя аутолизосому, деградируя содержимое.

При микроаутофагии небольшое количество материала цитозоля: макромолекулы и обломки клеточных мембран непосредственно захватываются лизосомой, прямой инвагинацией её мембраны (Mei et al., 2014). При шаперон-опосредованной аутофагии белки, содержащие KFERQ-подобный мотив, вначале связываются с шапероном hsc-70 и транспортируются в лизосому с помощью белка LAMP-2 (Mei et al., 2014).

Первые гены Atg, ответственные за запуск каскада аутофагии были идентифицированы в 1997 (Funakoshi et al., 1997; Matsuura et al., 1997). Генетический нокаут Atg генов установил критическую роль аутофагии в реакции на стресс а также её связь со многими патологическими состояниями (Funakoshi et al., 1997; Matsuura et al., 1997). Семейство Atg белков состоит из четырех основных групп: (1) Atg1/unc-51-like kinase (ULK) комплекс (Atg1/ULK1–Atg13–Atg17) который активируется вышестоящими белками различных сигнальных каскадов; (2) Beclin 1/класс III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) комплекс (Atg6/Beclin1, Atg14, Vps34/PI3KC3, and Vps15) который опосредует образование, энуклеацию аутофагосом (3) два убиквитин-подобных белка конъюгационной системы (Atg12 and Atg8/LC3) которые приводят к экспансии, элонгации аутофагосом; (4) Atg9 который доставляет липиды изолированной мембране (Mei et al., 2014). Комплексы

Atg состоящих беков координируют образование аутофагосом. Atg1/ULK1 комплекс (Atg1 у дрожжей, его ортолог у млекопитающих ULK1) – первоначальный регулятор образования аутофагосом. В нормальных условиях питательной среды клетки ULK1 связан с mTORC1 комплексом, который его фосфолирует и ингибирует инициацию аутофагии (Mei et al., 2014). В условиях голода mTORC1 диссоциирует из комплекса с ULK1, чье высвобождение вызывает энуклеацию и элонгацию аутофагосом и последующую аутофагию. ULK1 фосфолирует Beclin1 из второго комплекса, что повышает его активность в энуклеации аутофагосом. В богатых энергетических условиях антиапоптозные регуляторы Bcl-2 и Bcl-x1 могут предотвращать аутофагию связываясь с Beclin1 и ингибируя работу комплекса (Oberstein et al., 2007). В условиях голода и соответственно повышенной концентрации АМФ (монофосфата) протеинкиназа активируемая аденозин монофосфатом АМПК фосфолирует регуляторный комплекс mTORC1, что приводит к его ингибированию (Tsujiimoto, Shimizu, 2005; Gurusamy et al., 2009; Kroemer et al., 2010; Mei et al., 2014).

Некоторые авторы для описания аутофагической ПКГ вводят термин «аутозис» («автолиз») (Liu et al., 2013). Так Liu с соавторами в своей работе индуцировали аутофагическую гибель клеток химерным Tat-Beclin 1 (ТАТ белок HIV), способным проникать внутрь клеток (Liu et al., 2013). Авторы показали, что эта гибель клеток имеет отличительные морфологические черты, зависима от Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы и значительна в мозге при гипоксии-ишемии. Введение блокатора Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы нейрофолина неонатальным крысятам в временной интервал до 6 часов после эпизода гипоксии-ишемии значительно снижало гибель клеток (Liu et al., 2013).

При наблюдении клеток HeLa в культуре, обработка аутофагическим пептидом Tat-Beclin 1, приводила к сжатию ядра, появлению вогнутостей на поверхностной мембране, разделению внешней и внутренней ядерной мембраны. В терминальной стадии клетки проявляли большую адгезию, в

отличии от апоптозных клеток, которые теряют способность удерживаться (Liu et al., 2013).

Аутофагия и апоптоз проходят по своим механизмам, которые могут взаимодействовать между собой. Проаутофагический белок Beclin1 связывается с антиапоптозными регуляторными белками. Фосфолирование либо Bcl-2, либо Beclin-1 нарушает их взаимодействие и приводит к высвобождению Beclin-1 и аутофагии. Клетки культуры фибробластов мышей, нокаутных по Вах/Вак генам не проявляют апоптотической гибели, а имеют ряд признаков гибели по аутофагическому пути (Tsujiimoto, Shimizu, 2005). Взаимодействие и пересечение этих двух путей ПКГ требуют дальнейшего более детального изучения.

### ***1.3.3 Апоптоз.***

Дезинтеграция клетки путем некроза при ее повреждении существенно отличается по морфологическим признакам от программируемой гибели клетки, которую принято называть апоптозом. Этот вид клеточной гибели происходит в самых разнообразных условиях в разрозненных клетках и зачастую так быстро, что его трудно наблюдать.

В ходе апоптоза наблюдаются две морфологически ясно выделяемые стадии. Во-первых, происходит конденсация ядра и цитоплазмы. Ранние изменения ультраструктуры клеток при апоптозе включают в себя потерю специализированных мембранных структур, таких как микроворсинки, а также контактов между клетками. Цитоплазма конденсируется, а хроматин в ядре собирается в несколько больших глыб. Впоследствии ядро разделяется на фрагменты. Происходит расширение эндоплазматического ретикулума и усиленное формирование пузырьков, которые сливаются с плазматической мембраной и изливают своё содержимое в межклеточное пространство (Morris et al., 1984; Yuan et al., 2014). В результате потери внутриклеточной жидкости и ионов сокращается объем цитоплазмы (Lockshin, Beaulaton, 1981; Bratton, Henson, 2008). Поверхность клетки на непродолжительное время

приобретает глубокие инвагинации (Stacey et al., 1985; Benn, Woolf, 2004). В конечном счете происходит разделение клетки на покрытые мембраной фрагменты - апоптотические тельца, содержащие целые органеллы, а некоторые из них и частички ядра. Апоптотические тельца имеют размеры, позволяющие их различить в световой микроскоп, а количество их от одной погибающей клетки прямо пропорционально её размеру.

Ещё одним признаком апоптоза является экспрессия на внешней стороне плазматической мембраны специфических молекулярных маркеров, распознаваемых фагоцитирующими клетками: тромбоспондина; фосфатидилсерина и других фосфолипидов, содержащих фосфосерин (Pettmann, Henderson, 1998; Arrendale et al., 2012). Фосфосерин в плазматической мембране клетки может быть детектирован меченым аннексином V (Bratton, Henson, 2008).

На второй стадии апоптоза эти тельца фагоцитируются соседними клетками и быстро элиминируются из ткани. Апоптотические тельца очевидно несут маркеры фагоцитоза и редко встречаются во внеклеточном пространстве без приближающихся или связывающихся с ними фагоцитирующих клеток. Фагоцитирующими клетками часто являются члены мононуклеарно-фагоцитозной системы, но могут быть также клетки эпителия, эндотелия сосудов или клетки опухоли, в которой идет апоптоз (Wyllie et al., 1980; Gunther et al., 2013). Апоптоз может протекать в клетках здоровых и опухолевых, взрослых и эмбриональных тканях. Этим путем обычно гибнут отдельные клетки или небольшие группы клеток, причем, как правило, асинхронно.

#### ***1.3.4 Молекулярные механизмы апоптоза***

Первые данные о молекулярно-генетической основе апоптоза были получены на *C. Elegans*, состоящей из примерно ~1000 клеток. Сто тридцать одна соматическая клетка из этого числа погибает путем апоптоза в ходе онтогенеза этой нематоды (Twomey, McCarthy, 2005). Генетический скрининг

мутантов с недостаточной клеточной гибелью выявил несколько генов, необходимых для разрешения, регуляции и выполнения апоптоза. Из них четыре *egl-1*, *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* непосредственно участвуют в процессе гибели клеток. У мутантов по генам *egl-1*, *ced-3*, *ced-4* выживали все 131 клетки. Напротив, мутанты с потерей функции гена *ced-9* погибали в ходе раннего развития в результате массивной эктопической гибели клеток.

Ген *ced-3* кодирует белок CED-3 - цистеиновую протеазу, принадлежащую к эволюционно консервативному классу «каспаз», названного так по их способности разрезать пептидную цепь по аспарагиновой кислоте (Thornberry, 1999). Как и все протеазы, каспазы синтезируются в виде профермента зимогена, который имеет лишь небольшую каталитическую активность или вообще её лишен. Профермент активируется протеолизом как в результате воздействия других каспаз, так и автокаталитически в «апоптосомном» мультибелковом комплексе, в который собираются разрозненные молекулы прокаспаз. Сборка апоптосом зависит от специальных адаптерных соединяющих молекул и обычно происходит в ответ на активацию каких либо проапоптотических путей. В этих комплексах даже низкой протеолитической активности прокаспаз оказывается достаточной для запуска автокаталитического разрезания собственных молекул и активации процесса апоптоза. В ходе активации происходит гидролиз проэнзима на большую и малую субъединицы. Сам фермент состоит из двух больших и двух малых субъединиц, которые образуют тетрагексамер с двумя активными центрами на противоположных концах молекулы (Jeon et al., 1999; Chang, Yang, 2000; Hengartner, 2000; Reed, 2000; Degterev et al., 2003).

Каспазы можно сгруппировать в 2 главных класса на основе длины их аминотерминального продомена. Каспазы с коротким продоменом действуют как эффекторы, которые осуществляют апоптоз, разрезая соответствующие субстраты. Каспазы с удлинённым продоменом являются «инициаторными». Этот удлинённый аминотерминальный домен, например,

у CED-3 служит для межбелковых взаимодействий при сборке в «апоптосомы». В зависимости от структуры продомена среди инициирующих каспаз выделяют протеазы с доменами DED (каспазы -8 и -10) и CARD (каспазы -1,-2, -4, -5, -9) (Wang, Lenardo, 2000; Degterev et al., 2003). У *C. elegans* необходимый адаптерный белок кодируется *ced-4*, но его способность активировать CED-3 блокируется белковым продуктом гена *ced-9*. Лишь в клетках, которые должны инициировать программу своей гибели, белок EGL-1 вытесняет белок CED-4 из комплекса с белком CED-9. Теперь свободный CED-4 взаимодействует с proCED-3 и образовавшийся комплекс CED-3 с CED-4 запускает ряд эффекторных белков, среди которых следует отметить эндонуклеазу NUC-1, которая разрушает ДНК по межнуклеосомным сайтам (Riedl, Shi, 2004).

Молекулярные механизмы программируемой клеточной гибели оказались очень сходными у представителей эволюционно далеких типов. У млекопитающих основные события апоптоза напоминают таковые у *C. elegans*, но реализация их сложнее и многообразней. У них также есть множество каспаз, и они в свою очередь регулируются различными гомологами и аналогами CED-4 - adaptor/scaffold белками, из которых наиболее эволюционно близким к белкам *C. elegans* является белок млекопитающих Araf-1 (Meier et al., 2000). Так каспазы млекопитающих – гомологи CED-3; Bcl-2 подобные белки- гомологи EGL-1; а также каспазо-активируемая ДНКаза CAD - гомолог NUC-1 (Wyllie, 1998; Reed, 2000; Borner, 2003; Lawen, 2003).

*Каспаза-3* (CPP32/Yama/Apopain) является главным эффектором апоптоза многих тканей у млекопитающих и имеет короткий продомен (Armstrong et al., 1997; Yuan, Yankner, 2000; Yakovlev et al., 2001; Liu et al., 2002). Ген каспазы-3 находится в длинном плече 4 хромосомы у человека (4q34) и в 16 хромосоме у крысы (Earnshaw et al., 1999).

В промоторе гена отсутствует ТАТА-бокс, но содержится кластер Sp1 элементов, а также множественные сайты инициации транскрипции. Анализ

последовательности промотора этого гена выявил также присутствие сайтов связывания для таких транскрипционных факторов как Ets-1, NIF, и SEBPB (Liu et al., 2002).

Неактивная форма каспазы-3 состоит из одной полипептидной цепи длиной 277 аминокислот (32кДа). Превращение в активную форму происходит в результате двух разрезов этой цепи. Одно отделяет продомен от большой субъединицы, а второе разделяет большую и малую субъединицы (Earnshaw et al., 1999). По субстратной специфичности каспаза-3 относится к подгруппе протеаз предпочтительно гидролизующих белки-мишени по карбоксиконцевой позиции мотива DEXD. Известными клеточными субстратами каспазы 3 являются структурные компоненты (такие как актин и ламинин ядерной оболочки), регуляторные компоненты (такие как ДНК-зависимая протеин киназа), ингибиторы ДНКаз (такие как DFF45 или ICAD), а также другие проапоптозные белки и каспазы (Shi, 2002). IAP белки являются естественными ингибиторами каспазы-3 (Deveraux, Reed, 1999). Сама каспаза-3 может активироваться различными индуцирующими каспазами (Hengartner, 2000).

Ключевыми регуляторами активации каспаз и, следовательно, апоптоза являются Bcl-2 подобные белки (Chao, Korsmeyer, 1998; Reed, 2000; Bouillet, Strasser, 2002; Borner, 2003; Degterev et al., 2003; Willis et al., 2003). Семейство Bcl-2 подобных белков состоит как из проапоптозных, так и антиапоптозных членов (Chao, Korsmeyer, 1998). В него входят три основные подгруппы, которые классифицируются согласно их анти- или проапоптозной функции, а также наличия консервативных структурных мотивов – BH доменов (the Bcl2 homology domain) (Benn, Woolf, 2004). Обнаружено 4 вида BH доменов, обозначаемых BH1, BH2, BH3, BH4. Антиапоптозные члены Bcl-2 семейства, такие как Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w и Mcl-1, типично имеют четыре BH домена (BH1-4). Белки второй проапоптозной мультидоменной подгруппы семейства обладают по крайней мере BH1 и BH2 доменами и группа включает Bax, Bak, Bok, Bcl-X<sub>S</sub>. В третью, наиболее

структурно разнообразную группу, входят проапоптозные белки только с BH3 доменом: Bim, Bid, Bcl-2-associated death protein (Bad), death protein 5/hara-kiri (DP5/Hrk), Puma, и Noxa. Белки этой подгруппы вызывают гибель клетки в ответ на разнообразные стимулы.

BH домены не имеют никакой ферментативной активности. Они опосредуют образование гомо- и/или гетеродимеров белков семейства между собой, а также с другими партнерами.

В клетке белки семейства Bcl-2 представлены в различных компартментах: в цитозоле, митохондриях, множественных внутриклеточных мембранных органеллах. У многих белков семейства есть трансмембранный домен (ТМ), с помощью которого происходит заякоривание в липидном бислое (Gross et al., 1999). Третичная структура у некоторых членов семейства напоминает порообразующие домены некоторых бактериальных токсинов (Jurgensmeier et al., 1998). Запуск программы гибели в ответ на сигнал зависит от баланса между различными членами Bcl-2 семейства внутри клетки (Akhtar et al., 2004)

*Bcl-2 X-связанный белок, L вариант* (Bcl-2 X-linked protein, L( Long) variant – Bcl-X<sub>L</sub>, он же – Bcl2l1 (Bcl-2-like1 protein), Bcl-X<sub>α</sub>).

Ген Bcl-X находится в 20 хромосоме у человека (20q11.21); и в 3 хромосоме у крысы (3q41.2). В промоторе Bcl-X есть сайты связывания транскрипционных факторов Est-2, Rel/NF-κB, STAT, AP-1, также расположено несколько +GRE сайтов (Gascoyne et al., 2003; Viegas et al., 2004) и два nGRE сайта (Surjit et al., 2011). Благодаря альтернативному сплайсингу возможны три варианта продуктов гена: Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-X<sub>β</sub> с антиапоптозной активностью, и Bcl-X<sub>s</sub> с проапоптозной активностью (Gonzalez-Garcia et al., 1995; Merry, Korsmeyer, 1997; Miller et al., 1997; Vekrellis et al., 1997). Bcl-X<sub>L</sub> высоко гомологичен Bcl-2 и экспрессируется на высоком уровне как в эмбриональных тканях, так и во взрослом организме (Akhtar et al., 2004).



У Bcl-X<sub>L</sub> есть С-концевой ТМ домен и все домены Bcl-2 гомологии. Сайт-направленный мутагенез в ВН доменах приводит к потере антиапоптозной функции Bcl-2 белков. Установлено что ВН1-ВН3 формируют гидрофобный карман, и ВН4 домен с N-конца стабилизирует эту структуру (Borner, 2003). Благодаря этому гидрофобному карману Bcl-X<sub>L</sub> может образовывать гетеродимеры с BAX, Bak, Bid и Bad.

*Bcl-2-ассоциированный x белок (Bcl-2 associated x protein) – BAX*, многодоменный проапоптозный член Bcl-2 семейства (Reed, 2000). Ген BAX находится в 19 хромосоме у человека (19q13.3-q13.4) и в хромосоме 1 у крысы (1q31.2). Промотор этого гена содержит 4 сайта связывания p53, а также потенциальные GRE элементы (Hoijman et al., 2004). Известно несколько вариантов продуктов гена: Bax-α (21 kDa), Bax-β (24 kDa), Bax-γ (4.5kDa), Bax-δ (16 kDa), Bax-ε (18kDa), Bax-κ (19 kDa) и Bax-ω (24 kDa). В ЦНС в основном экспрессируется Bax-α. Bax имеет 3 домена Bcl-2 гомологии: ВН1-ВН3 и трансмембранный домен ТМ (Goping et al., 1998). За счет большей мобильности своего ВН3 домена BAX может менять свою конформацию, что приводит к экспонированию домена на поверхности белка и связыванию его с антиапоптозными белками Bcl-2 семейства. ВН3 домен при образовании комплекса с Bcl-X<sub>L</sub> принимает структуру гидрофобной α-спирали. Эта спираль хорошо ложится в гидрофобный карман Bcl-X<sub>L</sub> с образованием гидрофобных и электростатических связей. Важная функция ВН3 домена состоит также и в связывании собственного ТМ домена, и тогда белок локализован в цитозоле (Borner, 2003). Изменение конформации освобождает ТМ домен от экранирования ВН3 доменом, и при этом происходит транслокации BAX из цитозоля во внешнюю мембрану митохондрий (Nechushtan et al., 1999; Wang, 2001). После транслокации BAX может олигомеризоваться и образовывать поры в мембране митохондрий *in vitro* (Jurgensmeier et al., 1998) и *in vivo* (Heidenreich, 2003). PI3K и АКТ блокируют олигомеризацию BAX в митохондриальной мембране. BAX способен также взаимодействовать с ионными каналами VDAC и ANT,

локализованными во внешней мембране митохондрий (Borner, 2003). Из-за образования пор и/или активации этих каналов BAX индуцирует высвобождение из митохондрий цитохрома c и некоторых каспаз (Smac\Diablo).

### ***1.3.5 Основные пути запуска апоптоза.***

Известно два основных пути, ведущих к осуществлению ПКГ путем апоптоза: внешний по отношению к клетке, инициируемый через рецепторы “смерти”, и внутриклеточный - митохондриальный (Heidenreich, 2003; Lawen, 2003).

Внешний путь инициируется внеклеточными «лигандами смерти» суперсемейства TNF, такими как TNF $\alpha$ , FasL/CD95L, TWEAK и TRAIL. Эти лиганды связываются с соответствующими рецепторами на поверхности клетки (TNFR, Fas/CD95, DR3, DR4/DR5). После связывания с лигандами рецепторы тримеризуются. С цитоплазматической стороны у рецептора имеется домен длиной 70-80 амк., называемый доменом смерти, который служит для связи тримеризованных рецепторов с адаптерными белками TRADD и/или FADD. Инициаторная каспаза-8 через пептид-пептидные взаимодействия своего DED участка связывается с адапторным белком и самоактивируется. Далее она активирует каспазу-3, которая и осуществляет процесс, ведущий клетку к гибели (Putchal et al., 2002; Ashe, Berry, 2003; Heidenreich, 2003; Riedl, Shi, 2004).

Внутриклеточный путь запускается после нарушения в клетке баланса анти- и проапоптозных членов Bcl-2 семейства в сторону активации апоптоза. Группу ранних индукторов этого пути составляют белки, имеющие только BH3 домен («BH3-only» белки). Предложено две модели действия этих белков. Одна из них, «модель замещения», основана на том, что BH3 пептиды, от разных «BH3-only» белков, имеют различную аффинность к разным Bcl-2-подобным антиапоптозным белкам (Chen et al., 2005; Kuwana et al., 2005; Certo et al., 2006). Подобная неоднородность межбелковых

взаимодействий позволяет предполагать, что для индукции апоптоза необходима одновременная активация некоторой комбинации «BH3-only» белков, которые инактивируют сразу все антиапоптозные белки Bcl-2 семейства в клетке, что и ведет к активации BAX. Согласно другой модели некоторые «BH3-only» белки непосредственно связываются с BAX и активируют его. Действительно показано что, BH3-пептиды, из «BH3-only» белков Bim и Bid, в присутствии BAX могут вызвать высвобождение цитохрома c (Hacker, Weber, 2007). Сами Bim и Bid могут быть нейтрализованы при связывании с Bcl-2-подобными антиапоптозными белками. Поэтому оказываются необходимыми и другие «BH3-only» белки, которые связывают Bcl-2-подобные антиапоптозные белки и предотвращают их действие по блокированию вызываемой Bim/tBid активации BAX.

Ключевым процессом внутреннего пути запуска апоптоза является опосредованное BAX высвобождение митохондриальных белков в цитозоль. Цитохром c, высвободившись из митохондрии, связывается с адаптерным белком Araf-1, активирующим после этого АТФ/дАТФ-зависимый гидролиз прокаспазы-9 в апоптосоме (Wang, 2001). Активная каспаза-9, оставаясь в составе апоптосомы, активирует каспазу-3, которая, как и при внешнем пути запуска апоптоза, осуществляет процесс, ведущий клетку к гибели (Budihardjo et al., 1999; Putcha et al., 2002; Ashe, Berry, 2003; Borner, 2003; Heidenreich, 2003).

### ***1.3.6 Апоптоз в развивающейся ЦНС.***

В ходе развития головного мозга на клеточном уровне происходит ряд последовательных и взаимосвязанных процессов: пролиферация, миграция, дифференцировка, формирование отростков и образование синаптических контактов (Oppenheim, 1991). Согласно результатам сравнительных анатомических и гистологических исследований ход развития головного мозга сходен у большинства млекопитающих. Развитие головного мозга крысы проходит те же этапы, что и развитие мозга человека, но в

значительно более сжатые сроки. Мозг новорожденного крысенка по стадии своего формирования соответствует мозгу плода человека на 22-24 неделе беременности, 3 дневного – на 28-29 неделе, 5-дневного – на 34-35 неделе, и только мозг 7-8 дневного крысенка соответствует стадии развития мозга новорожденного ребенка (Dobbing, Sands, 1979; Whitelaw, Thoresen, 2000; Fligel et al., 2002). Формирование структур головного мозга происходит гетерохронно. Так, нейроны ствола мозга крысы заканчивают свое формирование еще в эмбриональный период, а нейроны неокортекса и гиппокампа оформляются только в первые дни после рождения.

Для формирования правильных взаимосвязей между нейронами образуется большое количество нейрональных клеток-предшественников, значительное число которых не образовавших правильных контактов элиминируются в основном путем апоптоза (Johnson, Deckwerth, 1993; Meier et al., 2000; Sastry, Rao, 2000; Yuan, Yankner, 2000; Sun et al., 2003). У грызунов избыточные нейроны ЦНС утрачиваются в течение с 11-12 дня эмбрионального развития до раннего постнатального периода. В эти сроки селективная ПКГ происходит в различных регионах и популяциях нейроцитов по всей ЦНС. Более половины изначально образованных нейронов погибнет в ходе развития (Oppenheim, 1991). Замечено, что клетки наиболее интенсивно гибнут в зонах головного мозга с повышенной клеточной пролиферацией, тогда как в постмитотических регионах апоптоз встречается реже (Blaschke et al., 1996).

### ***1.3.7 Участие каспазы-3 и ВНЗ белков в синаптической пластичности.***

В последнее время появляется все больше исследований о неапоптозных функциях белков апоптоза (Li et al., 2010; Jiao, Li, 2011). Так было показано, что активация каспазы-3 по митохондриальному пути необходима для долговременной синаптической депрессии LTD и интернализации AMPA глутаматных рецепторов, которое может быть заблокировано оверэкспрессией

антиапоптозных белков XIAP или Bcl-xL, или мутантной формой белка Akt1, устойчивой к протеолизу каспазой-3 (Li et al., 2010). Каспаза-3, вовлеченная в LTD активируется через BAX-BAD каскад (Jiao, Li, 2011). В другом исследовании на зебровых амадинах было показано, что каспаза-3 необходима для консолидации памяти при запоминании этими птицами песен, а экспозиция новой мелодии приводила к быстрой активации каспазы-3 в дендритах (Huesmann, Clayton, 2006).

### ***1.3.8 Другие формы клеточной гибели.***

В последнее время появляется большое количество работ об идентификации новых форм клеточной гибели как программируемых, так и непрограммируемых и введением новых их названий (Gunther et al., 2013; Kaczmarek et al., 2013; Liu et al., 2013; Inoue, Tani, 2014; Newton et al., 2014; Vanden Berghe et al., 2014). Так были идентифицированы некроптоз (программируемый некроз), пироптоз, партонатоз, ферроптоз, окситоз и автоз (Gunther et al., 2013; Kaczmarek et al., 2013; Liu et al., 2013; Inoue, Tani, 2014; Newton et al., 2014; Vanden Berghe et al., 2014). Не совсем понятно какие же термины выдержат испытание временем и закрепятся в науке. Наиболее изученным из этих видов гибели является некроптоз (Kaczmarek et al., 2013).

Термин пироптоз был введен для описания атипичной гибели макрофагов, заражённых *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serova *Typhimurium* (Cookson, Brennan, 2001). Клетка погибала в результате осмотического шока в результате образования пор в плазматической мембране при активации каспазы-1, что сопровождалось нарушением градиентов ионов и быстрым высвобождением содержимого цитозоля во внешнюю среду (Fink, Cookson, 2006; von Moltke et al., 2013). Уникальная особенность этого каспазы-1 зависимого высвобождения содержимого состоит в высвобождении IL-1 $\beta$  и IL-18, которые вызывают воспаление и лихорадку (Brennan, Cookson, 2000).

TNF сигналинг может приводить как к апоптозу, так и к некроптозу (Kaczmarek et al., 2013; Vanden Berghe et al., 2014). Активация рецептора TNFR1 его лигандом TNF приводит к образованию комплекса RIPK1- и TRADD, который активирует NF-κB каскад и приводит к увеличению антиапоптозных белков A20 и Flip<sub>L</sub> (Kaczmarek et al., 2013; Vanden Berghe et al., 2014). Деубиквитилазная активность A20 по системе обратной связи приводит к ослаблению TNF индуцированного NF-κB сигнального пути. Затем другой белок CYLD деубиквитинилирует RIPK1, который в таком состоянии находился в комплексе с TNFR1-TRADD (Vanden Berghe et al., 2014). Снятие убиквитина с RIPK1 приводит к его диссоциации из этого комплекса и образованию DISC (death-inducing signalling complex) комплекса IIa, образование которого зависит от TRADD. В этот комплекс входят FADD (FAS-associated death domain), RIPK3, FLIP и прокаспазы-8. Считается что Flip<sub>L</sub>, экспрессия которого повышается NF-κB, формирует гетеродимеры с прокаспазой-8, затем расщепляет и инактивирует RIPK1, RIPK3 и CYLD, предотвращая некроптоз. В комплексе IIa две молекулы прокаспазы-8, образуя гомодимеры быстро подвергаются автопротеолизу, диссоциируют из этого TRADD- комплекса и в последующем активируют каспазы-3 и -7, что приводит к апоптозу (Gunther et al., 2013). Однако в условиях когда каспаза-8 не может выполнять свои функции либо из-за внутренних ингибиторов каспаз, либо вирусных белков в клетке, RIPK1 и RIPK3 ассоциируются автофосфолирируются и трансфосфолирируются, что приводит к их агрегированию в микрофиламентный комплекс некрсомы. В условиях ингибирования каспаз CYLD деубиквитинилирует RIPK1 в некрсоме, что приводит к дальнейшему рекрутированию MLKL (mixed lineage kinase domain-like). Фосфолирирование MLKL в некрсоме RIPK3 в последующем приводит к волне активации JNK (JUN N-terminal kinase), образованию активных форм кислорода и гибели клетки (Newton et al., 2014; Vanden Berghe et al., 2014).

Существуют также промежуточные и смешанные формы клеточной гибели, активируемые при различных условиях и патологиях с вовлечением многих вышеописанных механизмов. Одним из них является гибель нейронов ЦНС в результате гиперактивации нейротрансмиттером глутаматом своих рецепторов, наиболее распространённых в мозге.

#### **1.4 Клеточная гибель в результате эксайтотоксичности.**

Глутамат – основной возбуждающий нейромедиатор в нервной системе и несомненно важен для нейронального развития, синаптической пластичности, обучения и памяти. Регуляция глутаматэргической нейротрансмиссии критична не только потому что неправильный баланс глутамата и активности его рецепторов нарушают его сигнальные свойства, но также могут привести к клеточной гибели в результате эксайтотоксичности (Wang, Qin, 2010). Концепция токсического эффекта от массивного воздействия возбуждающих аминокислот впервые была предложена в 1969 Dr Olney и названа эксайтотоксичностью (Olney, 1969). Эксайтотоксичность может опосредовать потерю нейронов при патологиях, таких как ишемия и нейродегенеративные заболевания. Глутамат является аминокислотой. К возбуждающим аминокислотам также относятся эндогенные метаболиты: аспарагиновая кислота, хинолиновая кислота, гомоцистеиновая кислота, и кроме того экзогенные молекулы N-метил-D-аспартат (NMDA) и каинат, которые действуют через рецепторы глутамата (Doble, 1999).

##### ***1.4.1 Рецепторы глутамата.***

Рецепторы глутамата классифицируют на 3 ионотропных класса: NMDA, AMPA, каинатные и 3 метаботропных класса (Hollmann, Heinemann, 1994; Pin, Duvoisin, 1995). Ионотропные рецепторы являются лиганд активируемыми ионными каналами, которые открываются после связывания с глутаматом, что приводит к входящему току ионов натрия и/или кальция и выходящему току калия (Wang, Qin, 2010). Метаботропные рецепторы

принадлежат к суперсемейству рецепторов, сопряженных с G белками. Активация метаботропных рецепторов приводит к увеличению уровня цАМФ и высвобождению  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо (Arundine, Tymianski, 2004).

NMDA рецепторы представляют собой тетрагетеромеры, проницаемые для натрия, калия, цинка и кальция. При потенциале покоя ионы магния блокируют пору канала. NMDA рецептор, активированный лигандом высвобождает магний и открывает канал для ионов  $Ca^{2+}$ , что приводит к постсинаптической деполяризации и потенциалу действия. NMDA рецепторы играют главенствующую роль в эксайтотоксичности, так как кальций вошедший через гиперактивированные NMDA рецепторы является основной причиной клеточной гибели по сравнению с  $Ca^{2+}$ , поступающим через потенциал активируемые кальциевые каналы (Cristofanilli, Akopian, 2006). Помимо изменений в уровне кальция сверхактивация NMDA рецепторов приводит к деполяризации митохондриальной мембраны, увеличению свободных радикалов и активации каспаз (Liot et al., 2009).

AMPA рецепторы проницаемы для натрия, калия, цинка и иногда для кальция. Эффективность проницаемости для ионов кальция через AMPA рецепторы зависит от комбинации субъединиц, составляющих гетеромерный рецептор (Burnashev et al., 1992). Присутствие субъединицы GluR2, в которой произошло редактирование РНК, как это происходит в большинстве AMPA экспрессирующих клеток, делает гетеромерный рецептор в основном непроницаемым для кальция (Kohr et al., 1998). Но кальций не проводящие AMPA рецепторы все еще могут вызвать эксайтотоксичность, позволяя натриевому току деполяризовать мембрану, что приводит к активированию NMDA рецепторов (Carriedo et al., 1996).

Каинатные рецепторы – гетеромерные рецепторы, проницаемые для натрия, калия и иногда для кальция (Dingledine et al., 1999). Эксайтотоксичность может усиливаться при активации каинатных рецепторов из-за высвобождения глутамата и входящего тока натрия,



деполяризующего мембрану и снимающего магниевую блокаду NMDA рецепторов, что активирует эти рецепторы (Berman, Murray, 1997). Эксайтотоксичность в результате стимуляции каинатных рецепторов происходит в основном по пути апоптоза, чем по пути некроза, иногда наблюдаемого при NMDA опосредованной клеточной гибели. В дополнение, сверх стимуляция не-NMDA рецепторов каиновой кислотой вызывает аутофагию и активирует лизосомальные ферменты, играющие важную роль в процессе эксайтотоксичности (Wang et al., 2008).

Метаботропные рецепторы глутамата разделяются на 3 семейства, на основании фармакологических свойств, пути передачи сигнала и аминокислотной последовательности (Wang, Qin, 2010). Рецепторы первого семейства mGlu регулируют кальциевые, калиевые и неселективные катионные каналы, так же как и каналы NMDA и AMPA рецепторов, что может влиять на разрядную активность нейронов (Collin et al., 2009). Рецепторы семейства 1 mGlu потенцируют активацию NMDA рецепторов, влияя на возбуждающую нейротрансмиссию и синаптическую пластичность (Collin et al., 2009). Рецепторы семейства 2 и 3 mGlu ингибируют различные кальциевые каналы и пресинаптическое высвобождение нейромедиаторов (Anwyl, 1999). Стимуляция глутаматных метаботропных рецепторов приводит к гибели нейронов стриатума по механизму, имеющему биохимическое сходство с апоптозом (Wang et al., 1997). Стимуляция рецепторов семейства 1 возбуждает нейроны и активирует NMDA рецепторы и вызывает эксайтотоксичность, а стимуляция рецепторов семейства 2 и 3 наоборот имеет нейропротективный эффект и ингибирует высвобождение глутамата (Wang, Qin, 2010).

#### ***1.4.2 Смешанные формы клеточной гибели при эксайтотоксичности.***

Гибель нейронов в результате эксайтотоксичности - не однородное явление, а скорее континуум некроза, апоптоза и аутофагии (Wang, Qin,

2010). Ранние этапы индуцированной эксайтотоксичностью гибели клеток характеризуются их набуханием, вакуоляризацией цитоплазмы и разрушением мембраны. Такие признаки характерны для элиминации клеток по пути некроза (Golstein, Kroemer, 2007). В дальнейшем выяснили, что при эксайтотоксичности также наблюдается интернуклеасомная деградация ДНК, фрагментация и конденсация хромосом и активация каспаз, что характерно для апоптоза (Pohl et al., 1999). Поэтому в настоящее время общепринято, что гибель клеток вызванная эксайтотоксичностью – смешанная форма некроза и апоптоза (Martin et al., 1998).

Предполагается, что аутофагия также может быть возможным механизмом клеточной гибели при эксайтотоксичности. Маркеры аутофагии возрастают в ответ на острый эксайтотоксический инсульт в культивируемых гиппокампальных срезах и *in vivo* (Zhang et al., 2009). Клеточная смерть, вызываемая каинатом или агонистом NMDA рецепторов, также сопровождается увеличением числа аутофагосом, аутофагосомных маркеров beclin-1, microtubule associated protein light chain 3 (LC3-II) и лизосом (Wang et al., 2009). Каинат активирует лизосомальный фермент - катепсин В. Ингибиторы катепсинов и аутофагии могут спасти нейроны стриатума от гибели, вызванной каинатом (Wang et al., 2006).

#### ***1.4.3 Роль внутриклеточного баланса ионов в механизме эксайтотоксичной гибели клеток.***

Долговременная сверхстимуляция рецепторов глутамата приводит к перенасыщению постсинаптических нейронов ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Na}^{+}$  (Rothman, Olney, 1995). Входящий ток ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через потенциал-зависимые и независимые каналы может усиливать перегруженность нейронов  $\text{Ca}^{2+}$  при эксайтотоксичности (Xiong et al., 2004). Высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий также вносит вклад в поддержание высокого уровня  $\text{Ca}^{2+}$ .

Из нейронов  $\text{Ca}^{2+}$  выводится кальциевым насосом плазматической мембраны (PMCA) и  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  обменным насосом (NCX). PMCA имеет

высокую аффинность к  $\text{Ca}^{2+}$ , но маленькую транспортную емкость, в то время как NCX имеет высокую емкость транспорта  $\text{Ca}^{2+}$ , но имеет низкую аффинность к нему (Carafoli et al., 2001). Блокировка вывода кальция достаточна чтобы вызвать устойчивое повышение цитоплазматического кальция и привести к гибели клеток путем активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых гидролитических ферментов, включая членов семейства калпаиновых протеаз. В культурах гранулярных нейронов NCX расщепляется, после добавления глутамата (Philipson, Nicoll, 2000). Протеолиз изоформы-3 NCX калпаином играет существенную роль в необратимом повышении уровня внутриклеточного кальция, приводящему клетки к гибели (Nicoll et al., 1996).

Концентрация ионов  $\text{Cl}^-$  также является важным компонентом острого эксайтотоксического ответа в нейронах (Wang, Qin, 2010). Чрезмерная деполяризация клеточной мембраны нарушает осмотический баланс, которому противодействует вход  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  и воды, что также провоцирует лизис клетки (Inglefield, Schwartz-Bloom, 1998). Вход ионов  $\text{Cl}^-$  при эксайтотоксическом поражении опосредуется несколькими путями, одним из них является  $\text{GABA}_A$  рецептор (Van Damme et al., 2003). Блокада входа в клетку  $\text{Cl}^-$  через  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  обменник или  $\text{GABA}$  рецепторы эффективно защищает клетки от эксайтотоксичности (Babot et al., 2005). Также возможно участие других анионных каналов в эксайтотоксическом токе ионов  $\text{Cl}^-$  (Wang, Qin, 2010). В культивируемых кортикальных нейронах объемно-чувствительные хлорные каналы, но не  $\text{GABA}_A$  рецепторы или  $\text{Cl}^-$ -транспортеры, обеспечивают транспорт анионов при регуляции объема (Inoue, Okada, 2007).

#### ***1.4.4 Роль митохондрий в эксайтотоксической гибели клеток.***

В нейронах, погибающих от эксайтотоксичности хорошо выражены морфологические изменения органелл: набухание эндоплазматического ретикулума, везикуляция аппарата Гольджи, разрушение митохондрий и возрастание числа лизосом (Wang, Qin, 2010). Повреждения митохондрий

имеют колоссальное воздействие на клеточную энергетику и эксайтотоксическую гибель нейронов. Перегрузка клетки митохондриальным  $\text{Ca}^{2+}$  в результате сверхстимуляции глутаматных рецепторов, ассоциирована с образованием супероксида и высвобождением проапоптозных белков (Nicholls, Ward, 2000). В ходе эксайтотоксичности дисфункция митохондрий обуславливает инверсию мембранного потенциала этой органеллы и возрастание образования в ней свободных форм кислорода (ROS) (Nicholls, Ward, 2000).

Митохондрии могут служить депо для большого количества ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , что и является фактором риска их дисфункции (Atlante et al., 2001). Активация NMDA рецепторов вызывает быстрое возрастание поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями, что приводит к их деполяризации (Peng, Greenamuge, 1998). Чрезмерный поток ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через NMDA рецепторы смещает потенциал митохондриальной мембраны и приводит к открытию в ней пор (permeability transition pore - PTP) (Fiskum et al., 2003). Нарушение потенциала митохондрий из-за излишнего  $\text{Ca}^{2+}$  снижает синтез АТФ (Fiskum et al., 2003). Функция митохондрий – первое, что поражается при эксайтотоксичности. Зависимое от NMDA рецептора временное повышение кальция в митохондриях может инициировать окислительный стресс и ингибировать митохондриальное дыхание. Оба фактора далее ускоряют дерегулирование уровня  $\text{Ca}^{2+}$  – неспособность клетки поддерживать низкую концентрацию свободного кальция в цитоплазме (Castilho et al., 1998).

#### ***1.4.5 Эндоплазматический ретикулум и эксайтотоксичность.***

Эндоплазматический ретикулум (ЭР) – органелла ответственная за синтез протеинов и липидов, правильный фолдинг и сортировку белков клетки. Функции ЭР могут быть нарушены аккумуляцией незрелых белков или изменением в кальциевом гомеостазе (Boyse, Yuan, 2006). Нарушения в работе ЭР вызывает экспрессию шаперонов, приостанавливает трансляцию и активирует ЭР-ассоциированную деградацию белков (Banhegyi et al., 2008).

Это происходит из-за активации ЭР сенсорных белков, контролируемых шапероном Bip/Grp78 (Banhegyi et al., 2008). ЭР стресс приводит к активации РНК-зависимой протеинкиназы (PKR)-like PERK, eIF2a киназы, транскрипционного фактора 6 ATF6, и инозитол зависимого фермента 1 (IRE1), которые в свою очередь активируют различные сигнальные каскады в ответ на ЭР стресс (Ma et al., 2002). Мало известно о точных механизмах, ответственных за активацию ЭР стресса после массивной стимуляции NMDA рецепторов. По некоторым данным, перегрузка внутриклеточным кальцием и усиленное образование NO, опустошают кальций в ЭР и приводят к ЭР стрессу (Oyadomari et al., 2002). NO индуцирует нитрозилирование изомераз, ассистирующих в созревании и транспорте незрелых секреторируемых белков в ЭР. Нитрозилированная форма изомераз обладает меньшей ферментативной активностью и индуцирует клеточную гибель по пути ЭР стресса (Oyadomari et al., 2002). Нейротоксичность, индуцированная NMDA рецепторами может частично включать в себя эффекты механизма ЭР стресса (Shimazawa et al., 2007).

#### ***1.4.6 Роль лизосом в эксайтотоксической гибели клеток.***

Лизосомы содержат гидролитические ферменты, такие, как катепсины, необходимые для компонентов переваривания клетки. Показано, что некоторые катепсины могут напрямую или опосредовано активировать каспазы. Непрямой механизм состоит в расщеплении проапоптозного регулятора BID катепсином В, что приводит к транслокации его в митохондрии и высвобождению цитохрома С. Активация FAS/APO-1 рецепторов приводит к снижению клеточного рН и возможно к лабильности лизосом, и попаданию её ферментов в цитоплазму клетки, что может происходить на начальных стадиях апоптоза (Brunk et al., 2001).

Цистеиновые протеазы из семейства каспаз играют определяющую роль в этом процессе. Однако появляется все больше свидетельств, что лизосомные протеазы также вовлечены в апоптоз (Turk et al., 2002). Данные Kazuyoshi

Tominaga показывают, что эксайтотоксическая гибель нейронов ассоциирована с активацией катепсина E (Tominaga et al., 1998). Лизосомальный фермент катепсин B вовлечен в кайнат-индуцированную гибель нейронов стриатума (Wang et al., 2006).

В апоптозе участвуют не только лизосомальные, но и аутофагические механизмы. Апоптотическая и аутофагическая гибель клеток вовлечены в потерю нейронов при эксайтотоксичности и нейродегенеративных заболеваниях (Pan et al., 2008), что свидетельствует об общности некоторых молекулярных путей, по которым реализуются эти процессы (Gonzalez-Polo et al., 2005; Mei et al., 2014). Апоптоз сопровождается ранним и значительным увеличением количества аутофагосомных-лизосомных компартментов. Аутофагия может блокироваться ингибиторами апоптоза, а так же оверэкспрессией белка Bcl-2 (Canu et al., 2005). 3-Метилаланин (3-МА) – ингибитор аутофагии также блокирует апоптоз. Нейропротективный эффект 3-МА также сопровождается блокированием высвобождения цитохрома c из митохондрий и ингибированием активации каспазы-3, скорее всего осуществляемой катепсином B, так как SA074-Me селективный ингибитор этого фермента полностью блокирует процессинг прокаспазы-3 (Canu et al., 2005).

### **1.5 Влияние глюкокортикоидов на апоптоз.**

Ряд известных эффектов перенесенного стресса, а также воздействия глюкокортикоидов в раннем онтогенезе могут быть обусловлены влиянием этих гормонов на процессы ПКГ. Однако имеющиеся в литературе сведения о влиянии глюкокортикоидов на ПКГ путем апоптоза крайне разнородны. Влияние глюкокортикоидов на апоптоз зависит как от дозы гормона и его специфичности к GR и MR рецепторам, так и от типа клеток.

Глюкокортикоиды индуцируют апоптоз клеток многих периферических тканей: лимфоцитов (Ashwell et al., 2000; Czock et al., 2005), эозинофилов (Czock et al., 2005), миобластов и остеобластов (Chae et al., 2000), остеоцитов

(Manolagas, 2000), хондроцитов (Chrysis et al., 2005), клеток Лейдига (Gao et al., 2002), клеток ряда гормонзависимых опухолей: остеосаркомы, лимфомы, миеломы (Chauhan et al., 1997; Greenstein et al., 2002).

Но глюкокортикоидные гормоны могут выступать в качестве супрессоров ПКГ в некоторых органах, тканях и опухолях. (Costas et al., 2000; Amsterdam et al., 2002).

В настоящее время считается, что различия эффектов глюкокортикоидов и их аналогов на ПКГ в мозге могут быть связаны с неодинаковой функцией каждого из двух типов рецепторов этих гормонов в регуляции апоптоза. Предполагается, что MR ответственны за антиапоптозные, а GR - за проапоптозные эффекты глюкокортикоидов (Gass et al., 2000; Abraham et al., 2001; Roy, Sapolsky, 2003). Стимуляция MR рецепторов в гиппокампе приводит к смещению баланса мРНК и белков Bcl-2 семейства в пользу антиапоптозных членов, тогда как стимуляция GR рецепторов смещает это соотношение в пользу проапоптозных членов (Almeida et al., 2000). Блокатор GR рецепторов мифепристон предотвращает потерю клеток в гиппокампе, индуцированную механическим повреждением (McCullers et al., 2002). Однако имеются и данные, противоречащие этой точке зрения. Адреналэктомия, которая лишает MR рецепторы клеток гиппокампа их естественного стимулятора, приводит к снижению в этой структуре уровней как антиапоптозных членов Bcl-2 семейства, так и проапоптозного белка BAX (Greiner et al., 2001).

Данные о влиянии глюкокортикоидов на апоптоз клеток формирующегося мозга немногочисленны, так же как и данные по периферическим тканям и не поддаются простой интерпретации.

Действие глюкокортикоидов на головной мозг взрослых животных наиболее изучено для клеток гиппокампа. Дексаметазон способен индуцировать апоптоз стволовых клеток гиппокампа у взрослых животных (Son et al., 2005). Было также показано, что введение дексаметазона приводило к активации апоптоза в отдельных зонах гиппокампа у взрослых

крыс (Hassan et al., 1996; Haynes et al., 2001). Адреналэктомия взрослых лабораторных грызунов вызывает увеличение ПКГ в зубчатой извилине, введение кортикостерона на этом фоне предотвращает апоптоз нейронов, а введение дексаметазона нет (Sloviter et al., 1995; Abraham et al., 2001; Greiner et al., 2001).

Повышение уровня кортикостерона у неонатальных крысят увеличивало число TUNEL-позитивных клеток в коре мозга и мозжечке (Zhang et al., 2002). В первичной культуре клеток неонатального гиппокампа глюкокортикоиды индуцируют апоптоз нейральных клеток предшественников (NPC), экспрессирующих нестин, а также гибель незрелых нейронов (Yu et al., 2010). В экспериментах *in vivo* с трехкратным введением дексаметазона неонатальным крысятам наблюдался апоптоз клеток предшественников субвентрикулярной зоны (SVZ) неокортекса и в зубчатой извилине гиппокампа. Нестин/PSA-NCAM экспрессирующие мультипотентные предшественники были более подвержены гибели (Bhatt et al., 2013). Дексаметазон вызывает апоптоз и дифференцированных нейронов (Zuloaga et al., 2011; Zuloaga et al., 2012). Введение дексаметазона беременным самкам крыс с 18-го дня беременности до рождения приводило к повышению числа клеток, позитивных по активной каспазе-3 в медиальной и базомедиальной миндалине потомков обоего пола (Zuloaga et al., 2011). Постнатальное введение дексаметазона на 4-6 день жизни также приводило к повышению количества клеток позитивных по активной каспазе-3, но достоверной значимости эффект достигал только в центральном ядре амигдалы у самок. Двойная иммуногистохимия показала что все клетки, позитивные по активной каспазе-3 являются зрелыми нейронами, экспрессирующими нейрональный маркер NeuN. Большая часть этих нейронов имеет ГАВА-эргический кальцийсвязывающий фенотип: экспрессируют кальбиндин и кальретенин. Изменения в экспрессии активной каспазы-3 соответствовало повышению мРНК ВАХ в миндалине (Zuloaga et al., 2011).



В гиппокампе, введение дексаметазона на E18-22 и P4-6 приводит к увеличению числа клеток позитивных по активной каспазе-3 в CA1, а также в паравентрикулярном ядре гипоталамуса (Zuloaga et al., 2012).

Введение дексаметазона вызывает гибель клеток предшественников внешнего гранулярного слоя мозжечка у мышей в неонатальный период. Повышение проапоптозного белка Bcl-2 семейства Puma, после введения гормона, приводило клетки к гибели (Noguchi et al., 2008). Хроническое введение дексаметазона в неонатальный период P0-P7 ингибировало Shh-индуцированную пролиферацию клеток внешнего гранулярного слоя мозжечка, а также экспрессию N-мис, Gli1, циклина D-типа. Shh противодействует эффекту глюкокортикоидов индуцируя 11-бета-гидроксистероиддегидрогеназу 2-го типа (Heine, Rowitch, 2009).

## **1.6 Гипоксия и глюкокортикоиды.**

### ***1.6.1 Транскрипционные факторы индуцируемые гипоксией HIF.***

Транскрипционные факторы семейства HIF занимают основную роль в регуляции гомеостаза кислорода от нематод до человека (Schofield, Ratcliffe, 2004; Fan et al., 2014). Исследование молекулярного пути активации экспрессии эритропоэтина в ответ на гипоксию привело к открытию HIF (Schofield, Ratcliffe, 2004). HIF это гетеродимерный транскрипционный фактор который состоит из двух основных транскрипционных факторов PAS семейства с мотивом спираль-поворот-спираль: HIF $\alpha$  и HIF $\beta$ . Димер HIF $\alpha$ / $\beta$  связывается с коровым мотивом G/ACGTG в респонсивном элементе к гипоксии (HRE) (Schofield, Ratcliffe, 2004; Fan et al., 2014). Субединица HIF $\beta$  конститутивный ядерный белок, который участвует в транскрипции (Brocato et al., 2014). Субединица HIF $\alpha$  высоко индуцибельна от действия гипоксии (Brocato et al., 2014). Существуют три формы субединицы HIF $\alpha$ : HIF $\alpha_{1,2,3}$ , которые кодируются разными генами (Schofield, Ratcliffe, 2004). В присутствии кислорода эти субединицы подвергаются гидроксилированию и деградации протеазами (Schofield, Ratcliffe, 2004; Brocato et al., 2014).

Находясь под жестким протеолитическим контролем, зависимым от концентрации кислорода, эти транскрипционные факторы могут регулировать работу генов в ответ на гипоксию (Schofield, Ratcliffe, 2004; Brocato et al., 2014; Fan et al., 2014).

### ***1.6.2 Гипоксия и глюкокортикоиды.***

В настоящее время на модели гипоксии-ишемии у крыс имеется ряд сведений о модулирующем влиянии глюкокортикоидов при таком воздействии. Показано, что предварительное трехкратное введение дексаметазона в дозах от 0.01 до 0.5 мг\кг ежедневно снижает объем гипоксического поражения ткани мозга (Tuor et al., 1993a). Предварительное введение естественного гормона кортикостерона и другого синтетического агониста глюкокортикоидных рецепторов метилпреднизолон в эквивалентных дозах также приводило к нейропротективному эффекту в зоне поражения (Tuor et al., 1995; Tuor, Del Bigio, 1996). Даже однократное введение дексаметазона оказывало нейропротективное действие, однако лишь при введении гормона в период от 4 до 24 часов до воздействия гипоксии-ишемии (Tuor et al., 1993a; Tuor et al., 1995; Tuor, 1997; Tuor et al., 1997). При этом введение дексаметазона уже после гипоксии-ишемии не оказывает защитного действия. Защитное действие гормона ослабляется при увеличении длительности гипоксического-ишемического воздействия (Tuor et al., 1995), а также с увеличением возраста, в котором животные испытали это воздействие (Tuor et al., 1995; Tuor, 1997).

Защитное действие гормона проявляется не только в ближайший к гипоксическому-ишемическому воздействию период, но и в последующей жизни. Так, взрослые животные, перенесшие в неонатальном периоде гипоксию-ишемию, имели серьезные нарушения процессов внимания и памяти, тогда как животные, которым инъецировали дексаметазон, не отличались по этим характеристикам от интактных (Ikeda et al., 2002).

Механизм защитного действия гормона остается неясным. Конечно, он обусловлен специфическим влиянием гормона на свои рецепторы (Tuor et al., 1993a; Ekert et al., 1997), поскольку предварительная блокада GR их ингибитором RU38486 полностью предотвращала нейропротекторные эффекты дексаметазона (Tuor, Del Bigio, 1996). Вместе с тем этот механизм, очевидно, не связан с такими последствиями гормонального воздействия как повышение уровня глюкозы в крови, изменение гемодинамики или генерации свободных радикалов. Показано, что увеличение уровня глюкозы в крови до значений, индуцируемых дексаметазоном, не дает нейропротективных эффектов (Tuor et al., 1993b). Глюкокортикоиды также не влияют на частоту сердечных сокращений, перфузию тканей мозга во время гипоксии-ишемии (Tuor et al., 1993a) и генерацию свободных радикалов.

По-видимому, совместное действие дексаметазона и гипоксии осуществляется через глюкокортикоидные и NIF рецепторы (возможно через их взаимодействие), которые регулируют экспрессию зависимых генов, непосредственно связанных с регуляцией жизнеспособности клеток мозга.

Рассмотренные в обзоре литературные данные свидетельствуют о многогранном влиянии глюкокортикоидных гормонов на апоптоз. В свете очевидной необходимости применения этих гормонов для предотвращения респираторного дистресс синдрома новорожденных, который сопровождается гипоксией, а также, учитывая их возможные негативные побочные эффекты, представляется важным выяснить влияние как повышенного уровня глюкокортикоидов, так и комплексного фактора «гипоксия + глюкокортикоиды», на процессы ПКГ путем апоптоза в формирующемся головном мозге.

## **Глава 2. Материалы и методы.**

---

### **2.1 Экспериментальные животные.**

В экспериментах использовались крысы линии Wistar, содержащиеся в стандартных условиях вивария ИЦИГ СО РАН: при температуре 22-24 °С, естественном освещении и свободном доступе к воде и корму. Все процедуры проводились в соответствии с Международными Европейскими Биоэтическими стандартами (86/609-ЕЕС), Российскими правилами работы над лабораторными животными (N 267 19.06.2003) и были разрешены биоэтическим комитетом ИЦИГ СО РАН. Для получения крысят с датированным сроком рождения по три самки ссаживали с самцом. Через 2 недели самок рассаживали по одной в клетку. День родов считали первым днем жизни крысят. Для определения мРНК методом РТ-ПЦР каждая группа состояла из 10-12 крысят, а при иммуногистохимическом анализе – из 7-8 животных.

### **2.2 Введение препаратов и воздействие гипоксией**

На третий день жизни крысятам из разных групп в 20-ти мкл физиологического раствора подкожно вводили: либо 0,2 мг/кг дексаметазона (Dexamethasone phosphate, KRKA, Словения), либо эквивалентный объем физиологического раствора. Часть крысят оставляли без каких-либо инъекций. Через 1, 2, 6 и 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 или 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 каждой вышеперечисленной группы, вызывали гипоксию, помещая их на 15 минут в атмосферу 100% азота, которая

создавалась в аппарате из оргстекла (260 x 70 x 50) при постоянной скорости подачи газа ( $6 \pm 1$  л/мин) и температуре ( $36 \pm 1$  °С). Другая половина животных оставалась на воздухе – в условиях нормоксии.

### **2.3 Выделение образцов ткани мозга и приготовление его срезов для гистологического анализа.**

После извлечения мозга из черепной коробки на холоду выделяли гиппокамп, и фронтальную кору. Эти образцы ткани сразу помещали в жидкий азот и в дальнейшем они были использованы для выделения тотальной РНК и иммуноблота.

Для иммуногистохимического исследования проводили транскардиальную перфузию. Крысят наркотизировали авертином. Сначала крысенка перфузировали 25 мл PBS, затем 30мл фиксирующего раствора 4% PFA в PBS. После этого извлекали целый мозг, и постфиксировали его ночь в 4% PFA в PBS.

Затем мозг промывали трижды по 10 минут в PBS, и помещали в 15 % и 30 % сахарозу последовательно на ночь. После чего мозг замораживали при температуре  $-40^{\circ}$  С в изопентане. Срезы мозга (18 мкм) приготавливали на криостате при температуре  $-23^{\circ}$  С и монтировали их на стекла super frost plus (Menzel Glass). Границы анатомических структур мозга крысы определяли по атласу (Paxinos, Watson, 1998).

### **2.4 Окраска по Нисслю.**

Криосрезы вначале постфиксировали 15 минут в метаноле. Затем окрашивали в течение 10 мин в 0.1% Крезил виолете (Cresyl violet). Дифференцировали в 95% этаноле в течении 2-6 мин. Дегидратировали через серию спиртов и ксилолов и заключали в бальзам.

## **2.5 Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга.**

Иммуногистохимическое исследование головного мозга проводили в соответствии с общепринятой методикой с небольшими модификациями (Whiteside, Munglani, 1998). После приготовления срезы высушивали на воздухе в течение ночи. Далее их промывали 15 мин в PBS. Затем 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 течение часа в PBST.

Для выявления на срезах белков интереса срезы мозга инкубировали с первичными антителами (см. Таблицу 3.) в течение ночи при +4°C. Антитела разводили в PBS, содержащим 1.5 % BSA и 0.2% Triton X-100. Для контроля специфичности иммуногистохимического окрашивания вместо антител использовали 1.5% BSA.

После инкубации с первичными антителами срезы промывали дважды по 15 минут в PBS с 0.2% тритоном и инкубировали со вторичными антителами (см. Таблицу 3.) в течении часа при комнатной температуре. Затем дважды промывали. При использовании флуоресцентно меченных вторичных антител для колокализационных исследований препараты заключали в мовиол содержащий DAPI.

При использовании пероксидазного метода после инкубации с биотинилированными вторичными антителами срезы инкубировали час при комнатной температуре со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (Abcam, UK) в разведении 1:1000. 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 0.2М трис-буфере pH 7.54. Затем срезы обезвоживали в возрастающих концентрациях спиртов и ксилоле, заключали в бальзам.

Таблица 3 Антитела и вторичные реагенты, использованные в работе.

Мишень	Фирма производитель	Первичное-вид хозяина/Вторичное антитело-метка	Разведение
Активная каспаза-3	Cell signaling	Первичное-кролик	1:100-1-200
Satb2	Santa Cruz	Первичное-мышь	1:100-1-200
Nurr1	Santa Cruz	Первичное-мышь	1:100-1-200
GR(H300)	Santa Cruz	Первичное-кролик	1:100-1-200
Кальретенин	Santa Cruz	Первичное-мышь	1:100-1-200
GFAP	Millipore	Первичное-мышь	1:100-1-200
C-fos	Cell Signaling	Первичное-кролик	1:100-1-200
IgG кролика	Jackson immunoresearch	Вторичное-осел-Alexa 488	1:300
IgG кролика	Jackson immunoresearch	Вторичное-осел-Alexa 594	1:300
IgG мыши	Jackson immunoresearch	Вторичное-осел-Alexa 488	1:300
IgG мыши	Jackson immunoresearch	Вторичное-осел-Alexa 594	1:300
IgG мыши	Jackson immunoresearch	Вторичное-осел-Alexa 405	1:50-1:200
IgG мыши	Invitrogen	Вторичное-коза-Alexa 568	1:300
IgG козы	Jackson immunoresearch	Вторичное-осел-Alexa 594	1:300
IgG кролика	Santa cruz	Вторичное-коза- биотин	1:300
Биотин	Abcam	Вторичный реаг.- пероксидаза	1:300
Биотин	Invitrogen	Вторичный реаг.- Alexa 568	1:300
Биотин	Jackson immunoresearch	Вторичный реаг.- Alexa 488	1:300

## **2.6 TUNEL-метод.**

Для детекции на срезах фрагментации ДНК, происходящей при апоптозе, использовался TUNEL-метод 3' концевое мечение ников с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазы и dUTP, меченного биотином. Криосрезы высушивали ночь при комнатной температуре, затем промывали в 1x PBS с 0.2% Triton X-100 (PBST) 2x10 мин. Инкубировали с протеиназой К 0.5 µg/ml в этом же буфере в течении 10 мин. Протеиназу деактивировали 2% глицином в 1xPBS. Реакцию проводили 1 час при 37°C 50 nmol/ml biotin-11-dUTP 500-750U/ml терминальной трансферазы. Затем реакцию останавливали 15 мин в 4xSSC буфере.

Для колокализации TUNEL позитивных клеток с маркерами после остановки реакции срезы промывали 1xPBST 2x10 мин и блокировали неспецифическое связывание 1.5% BSA в PBST. Иммуноокрашивание осуществляли по протоколу приведенному в пункте 2.5 Биотинилированные нуклеотиды визуализовывались инкубацией с флуоресцентно меченным стрептавидином (Таблица 3).

## **2.8 Микроскопия**

Гистологические препараты исследовали в световом микроскопе Carl Zeiss "Axioskop" 2 Plus и автоматической камерой AxioCam, а также конфокальном микроскопе LSM 780 (Zeiss). Определяли количество иммунопозитивных клеток в исследуемой области (4 не соседних среза на животное).

Панорамные изображения монтировали с помощью программы Adobe Photoshop.

Для колокализационных экспериментов препараты исследовали на конфокальном микроскопе LSM 780 фирмы Carl Zeiss. Основные коэффициенты колокализации (Zinchuk, Grossenbacher-Zinchuk, 2011) определяли с помощью программы ZEN (Zeiss)



## 2.7 Выделение РНК.<sup>1</sup>

Выделение суммарной РНК проводили одностадийным гуанидин-изотиоцианатным методом (Chomczynski, Sacchi, 1987). Ткань мозга гомогенизировали в 5 объемах, относительно веса образца, охлажденного лизирующего буфера, содержащего 4М гуанидинизотиоцианат, 0.7М цитрат натрия (рН 7.0), 10% саркозил, β-меркаптоэтанол, 2М ацетат натрия (рН 4.32), водонасыщенный фенол (рН 4.0), хлороформ. После 3-х минут встряхивания, смесь охлаждали 15 минут на льду, затем 15 минут центрифугировали (14000g, 4°C). Осаждение РНК из водной фазы проводили изопропанолом при -20°C. Полученный осадок дважды промывали 75% этанолом, однократно – 96% этанолом, затем растворяли в автоклавированной деионизованной воде. Концентрацию РНК и степень её очистки от белков и компонентов лизирующего буфера определяли на спектрофотометре при соответствующих длинах волн: 260, 280 и 230 нм.

## 2.8 Оценка уровня мРНК каспазы-3 и c-fos методом ПЦР-РВ.

Синтез первой цепи кДНК проводили, используя в качестве матрицы выделенную РНК. 5мкг РНК инкубировали с 200нг oligo(dT)-праймера и 50U обратной транскриптазы М-MuLV в 20 мкл фирменного буфера в течение 90 минут при 42°C. Затем фермент инактивировали 15 минут при 70°C.

Количественный анализ изменения содержания мРНК каспазы-3 и c-fos проводили методом ПЦР в реальном времени (real-time PCR) с использованием технологии TaqMan на амплификаторе ABI Prism 7000 (“Applied Biosystems”, США).

Определение уровня мРНК генов β-актина, каспазы-3 и c-fos проводилось с использованием наборов TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, США) **c-fos**: Rn02396759\_m1, **caspase-3**: Rn00563902\_m1, **beta-actin**: Rn00667869\_m1

---

<sup>1</sup> \* - Разделы 2.7; 2.8 выполнены совместно с с.н.с. Т. С. Калининой.

Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1×TaqMan® Universal PCR Master Mix, 1×TaqMan® Gene Expression Assays и 2,5 мкл кДНК в стандартных 96-луночных оптических плашках. Пробы TaqMan® имели флуоресцентный краситель FAM на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель BHQ на 3'-конце, а также группу связывания с малой бороздкой ДНК. Буфер ПЦР содержал урацил-N-гликозилазу (UNG) для защиты реакционной смеси от загрязнения и AmpliTaq Gold® DNA Polymerase.

Режим ПЦР состоял из 2 минутного прогревания смеси при 50°C для активации UNG, 10-минутного прогрева при 95°C для активации полимеразы с последующими 40-45 циклами: 15 сек денатурации при 95°C и 60 сек инкубации при 60°C

## **2.9 Иммуноблот<sup>2</sup>**

Выделение суммарного белка производили путем механической гомогенизации в лизирующем буфере, содержащем 150 mM NaCl, 50 mM трис-HCl (pH 7,4), 1% тритона X-100, 1 mM PMSF и по 1 мкг/мл леупептина, пепстатина и апротинина. Образцы ткани гомогенизировали в 10 объемах (относительно веса образца) охлажденного лизирующего буфера, полученные гомогенаты инкубировали на льду в течение 20 минут, а затем центрифугировали 20 минут (12000 g, 4°C). Концентрацию суммарного белка в супернатанте определяли на спектрофотометре SmartSpec Plus (Bio-Rad Laboratories, inc.) по Лоури (длина волны 750 нм), в качестве калибровочного стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (фракция V) (Lowry et al., 1951). Супернатант хранили при –60°C до дальнейшего использования. Аликвоты суммарного белка (50 мкг) денатурировали в буфере для нанесения (50 mM трис-HCl, pH 6,8, 10% глицерина, 100 mM 2-β-меркаптоэтанола, 1% SDS, 0,002% бромфенолового синего) в течение 5 минут при 95°C. Разделение суммарного белка производили посредством одномерного электрофореза в 15% SDS-полиакриламидном геле (система

---

<sup>2</sup> \* - Раздел 2.9 выполнен совместно сн.с. П. Н. Меньшановым.

MiniProtean Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories, США) при постоянном напряжении 180 V. Белки, разделенные электрофоретически, переносили с геля на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad Laboratories, США) с пористостью 0,45 мМ в блоттере Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, США). Эффективность переноса проверяли, окрашивая мембрану пунцовым S. Оценку уровня активной каспазы производили методом полуколичественного иммуоблота мембран, содержащих разделенный одномерным денатурирующим гель-электрофорезом суммарный белок. Для её детекции использовали поликлональные кроличьи антитела фирмы Santa Cruz Biotechnology (США) к каспазе-3 (H-277) (1:250) и актину (I-19-R) (1:5000). Мембраны блокировали в течение 60 минут (5% раствор обезжиренного молока в PBS — изотоническом фосфатном буфере, pH 7.4), инкубировали 2 часа в растворе первичного антитела, производили трехкратную (по 5 минут) отмывку в 0,05% растворе TWEEN-20 в PBS, инкубировали в течение 1 часа в растворе вторичного антитела, конъюгированного с щелочной фосфатазой, и производили трехкратную (по 5 минут) отмывку в 0,05% растворе TWEEN-20 в PBS.

Проявление целевого сигнала на мембране производили с использованием 5-бром-4-хлор-3-индолил фосфата (BCIP) и нитротетразолия голубого (NBT). Уровень интактной (32 KDa) и активированной (17 KDa) каспазы-3 оценивали относительно уровня актина после сканирования мембран путем компьютерной денситометрии (Scion Image, ver. 4.0.2; Scion Corporation, 2000, США).

### **2.10 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.

### 3.1 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 (Рис. 4). Иммуноокрашивание GR присутствует во 2, 3, 6-м слоях неокортекса и субпластинке. Для того, чтобы определить ранее неизвестные типы клеток, экспрессирующие GR в неонатальной коре мозга на третий день жизни крысят была проведена иммунофлюоресцентная колокализация со специфическими маркерами: (Рис. 6,7,8) GFAP - астроцитами (Forbes-Lorman et al., 2014), кальретенин – кальретениновыми интернейронами (Zuloaga et al., 2011), SATB2 – маркер кортико-кортикальных проекционных нейронов верхних слоев (Baranek et al., 2012), NURR1 – маркер нейронов 6-го слоя и субпластинки (Zetterstrom et al., 1996).

Колокализация с GFAP и кальретенином была определена в области CA1 гиппокампа, с наивысшим уровнем глюкокортикоидных рецепторов. В энторинальной коре была оценена колокализация как с этими белками, так и с маркерами специфичными для кортекса. Интересным представлялось оценить колокализацию GR с транскрипционным фактором, геном раннего ответа и орфанным рецептором NURR1, так как он имеет схожий паттерн экспрессии и регулируется схожим с GR образом в ходе реакции на стресс

(Zetterstrom et al., 1996; Perlmann, Wallen-Mackenzie, 2004; Bae et al., 2009; Rojas et al., 2010).

Колокализация с SATB2 была интересна тем, что он является маркером верхних слоев новой коры и экспрессируется в нейронах только с кортико-коротикальными связями (Britanova et al., 2005; Alcamo et al., 2008; Britanova et al., 2008; Baranek et al., 2012).

В экспериментах по колокализации обычно определяют несколько основных параметров (Adler, Parmryd, 2010; Dunn et al., 2011; Zinchuk, Grossenbacher-Zinchuk, 2011, 2014). Коэффициент корреляции Пирсона  $R_p$  (Adler, Parmryd, 2010) может варьироваться от -1 до 1 и показывает взаимное распределение двух сигналов. Чем коэффициент ( $R_p$ ) ближе к -1 тем два сигнала расположены взаимоисключающе, чем он ближе к +1 тем два сигнала расположены совместно, значение коэффициента близкое к нулю говорит об отсутствии корреляции во взаимном расположении сигналов. Коэффициент перекрытия Мендерса (МОС) (Dunn et al., 2011), может варьироваться от 0 до 1, показывающей полную колокализацию при значении +1. Он не чувствителен к различиям в интенсивности сигнала в двух каналах, фотовыгоранию и фотоумножению в детекторах (Dunn et al., 2011). Взвешенные коэффициенты  $tM1$   $tM2$  колокализации показывают процент пикселей, которые колокализированы для каждого из каналов, но для этого коэффициента яркие пиксели вносят более весомый вклад (Zinchuk, Grossenbacher-Zinchuk, 2011). Нами были определены взвешенные коэффициенты колокализации для каждого канала  $tM1$  и  $tM2$  (сигнал GR всегда соответствует второму каналу  $tM2$ ). Основные результаты и коэффициенты колокализации приведены в табл. 4. Так по коэффициенту перекрытия Мендерса МОС табл.4 (рис. 6, 7, 8) GR больше колокализирован из исследованных маркеров с кальретенином  $F(5, 18)=11.600$ ,  $p<0.05$ ; примерно на одном уровне колокализирован с SATB2 и NURR1, и меньше всего с GFAP. Наибольшая степень колокализации с кальретенином и наименьшая с GFAP также подтверждалась коэффициентом Пирсона.

Похожее распределение маркеров было 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.6, 8, 9. Так значение коэффициента перекрытия Мендерса (MOC) и коэффициента корреляции Пирсона R<sub>p</sub> (табл.4) для SATB2 и NURR1 достоверно выросло и достигло значений этих коэффициентов для кальретенина в энторинальной коре через 6 часов после введения дексаметазона DEX в дозе 0.2мг/кг. Через 6 часов после введения дексаметазона GR в основном имел ядерную локализацию рис. 9.

Вероятной причиной слабой колокализации GR с GFAP может быть низкий уровень глюкокортикоидных рецепторов в астроцитах по сравнению с нейронами. Глюкокортикоидные рецепторы находятся под негативной регуляцией своего гормона. Наблюдается градиент глюкокортикоидов, приходящих из сосудов в ткань мозга, поэтому астроциты получают большую дозу гормонов, чем нейроны, что может снизить в них экспрессию GR.

Таким образом можно сделать вывод, что из изученных маркеров типов клеток GR в энторинальной коре и поле гиппокампа CA1, на третий день постнатального развития, наиболее колокализованы с маркером кальретениновых интернейронов и в меньшей степени колокализованы с маркером астроцитов

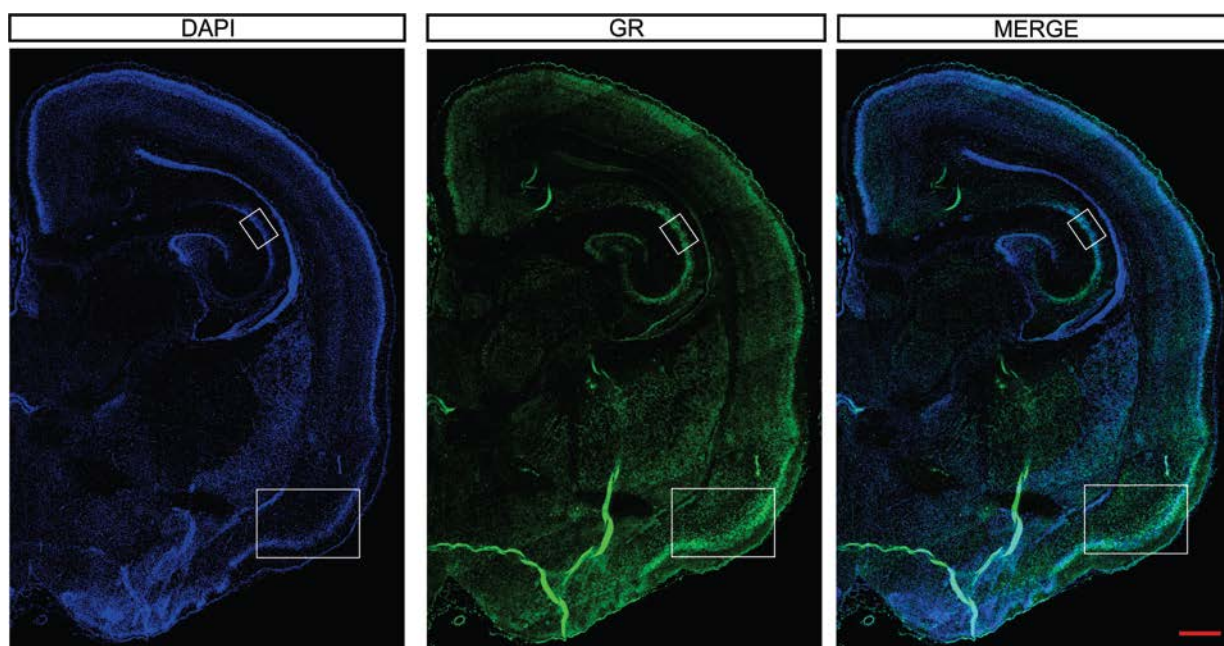


Рис. 4 Экспрессия глюкокортикоидного рецептора в неонатальном мозге крыс на третий день жизни у интактных животных. GR – зеленый, флуорофор Alexa 488. Коронарные срезы. Шкала 500μm. Прямоугольниками отмечены области в которых исследовали колокализацию GR с основными маркерами типов клеток.

Таблица 4 Коэффициенты колокализации GR с маркерами типов клеток энторинальной коры и поля CA1 гиппокампа.

	Маркер	МОС	tM1	tM2	Rp
CA1	CALRET CA1	0.53±0.04 <sup>*</sup>	0.45±0.08	0.07±0.01	0.15 ±0.01 <sup>*</sup>
	GFAP CA1	0.33±0.04	0.02±0.01	0.01±0.01	-0.1±0.09
ENT CTX	CALRET ENT	0.62±0.02 <sup>*</sup>	0.28±0.07	0.56 ±0.12 <sup>*</sup>	0.12 ±0.01 <sup>*</sup>
	GFAP ENT	0.33±0.03	0.04±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01
	NURR1	0.39±0.01	0.17±0.05	0.64 ±0.06 <sup>*</sup>	-0.05±0.02
	SATB2	0.46±0.03	0.09±0.01	0.87 ±0.09 <sup>*</sup>	-0.04±0.02
+6ч. DEX	NURR1	0.67±0.03 <sup>*</sup>	0.03±0.01	0.94 ±0.02 <sup>*</sup>	0.12 ±0.01 <sup>*</sup>
	SATB2	0.67±0.02 <sup>*</sup>	0.43±0.07	0.89 ±0.04 <sup>*</sup>	0.09 ±0.02 <sup>*</sup>

\*-p<0.05 по сравнению с GFAP

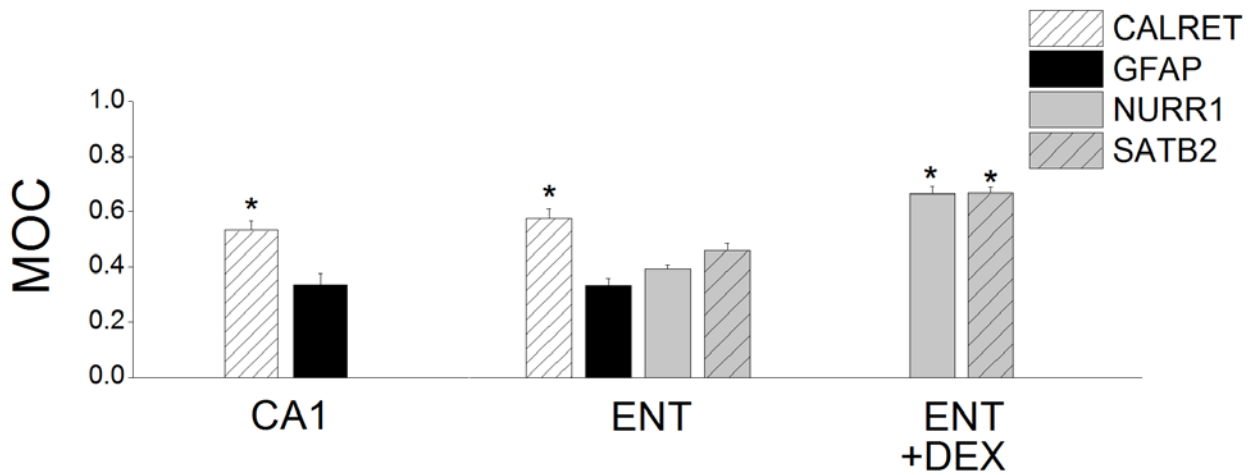


Рис. 5 Значение общего коэффициента колокализации Мендера (MOC) для GR с маркерами типов клеток CALRET – кальретенином, GFAP – кислый астроцитарный белок, NURR1, SATB2 – транскрипционные факторы, специфичные для кортекса. CA1 – поле гиппокампа, ENT –энторинальная кора у интактных животных, ENT+DEX – энторинальная кора у животных через 6 часов после введения дексаметазона в дозе 0.2 мг/кг. \*- $p < 0.05$  по сравнению с GFAP

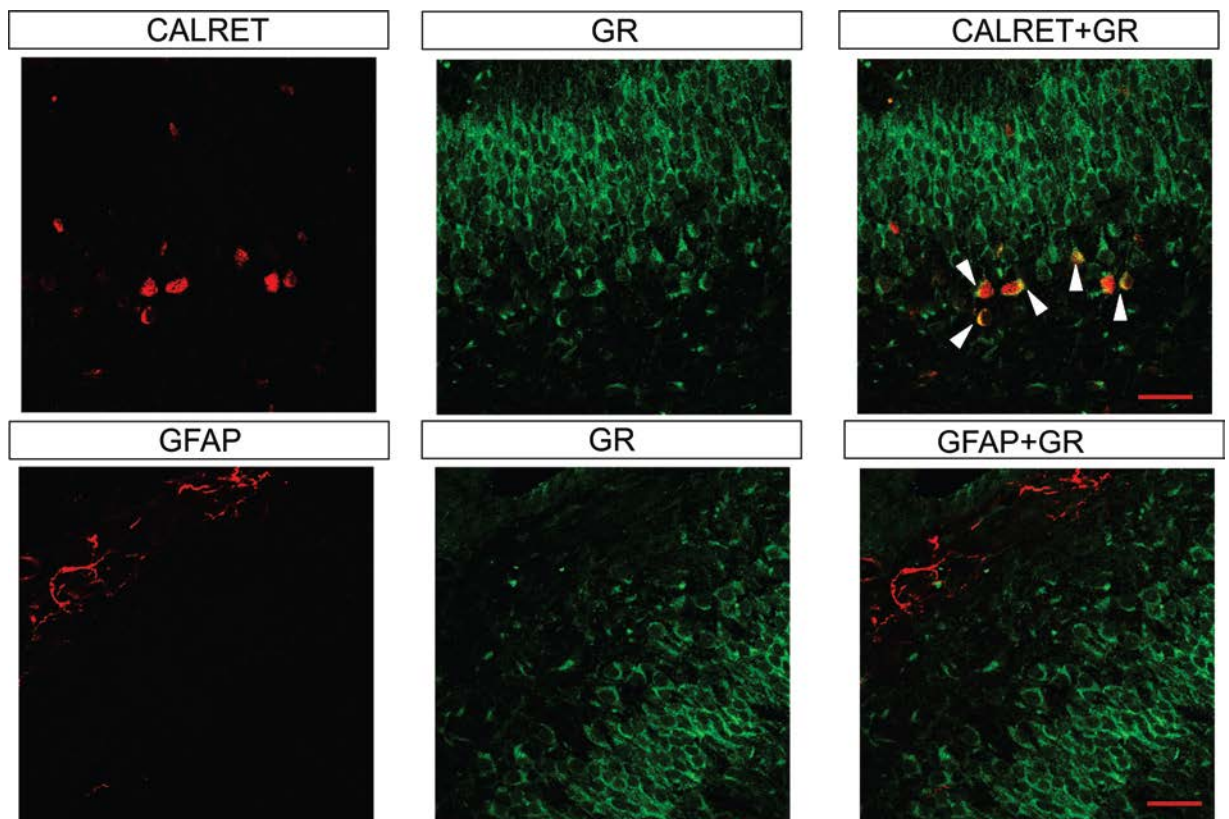
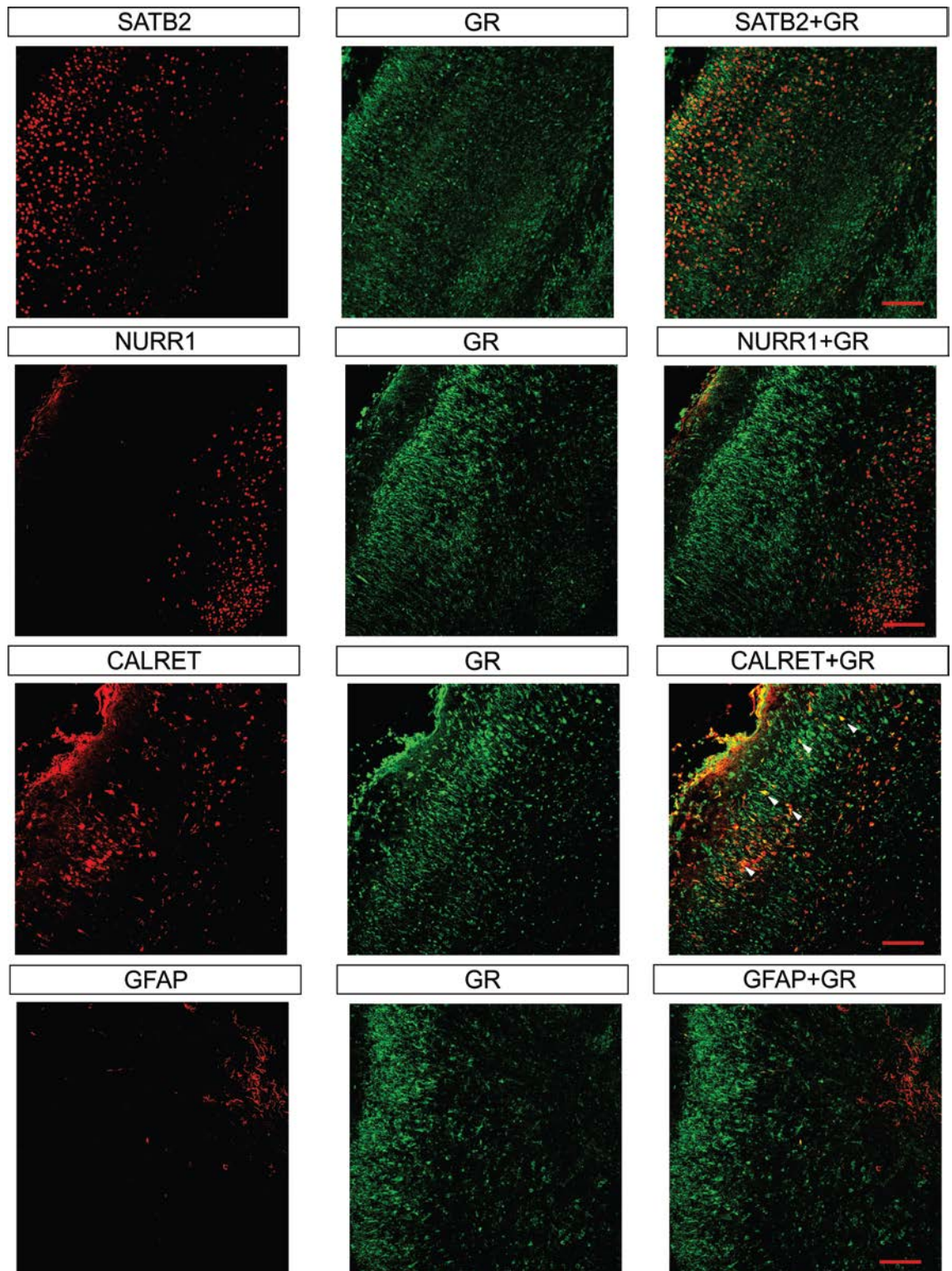
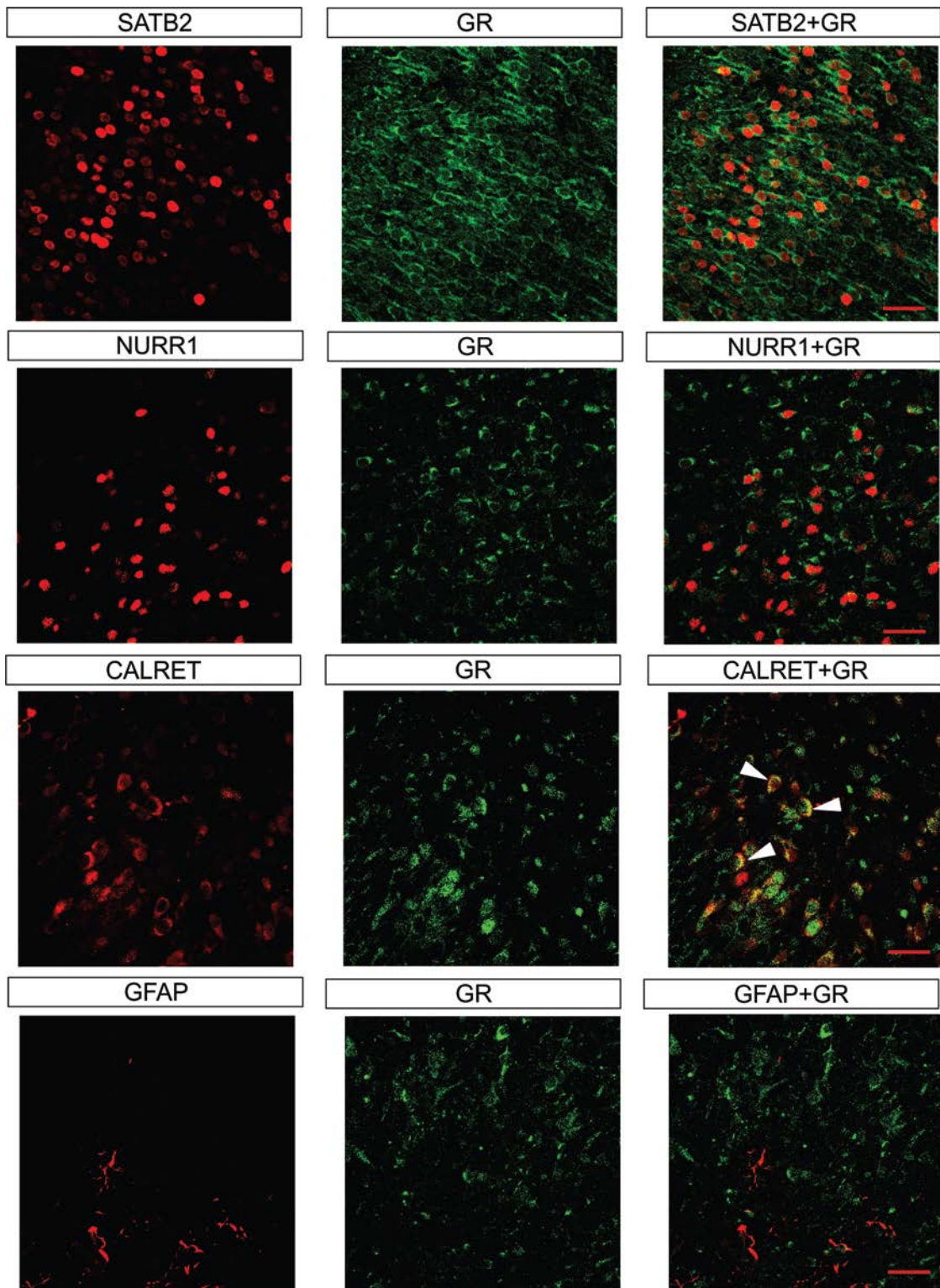


Рис.6 Репрезентативные микрофотографии колокализации GR с GFAP и кальретенином (CALRET) в области CA1 гиппокампа у интактных трехдневных животных. Объектив 40. Шкала 50  $\mu\text{m}$ . Стрелками показаны места колокализации.





*Рис.7* Репрезентативные микрофотографии колокализации GR с основными маркерами типов клеток в энторинальном кортексе у интактных трехдневных животных. Объектив 20. Шкала 100  $\mu$ m. Стрелками показаны места колокализации.



*Рис.8 Колокализация GR с основными маркерами типов клеток в энторинальном кортексе у интактных трехдневных животных. Объектив 40. Шкала 50 мк. Стрелками показаны места колокализации.*



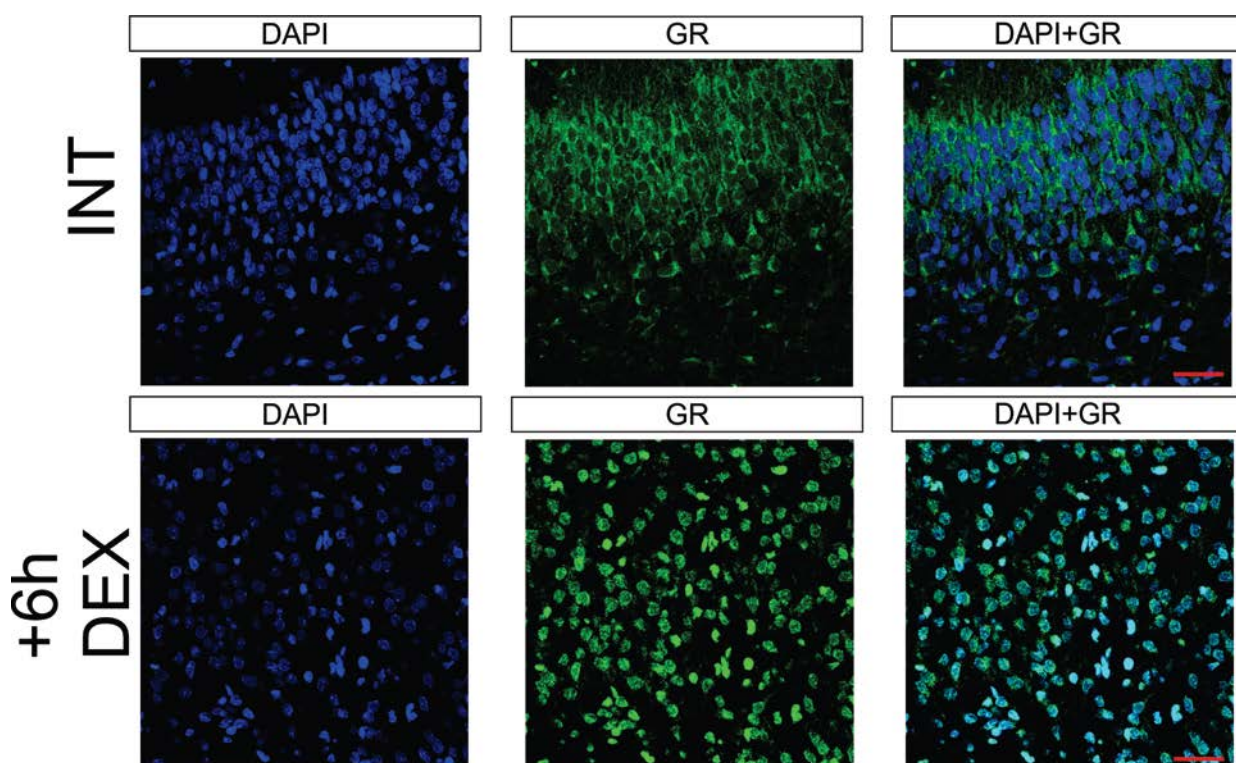


Рис.9 Транслокация глюкокортикоидных рецепторов в ядра клеток энторинальной коры через 6ч после введения дексаметазона (DEX) в дозе 0.2 мг/кг. Шкала 50 мкм. DAPI – окраска ядер.

Глюкокортикоиды – гормоны стресса, являются одними из важнейших факторов, влияющих в перинатальный период на развитие головного мозга млекопитающих, в том числе и путем модуляции протекания в нем физиологического апоптоза, необходимого для правильного формирования ЦНС (Noguchi et al., 2008; Duksal et al., 2009; Zuloaga et al., 2011; Zuloaga et al., 2012; Bhatt et al., 2013). Глюкокортикоиды широко применяются в неонатологии для ускорения созревания легких у недоношенных младенцев. GR широко экспрессируется в неонатальном головном мозге. Эффекты глюкокортикоидов на апоптоз разнообразны и противоречивы, они зависят от отдела мозга, дозы, типа клеток, а также времени воздействия. В современной литературе имеются свидетельства как проапоптозного, так и антиапоптозного действия глюкокортикоидов (Ni Chonghaile et al., 2006; Noguchi et al., 2008; Zuloaga et al., 2011; Zuloaga et al., 2012; Drakulic et al., 2013). Неоднозначность эффектов этих гормонов может быть следствием множественности путей их влияния на апоптоз. Многие из этих путей все еще остаются непонятыми. Не до конца изучено гормональное воздействие

глюкокортикоидов на процессы ПКГ путем апоптоза в неонатальном мозге на фоне гипоксии. Изучение этого феномена и явилось одной из задач данной работы.

### **3.2 Влияние дексаметазона и гипоксии на общее развитие и морфологию головного мозга.**

#### ***3.2.1 Вес тела после введения дексаметазона и гипоксии***

Глюкокортикоидная терапия приводит к существенному снижению массы тела новорожденных. Одним из ярких проявлений действия повышенного уровня этих гормонов является стимуляция катаболических процессов. Для оценки такого действия дексаметазона в работе были исследованы масса тела животных и её прирост.

Введение дексаметазона крысятам на третий день жизни снижало прирост массы тела каждого крысенка через шесть часов после введения (Рис. 10 В,С)  $F(2, 13)=38.792$  по сравнению с контролем  $p<0.05$ ), не изменяя существенно средний вес тела (Рис. 10 А)  $p= 0.57$ . Через пять дней после введения гормона, на восьмой день жизни, у животных перенесших инъекцию гормона был существенно снижен вес тела по сравнению с контрольной группой (Рис. 10А,В)  $F(2, 13)=31.207$   $p<0.05$ . Прирост массы относительно третьего дня жизни также был существенно снижен к восьмому дню после введения дексаметазона  $F(2, 13)=38.792$   $p<0.05$ .

Вариант кратковременной гипоксии, использованный нами не оказывал эффектов как на вес тела, так и прирост массы через 5 дней после воздействия, т.е. на 8-ой день жизни крысят (Рис. 11А,В)  $F(1, 20)=.17224$ ,  $p=0.68255$

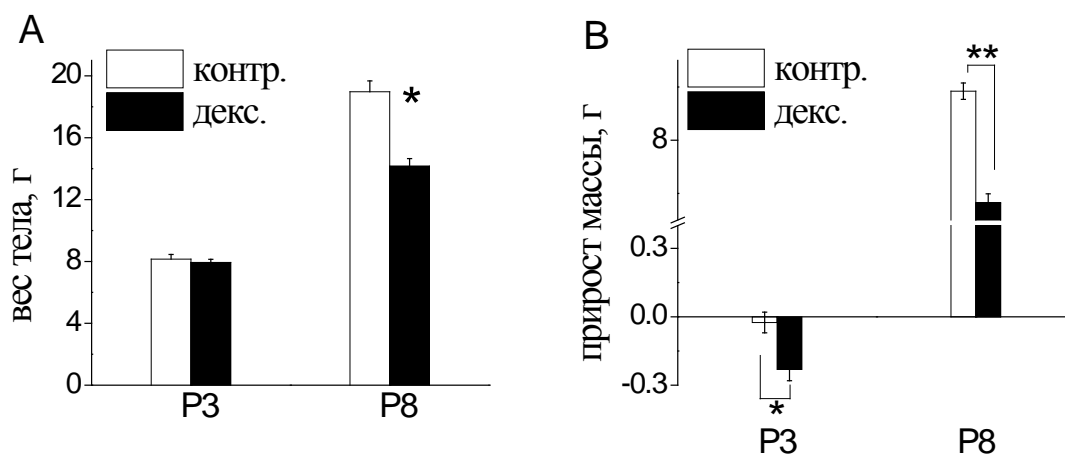


Рис. 10 Действие дексаметазона на вес тела и прирост массы.

**А.** Вес тела через 6 часов после введения дексаметазона -DEX на третий день жизни P3 и через 120 часов, на 8-ой день жизни – P8. \* -  $p < 0.05$  по сравнению с контролем с введением физ.р-ра - SAL **В.** Прирост массы через 6 часов после введения и через 120 часов после введения дексаметазона. \*, \*\* -  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

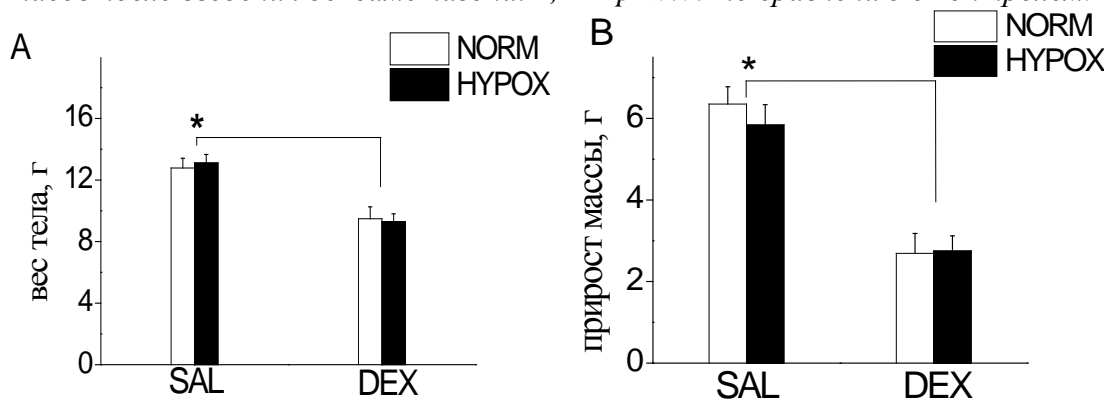
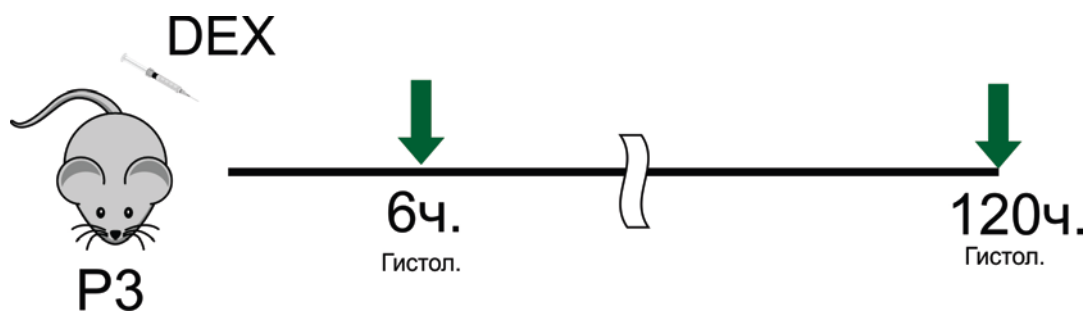


Рис. 11 Эффекты гипоксии и дексаметазона на массу тела (А) и прирост массы (В) через 120 часов после воздействий: NORM – нормоксия, HYPOX- гипоксия, DEX. - введение дексаметазона на третий день жизни в дозе 0.2 мг/кг, SAL – введение физ.р-ра. \* -  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

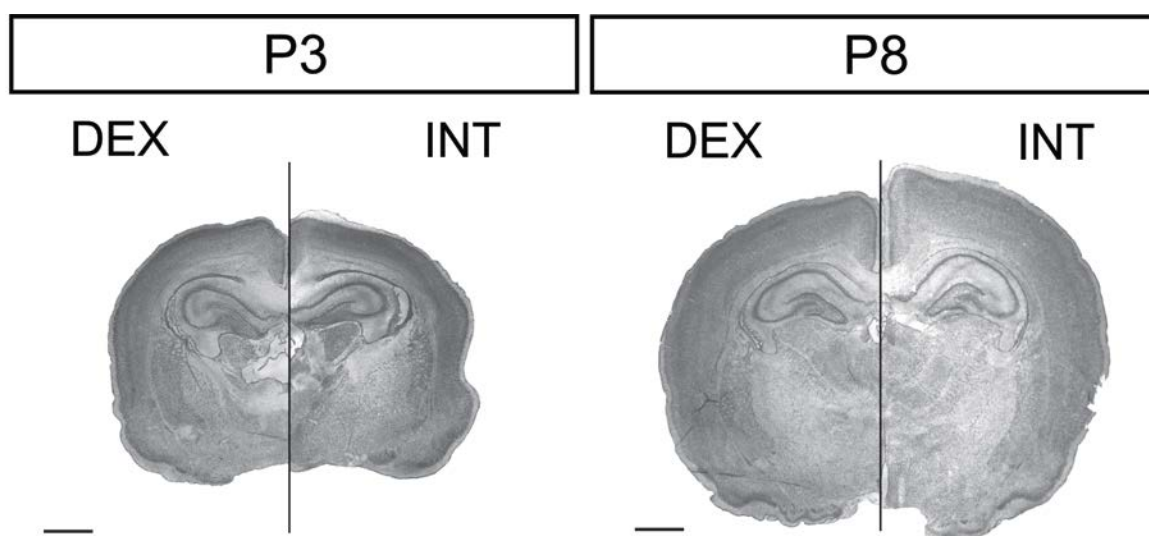
### 3.2.2 Морфология мозга после введения дексаметазона

Для оценки действия глюкокортикоидов на общую морфологию мозга, срезы были окрашены по Нисслю с помощью крезил виолета, через 6 часов после введения гормона - на третий день жизни крысят и через 120 часов после инъекции дексаметазона - на 8-ой день жизни (Рис.12)

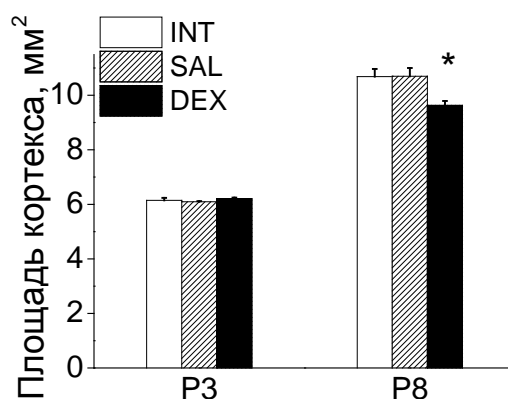


*Рис.12 Схема введения дексаметазона (DEX) и забора материала для общего гистологического исследования мозга (окраска по Нислю) после введения глюкокортикоидов*

Значительных изменений структур мозга после введения дексаметазона не было обнаружено ни через 6, ни через 120 часов после введения (Рис.13). Однако введение дексаметазона 3-х дневным крысятам вызвало заметное снижение площади неокортекса на 8-ой день их жизни  $F(2, 18)=6.3765$   $p<0.05$  (Рис.13,14). Через 6 часов после введения дексаметазона размеры коры не изменялись.



*Рис.13 Репрезентативные микрофотографии (окрашивание по Нислю) у групп с введением дексаметазона (DEX) и интактных (INT) животных. P3 – третий день жизни, P8 – восьмой день жизни. Шкала 1000μт.*



*Рис.14 Площадь неокортекса у 3-х (P3) и 8-ми (P8) дневных крысят, которых на третий день жизни оставляли интактными (INT), вводили физиологический раствор (SAL) или дексаметазон (DEX) в дозе 0.2мг/кг. \*- $p < 0.05$  по сравнению с SAL*

Существенное снижение площади новой коры через 120 часов после введения DEX вероятно имеет множественные причины. Дексаметазон может снижать как пролиферацию нейронов, клеток глии и олигодендроцитов (Chrysis et al., 2005; Sundberg et al., 2006; Westphal et al., 2010; Yu et al., 2010; Takahashi et al., 2012). По данным литературы (Bhatt et al., 2013) и данным, полученным нами, он вызывает увеличение количества апоптозных клеток в определенных структурах и популяциях клеток неонатального головного мозга. Уменьшение площади неокортекса может быть достигнуто за счет уменьшения количества отростков нейронов, вызванное DEX (Silva-Gomez et al., 2013). Дексаметазон также существенно снижает экспрессию аквапорина 4 (AQP4) (Gu et al., 2007) и изменение объема может быть связано с водным балансом в ткани мозга.

### 3.3 Влияние дексаметазона и гипоксии на апоптоз клеток головного мозга.

#### 3.3.1 Морфология мозга после введения дексаметазона и эпизода гипоксии.

Для оценки совместного действия повышенного уровня глюкокортикоидов и гипоксии через 4 часа после инъекции дексаметазона часть животных из соответствующих групп была подвергнута эпизоду гипоксии (Рис. 15). На пятый день после воздействия было оценено влияние перечисленных воздействий на общую морфологию мозга, а также экспрессию активной каспазы-3.

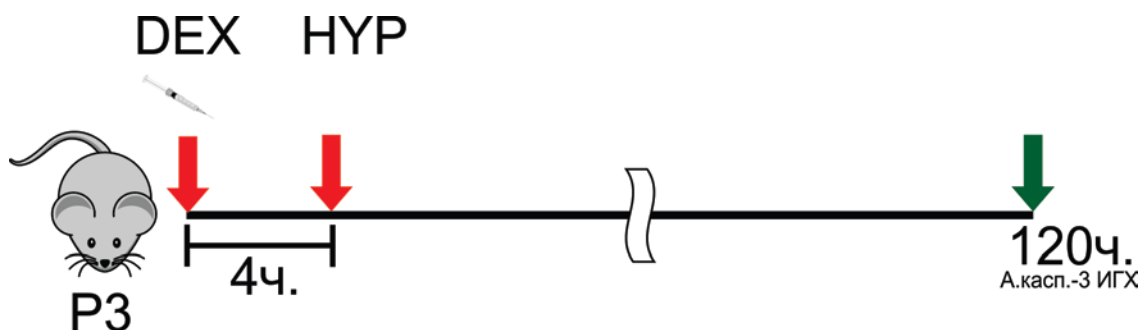


Рис. 15 Схема введения дексаметазона и гипоксического воздействия а также забора материала для исследования их влияния на апоптоз в неонатальном мозге.

Как введение глюкокортикоидов так и эпизод гипоксии вызывал снижение площади новой коры  $F_{(1, 12)}=8.1447$ ,  $p<0.05$ , усиления эффекта от совместного воздействия не наблюдалось (Рис. 16).

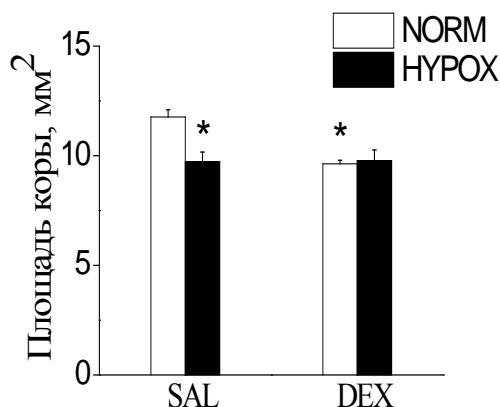


Рис. 16 Площадь неокортекса через 120 часов после эпизода гипоксии и введения дексаметазона HYPOX – гипоксия, NORM – нормоксия, SAL- группа с введением физиологического раствора, DEX – группа с введением 0.2мг/кг дексаметазона на третий день жизни. \* -  $p<0.05$  по сравнению с SAL+NORM



### ***3.3.2 Экспрессия активной каспазы-3 после введения дексаметазона и гипоксии через 120 часов после воздействия.***

Использованные в работе воздействия индуцировали сложный неаддитивный характер изменений уровня иммуногистохимически выявляемой активной каспазы-3 в неонатальном головном мозге (Рис.17). Представленные на этом рисунке репрезентативные микрофотографии демонстрируют, что в порядке убывания интенсивности интегрального сигнала активной каспазы-3 на сагитальном срезе мозга экспериментальные группы ранжируются следующим образом: SAL+HYP > DEX+NORM > DEX+HYP > SAL +NORM.

Наиболее значительное повышение уровня активной каспазы-3 наблюдалось во фронтальной коре через 120 часов после эпизода гипоксии у животных, получивших инъекцию физраствора  $F_{(1, 11)}=17,774$ ,  $p < 0,05$  (Рис. 17, 18). Такой эффект гипоксии может быть связан с индуцируемой ею эксайтотоксичностью (Northington et al., 2011), а также изменениями активности нейромедиаторных систем мозга (Gao et al., 2012). Следует, однако, отметить, что после гипоксии в неонатальный период наблюдается усиление пролиферации нейрональных предшественников в субвентрикулярной зоне (Yang, Levison, 2006), что может являться компенсаторным механизмом её повреждающего действия. Наблюдалось также небольшое повышение уровня активной формы каспазы-3 и от введения гормона самого по себе. Однако предварительное введение дексаметазона за 4 часа до эпизода гипоксии в 2 раза ослабляло повышение уровня активной формы каспазы-3, по сравнению с уровнем этой протеазы, наблюдаемым при действии одной только гипоксии (Рис 17, 18).

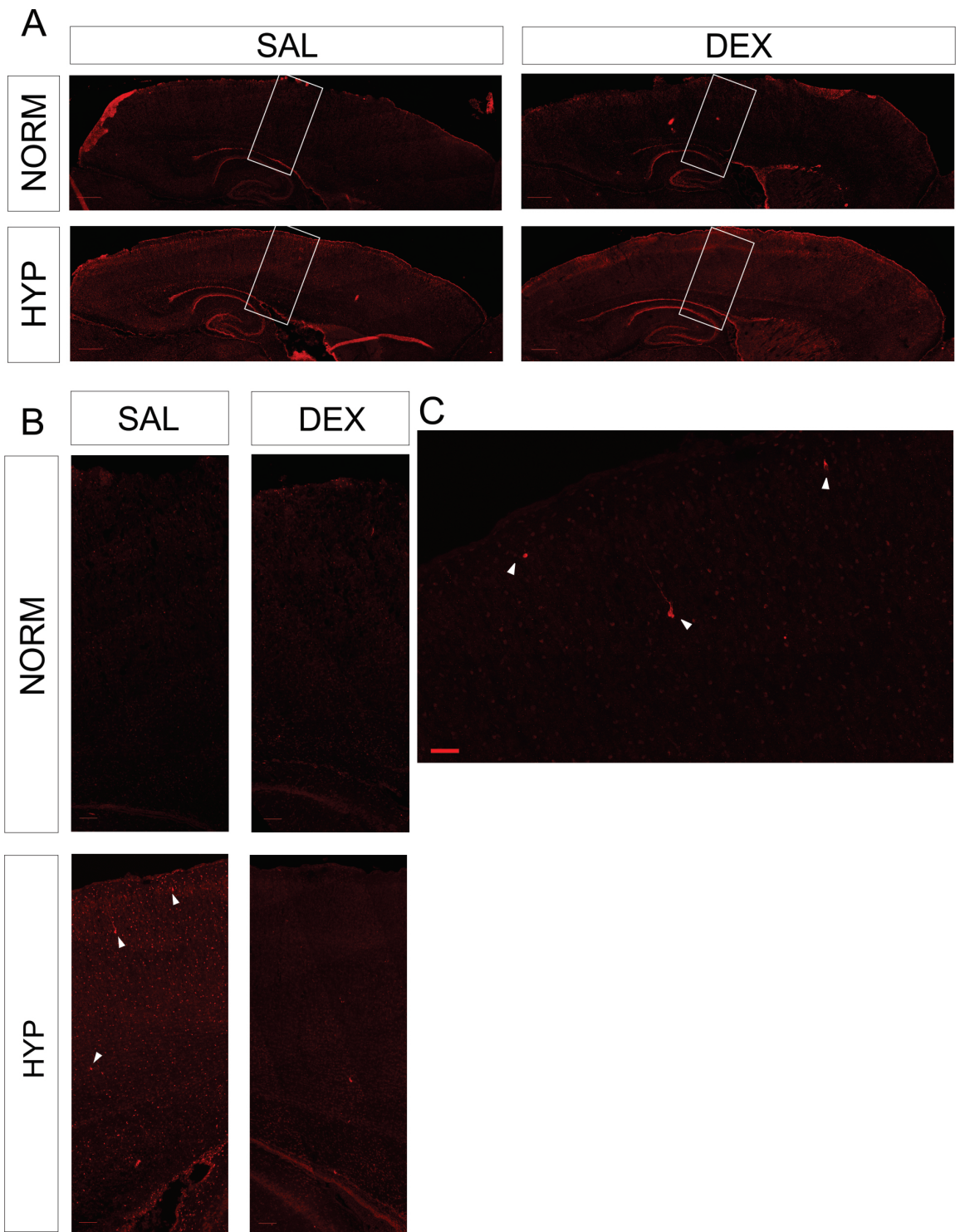
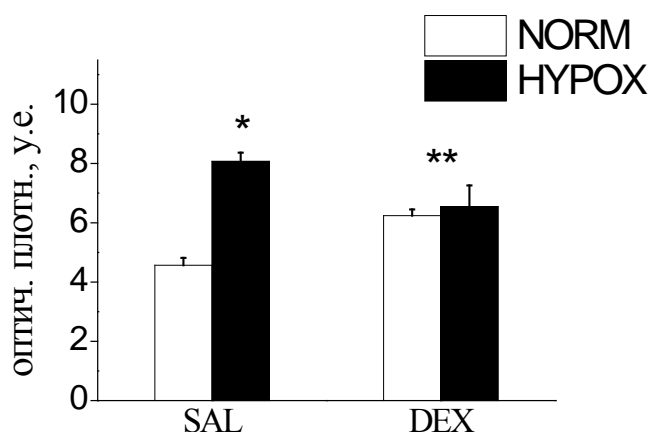


Рис. 17 А. Микрофотографии (монтаж) неокортекса неонатальных крысят после воздействия дексаметазоном и гипоксией. Линейка 500 мкм. Выделенный фрагмент представлен на рис. В.В. Микрофотографии среза неокортекса после воздействия дексаметазоном и гипоксией. Линейка 100 мкм, стрелками обозначены клетки, позитивные по активной каспазе-3. С. Увеличенная микрофотография иммуноокрашивания по активной каспазе-3 верхних слоев у группы с введением физ. р-ра и гипоксии. Линейка 20 мкм, стрелками обозначены клетки, позитивные по активной каспазе-3

Клетки всех слоев коры в одинаковой мере чувствительны к исследованным воздействиям. Существенных различий между слоями коры по интенсивности иммунореактивности к антителам на активную форму каспазы-3 не наблюдалось ни в одной из экспериментальных групп. Судя по окрашиванию, белок в основном локализован в отростках и телах нейронов (Рис. 17С).



*Рис. 18 Результаты денситометрии иммуноокрашивания по активной каспазе-3 в неокортексе через 120 часов после введения дексаметазона и гипоксии. HYPOX – гипоксия, NORM – нормоксия, SAL- группы с введением физиологического раствора, DEX – группы с введением 0.2 мг/кг дексаметазона на третий день жизни. \* -  $p < 0.05$  по сравнению со всеми остальными группами ; \*\* -  $p < 0.05$  по сравнению с контрольной группой, получившей только введение физ. р-ра.*

Изменению экспрессии каспазы-3 через 120 часов после введения гормона может предшествовать её повышение в предыдущие моменты времени. Логично ожидать эффекты дексаметазона на апоптоз через короткий промежуток времени (острые эффекты) в структурах с максимальным уровнем его рецепторов. Наибольший уровень глюкокортикоидных рецепторов (GR) находится в извилине CA1 гиппокампа. Проекция нейронов CA1 гиппокампа оканчивается на клетках субикулума. Он получает мощнейший афферентный вход из CA1 гиппокампа. По выше перечисленным причинам (уровень GR, нейрональные связи) анализ острых эффектов дексаметазона мы сосредоточили на гиппокампе и субикулуме.

### 3.4 Острое действие глюкокортикоидов на активность клеток гиппокампа и апоптоз клеток дорзального субикулула.

#### 3.4.1 Экспрессия каспазы-3 в гиппокампальной формации через 6ч. после введения дексаметазона.

Для исследования острого действия глюкокортикоидов на процессы, которые могут быть связаны с апоптозом в неонатальном мозге, нами была проведена оценка уровня мРНК прокаспазы-3, а также уровня белка про- и активной каспазы-3 в гиппокампе, через 6 часов после введения DEX 3-х дневным крысятам (Рис. 19). Также была проведена иммуногистохимия с антителами, специфичными к активной каспазе-3 через 6 часов после введения дексаметазона (Рис. 19). Оценка активности нейронов гиппокампа в первые часы (1-2ч) после введения DEX была проведена по изменению экспрессии гена раннего ответа *c-fos* (Рис.19).

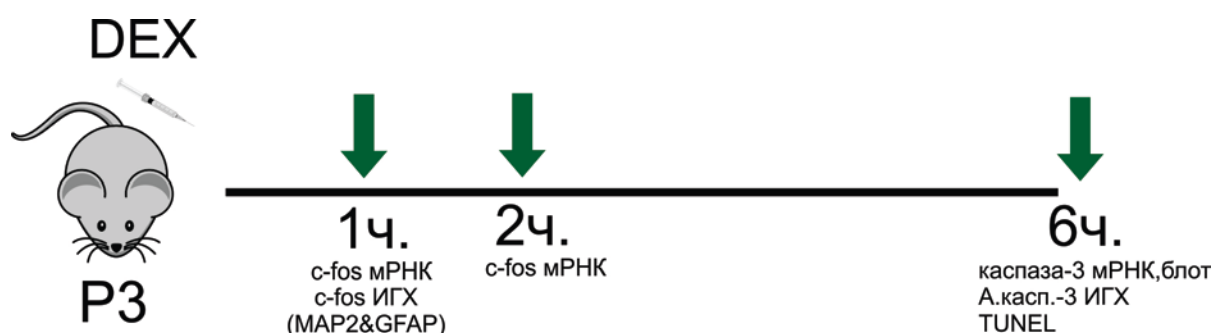


Рис. 19 Схема введения дексаметазона DEX и забора материала для анализа изменения апоптоза (активная каспаза-3, TUNEL) и экспрессии гена раннего ответа *c-fos* в первые часы после введения дексаметазона.

Через 6 часов после введения дексаметазона уровни мРНК и белка прокаспазы-3, а также её активной формы в гиппокампе не отличались от уровней у контрольных животных, получивших инъекции физиологического раствора или оставшихся интактными (рис.20).

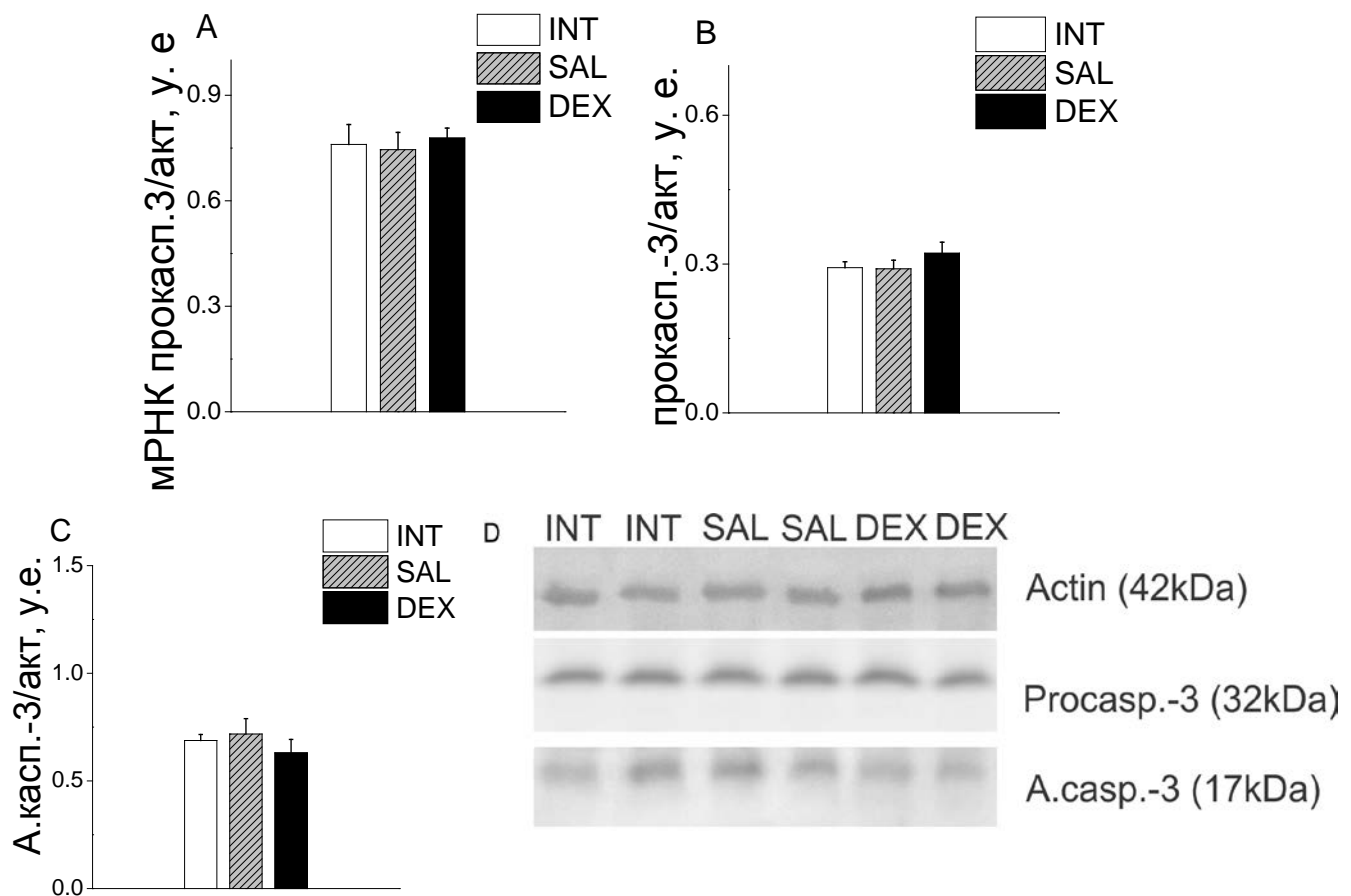


Рис.20 Экспрессия мРНК прокаспазы-3(А), белка прокаспазы-3(В) и активной каспазы-3 (С) в гиппокампе через 6 часов после введения дексаметазона. (D) иммуноблот на про- и активную форму каспазы-3 и актин. DEX – группа с введением дексаметазона, SAL- с введением физ-раствора, INT – интактные животные.

По результатам иммуногистологического исследования, через 6 часов после введения синтетического гормона клетки определенно позитивные по активной каспазе-3 (ярко коричневые после проявления DAB) наблюдались только в дорзальном субикулуме (Рис.21, 22).

Инъекция дексаметазона вызывала значительное увеличение числа клеток, позитивных по активной каспазе-3 в этой структуре мозга  $F(2, 9)=12.019, p<0.05$  (Рис. 21).

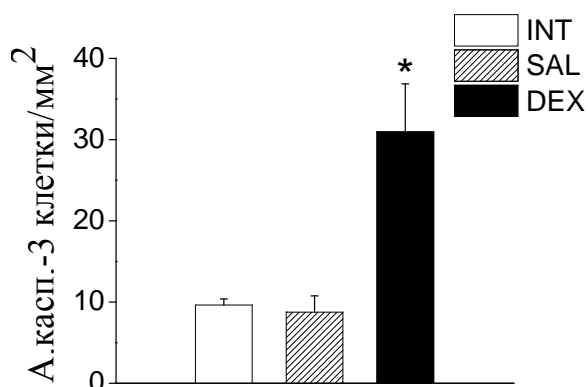


Рис. 21 Результаты подсчёта клеток позитивных по активной каспазе-3 в дорзальном субикулуме. DEX – группа с введением дексаметазона, SAL- с введением физ-раствора, INT – интактные животные. \*-  $p < 0.05$  по сравнению с контролем

### 3.4.2 Количество клеток позитивных по реакции на фрагментированную ДНК (TUNEL) в дорзальном субикулуме через 6ч. после введения дексаметазона.

Для более точной оценки количества апоптозных клеток после введения дексаметазона было проведено концевое мечение фрагментированной ДНК *in situ* на срезах. Оценка TUNEL позитивных клеток проводилась также через 6 часов после введения DEX (рис.23). Оценка количества фрагментированных ядер проводилась по окраске DAPI (рис.23). При этой окраске фрагментированные ядра отчетливо выявляются в виде типичных групп близко расположенных плотных голубых телец ДНК-содержащего материала, что позволяет их надежно идентифицировать и подсчитать. На шестой час после введения дексаметазона в дорзальном субикулуме наблюдалось значительное повышение числа TUNEL позитивных клеток  $F(2, 9)=30.091$ ,  $p < 0.05$  и количества фрагментированных ядер  $F(2, 9)=28.803$ ,  $p < 0.05$  (Рис.23, 24).



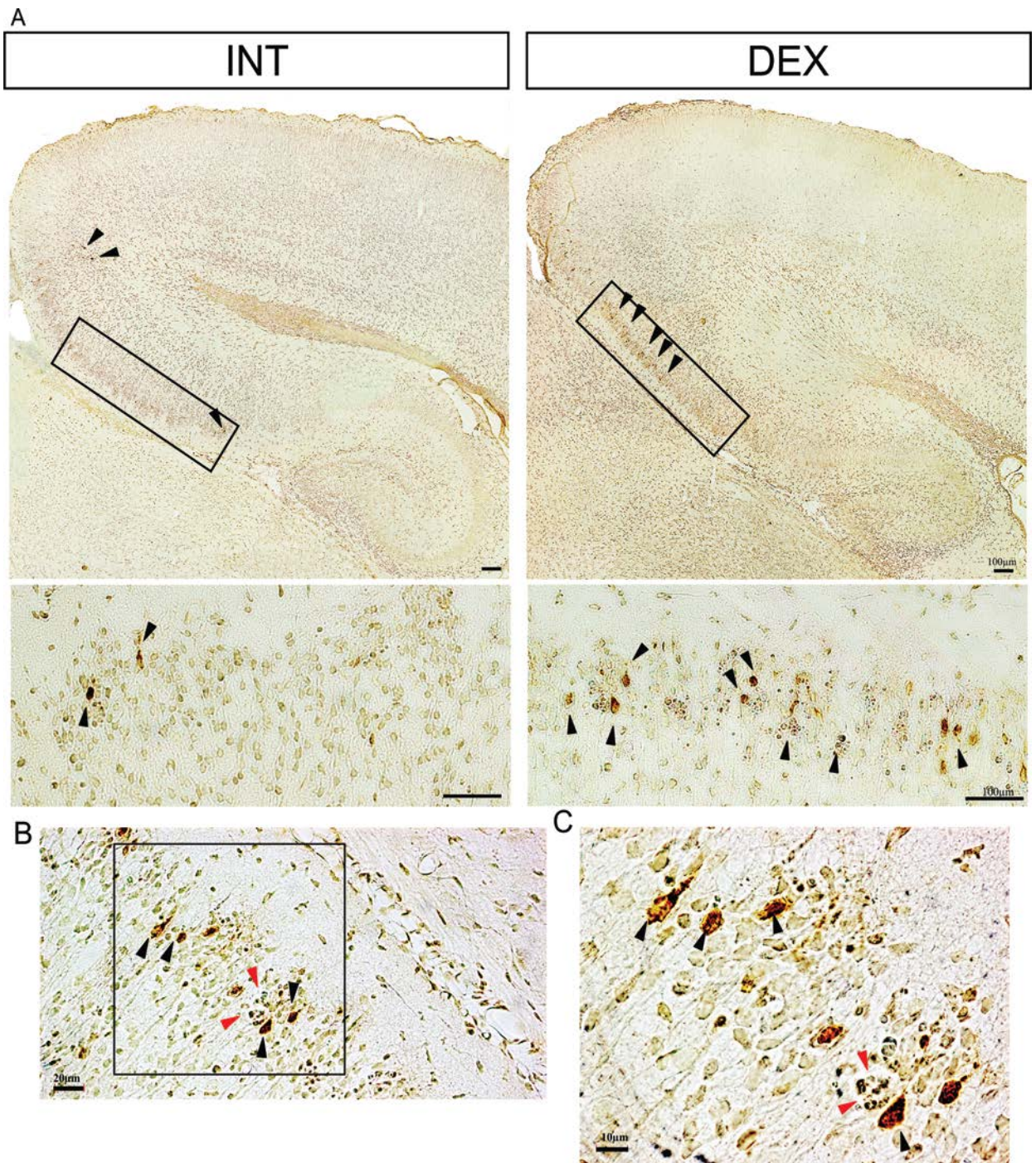
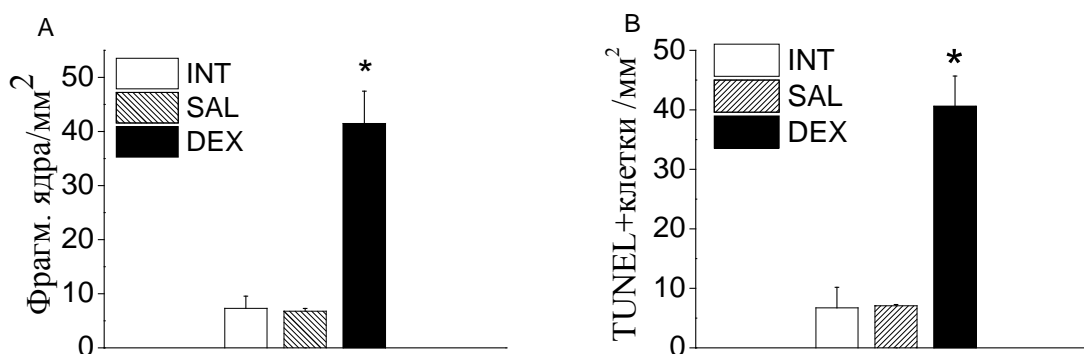


Рис.22 А. Репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания по активной каспазе-3 у групп с введением дексаметазона - DEX и интактных животных INT. Область субикулула, выделенная черным прямоугольником, представлена в увеличенном варианте ниже. Шкала 100µm. В. Объектив 40. Животное с введением DEX. Черными стрелками указаны клетки позитивные по активной каспазе-3, красными стрелками – клеточный мусор. Шкала 20µm С. Выделенный прямоугольник на рисунке В. Объектив 100. Животное с введением DEX. Черными стрелками указаны клетки позитивные по активной каспазе-3, красными стрелками – клеточный мусор. Шкала 10µm



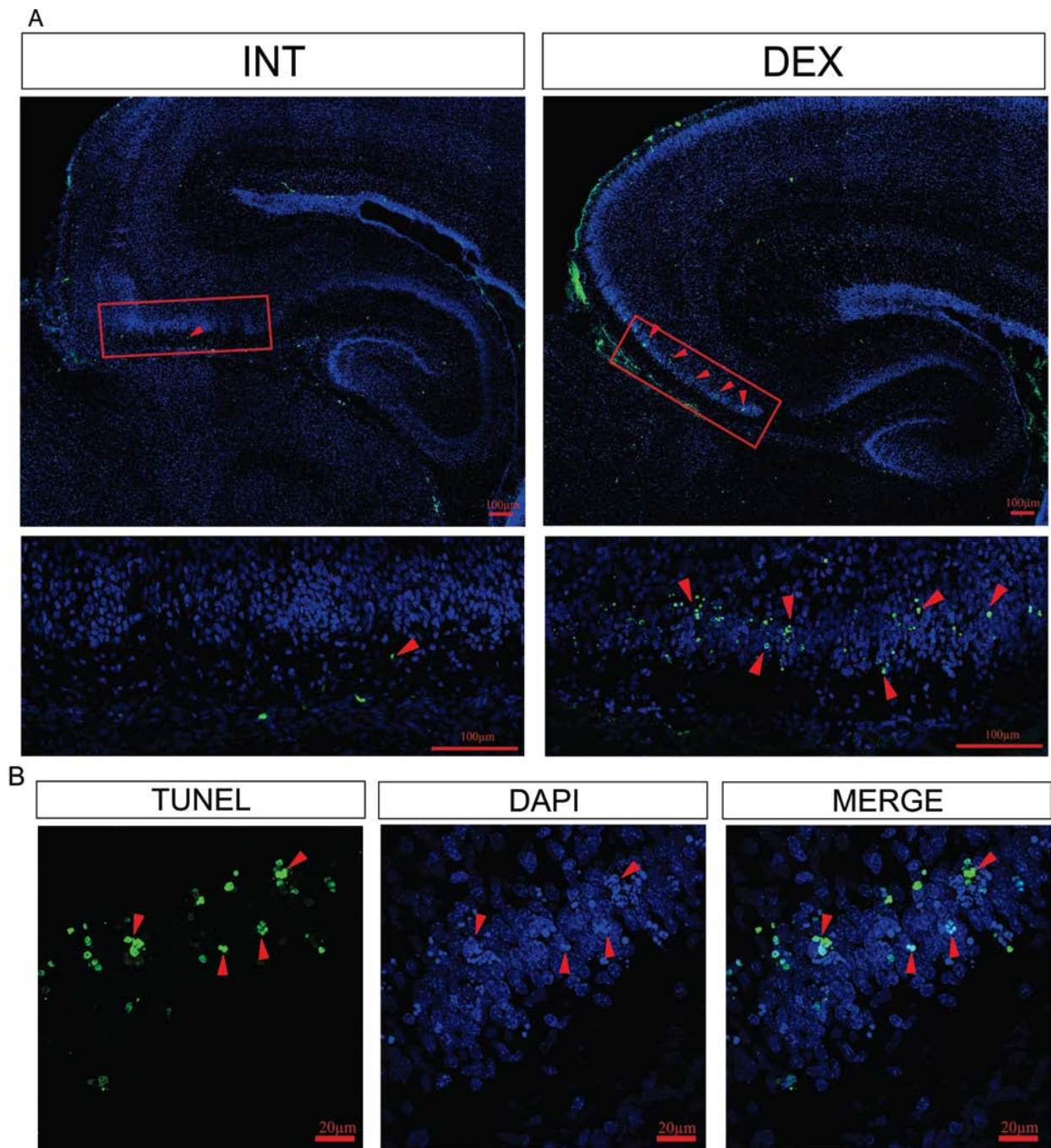
*Рис.23 Результаты подсчета фрагментированных ядер **A** и TUNEL-позитивных клеток **B** в дорзальном субикулуме через 6-часов после введения дексаметазона. DEX – группа с введением дексаметазона, SAL- с введением физ-раствора, INT – интактные животные. \*-  $p < 0.05$  по сравнению с обоими контролями.*

При этом наблюдалось значительная колокализация между TUNEL+ ядрами и фрагментированными ядрами по окраске DAPI (Рис. 24B).

### **3.4.3 Экспрессия каспазы-3 в неокортексе через 6ч. после введения дексаметазона.**

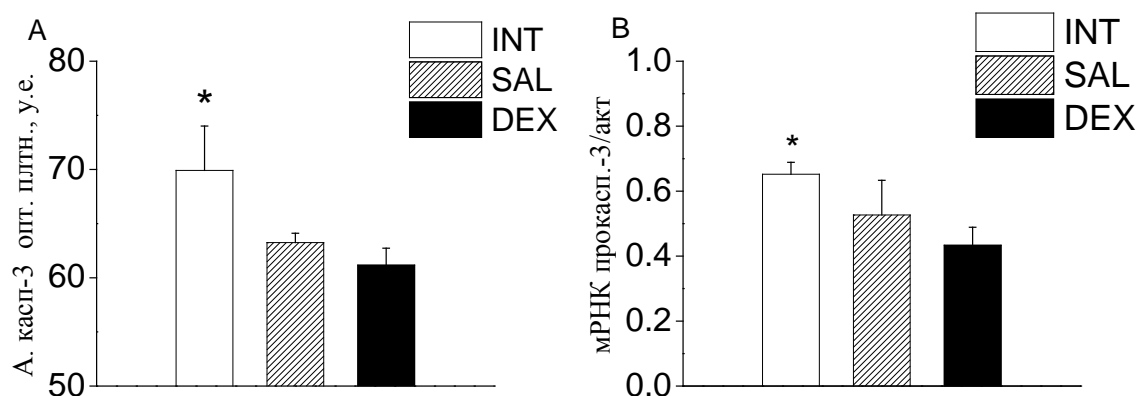
При том, что число клеток, позитивных по активной каспазе-3 после введения дексаметазона увеличивалось в дорзальном субикулуме в неокортексе, напротив, наблюдалось снижение общего уровня иммуноокрашивания по каспазе-3  $F(2, 9)=3.1349$ ,  $p < 0.05$  по сравнению с интактными животными (Рис. 25А, 26). Что также подтверждается снижением уровня мРНК прокаспазы-3 в неокортексе (Рис. 25В)  $F(2, 18)=2.2871$ ,  $p < 0.05$  по сравнению с интактной группой животных.





*Рис.24 А. Репрезентативные микрофотографии TUNEL окрашивания в группе с введением дексаметазона-DEX и интактных- INT животных . Область субикулула, выделенная красным прямоугольником, представлена в увеличенном варианте ниже. Шкала 100 мт. Красными стрелками показаны TUNEL-позитивные клетки.*

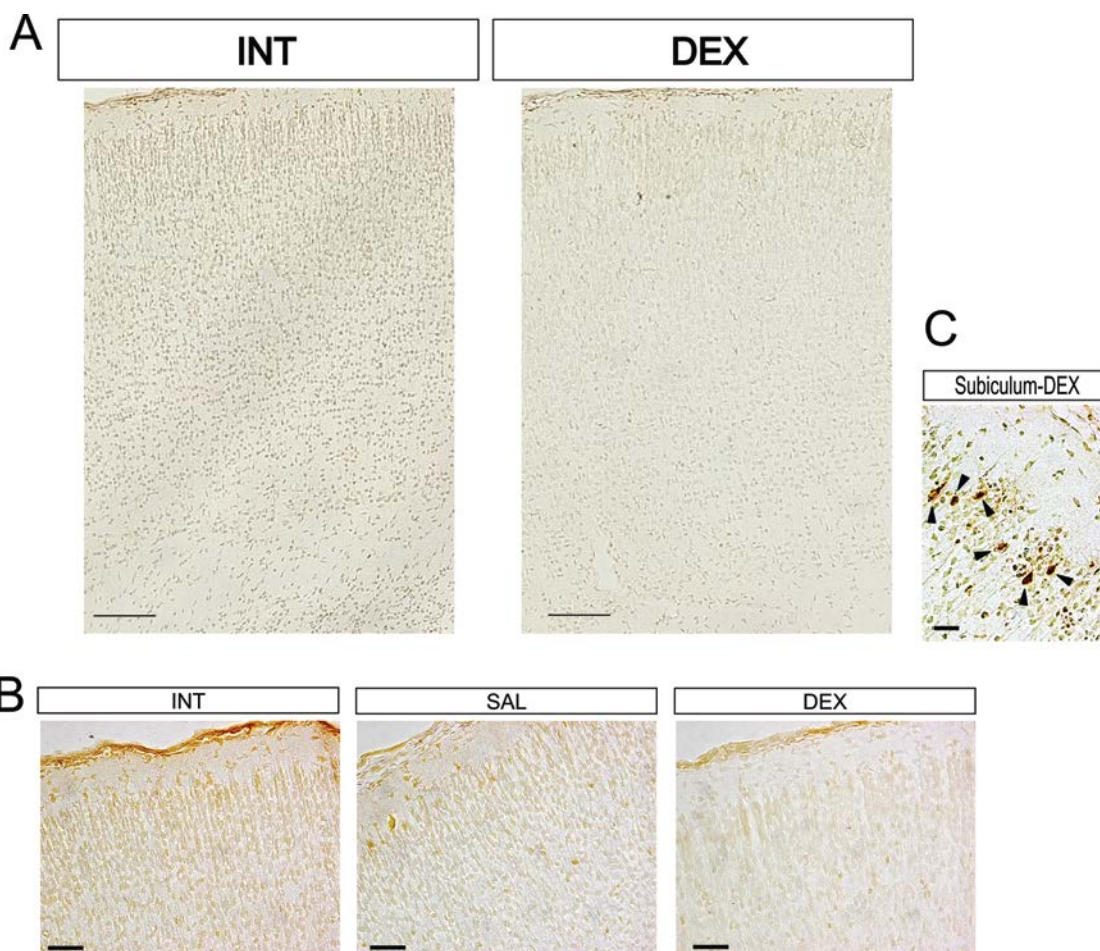
*В.Объектив 63. Ж-ное с введением Dex. Проекция максимальной интенсивности конфокального изображения, три канала. Красными стрелками указаны фрагментированные ядра, также положительные по реакции TUNEL (зеленый). Шкала 20 мт.*



*Рис.25 А* Уровень иммуноокрашивания по активной каспазе-3 в неокортексе через 6 часов после введения DEX. *Б* Уровень мРНК прокаспазы-3 в неокортексе после введения дексаметазона DEX – группа с введением дексаметазона, SAL- с введением физ-раствора, INT – интактные животные. \*-  $p < 0.05$  по сравнению с интактными животными.

Следует отметить что имелась тенденция к понижению общего уровня иммуноокрашивания и мРНК каспазы-3 в коре животных, которым вводили физиологический раствор. Этот результат подкрепляет эффект DEX, поскольку инъекция физ. р-ра является стрессирующей для крысят и повышает уровень глюкокортикоидных гормонов.

Эти результаты свидетельствуют об избирательной активации дексаметазоном механизмов гибели клеток именно в дорзальном субикулуме, в то время как в прилегающих областях коры проявляется противоположно направленное – антиапоптозное действие гормона.



*Рис. 26 Экспрессия активной каспазы-3 в коре и субикулуме 3х-дневных интактных крысят (INT) и через 6ч после введения им дексаметазона (DEX) или физиологического раствора (SAL) А. Репрезентативные панорамные микрофотографии иммуноокрашивания по активной каспазе-3 в неокортексе. Шкала 100 мкм В. Объектив 40. Иммуноокрашивание по активной каспазе-3 в неокортексе после введения дексаметазона. DEX – группа с введением дексаметазона, SAL- с введением физ-раствора, INT – интактные животные. Шкала 40 мкм С. Объектив 40 Репрезентативная микрофотография клеток определенно позитивных по активной каспазе-3 в дорзальном субикулуме через 6 часов после введения дексаметазона. Шкала 20 мкм. Стрелками указаны клетки позитивные по активной каспазе-3.*

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

Повышение числа клеток, находящихся в процессе апоптоза (позитивных по активной каспазе-3 и TUNEL), в дорзальном субикулуме – структуре получающей главный афферентный вход из CA1 гиппокампа свидетельствует о возможной активации поля CA1 после введения дексаметазона. Из экспериментов с микродиализом *in vivo* на взрослых крысах было установлено, что введение дексаметазона приводило через 30

минут к увеличению внесинаптического глутамата в гиппокампе (Abraham et al., 1996). Этот факт позволил предположить, что наблюдаемая нами гибель клеток субикулула - результат эксайтотоксичности гиппокампа глутамата, высвобождаемого при введении дексаметазона. Поэтому представляется важным проверить активируются ли нейроны гиппокампа в первые часы после введения глюкокортикоидов.

Широко используемым индикатором активации клеток является повышение в них экспрессии гена раннего ответа *c-fos*. В наших опытах мРНК *c-fos* повышалась уже через 30 минут после введения дексаметазона, достигала максимума через час после введения и снижалось ко второму часу после воздействия. (Рис. 27  $F(2, 32)=20.1189$ ,  $p<0.05$  по сравнению с интактными животными). Также через час после введения дексаметазона в гиппокампе было повышено количество *c-fos* позитивных клеток, как в СА1, так и в СА3, но повышение было значительно выше в поле СА1  $F(2, 20)=14.418$ ,  $p<0.05$  по сравнению с контролем (Рис. 28,29).

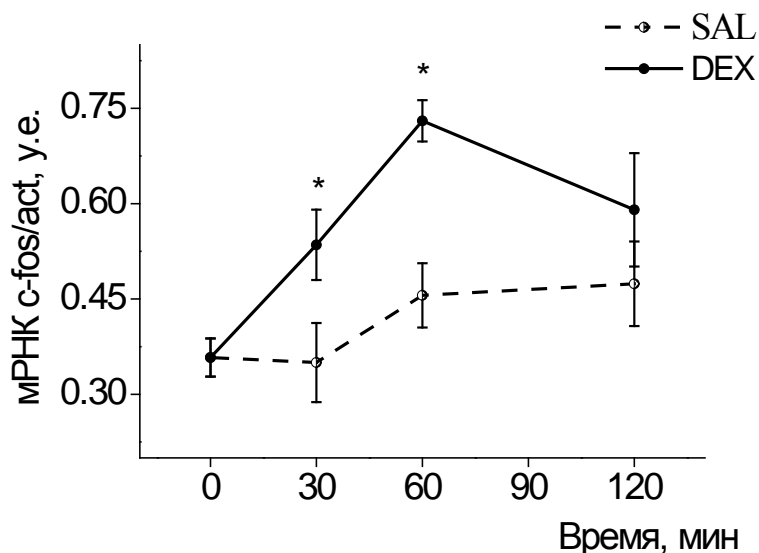
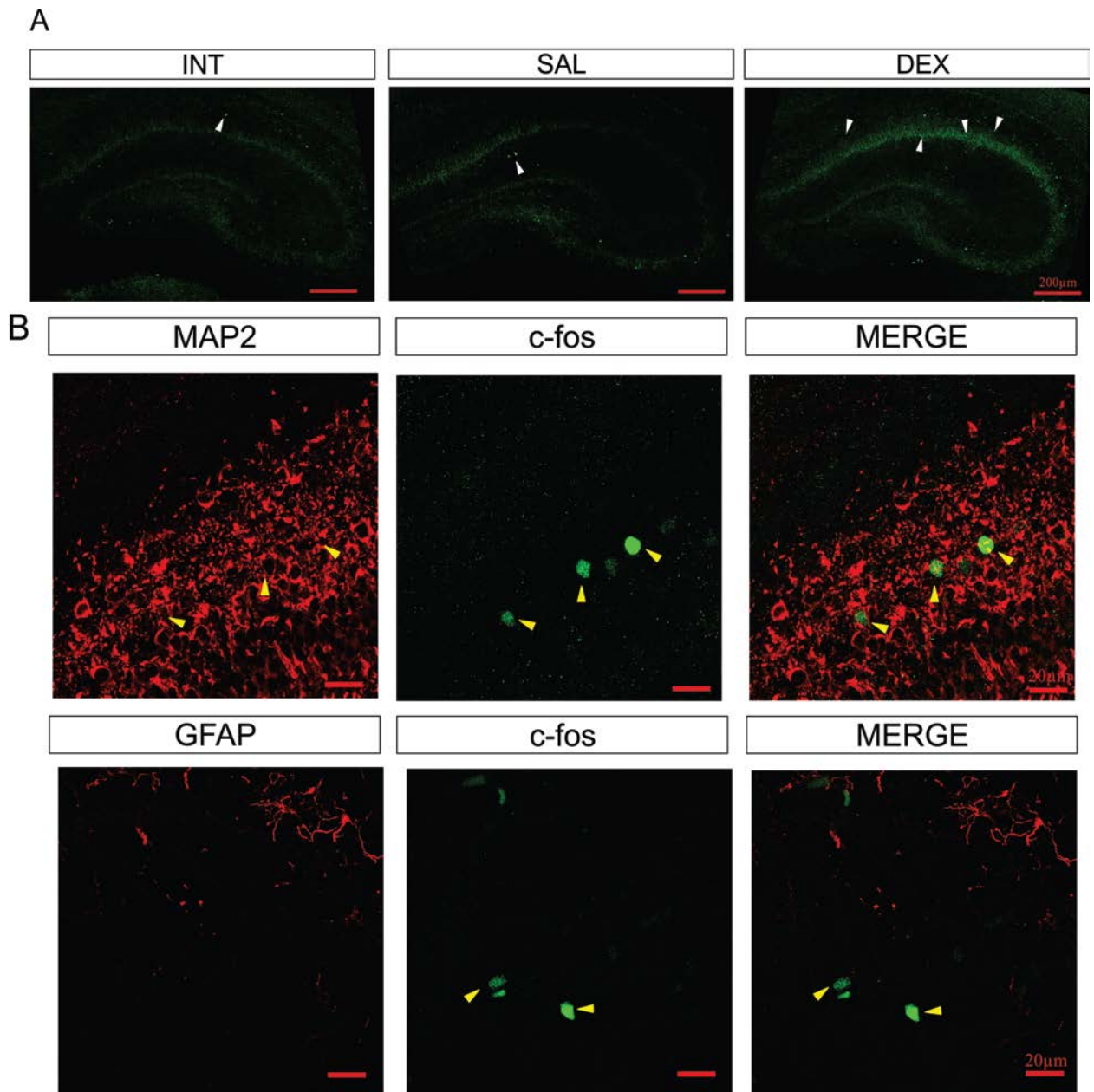


Рис. 27 Уровень мРНК *c-fos* в гиппокампе через 30 мин., 1ч и 2ч после введения дексаметазона – DEX, физ. р-ра –SAL и у интактных животных –время 0. \* -  $p<0.05$  по сравнению с интактными животными.





*Рис. 28 А. Репрезентативные панорамные микрофотографии иммуноокрашивания по c-fos в гиппокампе у животных через 1 час после введения дексаметазона – DEX, SAL – физ. раствора и интактных – INT животных. Шкала 200 μm. Стрелками отмечены c-fos позитивные ядра. В. Объектив 63. Иммуноокрашивание по c-fos с маркером нейронов MAP2 и астроцитов GFAP в поле CA1 гиппокампа у животных через час после введения дексаметазона. Шкала 20 μm. Стрелками отмечены c-fos позитивные ядра.*

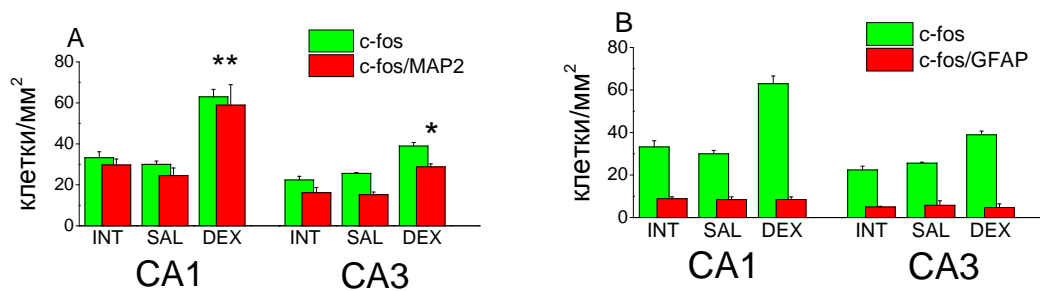


Рис. 29 Число *c-fos* иммунопозитивных клеток одновременно позитивных по нейрональному маркеру MAP2(A) или маркеру астроцитарной глии GFAP(B) в полях гиппокампа CA1 и CA3 через 1 час после введения дексаметазона – DEX, SAL – физ. раствора и интактных – INT животных.

Существенно большее повышение количества *c-fos* позитивных клеток в CA1 через час после введения DEX согласуется с распределением глюкокортикоидных рецепторов GR в головном мозге. Плотность GR в CA1 максимальна, по сравнению с остальными структурами.

Для выяснения типов клеток, активируемых через час после введения дексаметазона мы провели двойное иммунооращивание *c-fos* с нейрональным маркером MAP2 и астроцитарным маркером GFAP. Так введение дексаметазона не приводило к увеличению числа клеток позитивных по *c-fos* и GFAP ни в одном из полей гиппокампа. Вместе с тем дексаметазон значительно увеличивал число клеток одновременно меченных по *c-fos* и MAP2 в поле CA1 гиппокампа  $F(2, 9)=8.4256$   $p<0.05$  (рис 29).

Таким образом через час после введения дексаметазона активировались нейроны CA1 поля гиппокампа, а не астроциты. Активация нейронов от введения синтетического глюкокортикоида DEX коррелировала с экспрессией GR в гиппокампе, наибольший уровень которых обнаружен в CA1. Активация глутаматэргических нейронов CA1 гиппокампа после введения DEX может вызвать повышение внеклеточного глутамата в субикулуме и привести клетки в нем к эксайтотоксической гибели.

### 3.5 Влияние блокады рецепторов глутамата на индуцируемую дексаметазоном гибель клеток субикулума

#### 3.5.1 Количество клеток позитивных по активной каспазе-3 в дорзальном субикулуме через 6ч. после введения дексаметазона и антагониста глутаматных рецепторов мемантина.

Для дальнейшего анализа гипотезы о том, что апоптоз в субикулуме после введения дексаметазона может быть связан с глутаматэргической эксайтотоксичностью мы провели эксперименты, схема которых представлена на рис.30. Часть животных за 2 часа до введения дексаметазона DEX получала инъекцию блокатора глутаматных NMDA рецепторов мемантина в дозах 5мг/кг (M5D) или 20мг/кг (M20D). Другим животным вводили только блокатор рецепторов (M5, M20). Через 6 часов, после введения дексаметазона или физиологического раствора, проводилась транскардиальная перфузия и забор материала для последующего анализа.

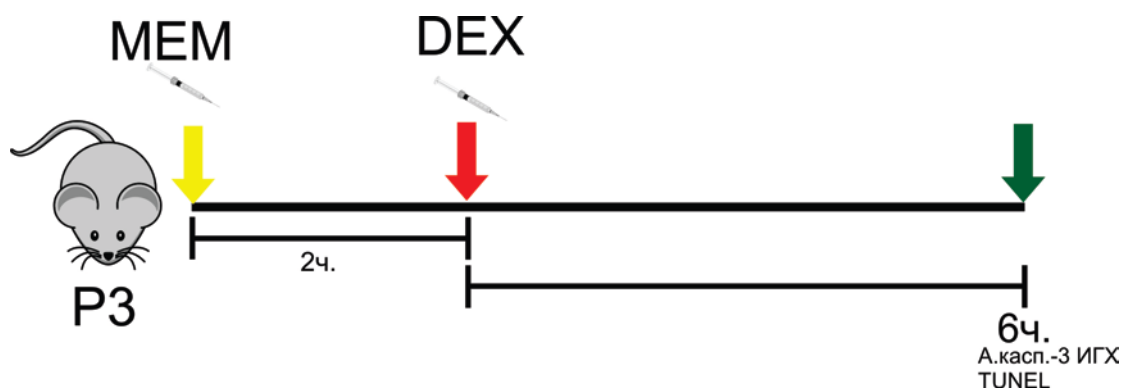


Рис. 30 Схема экспериментов с анализом эффектов дексаметазона (DEX) на фоне блокады глутаматных NMDA рецепторов.

Проводился подсчет клеток позитивных по активной каспазе-3 в области субикулума, а также двойная иммуногистохимия по активной каспазе-3 и маркером нейронов SATB2 и астроцитов GFAP. SATB2 позитивные нейроны направляют свои отростки только в контралатеральное полушарие через мозолистое тело. Также был проведен подсчет TUNEL позитивных ядер, вместе с маркерами нейронов SATB2 и астроцитов GFAP.

Предварительная инъекция мемантина дозозависимо предотвращала, вызванное дексаметазоном повышение числа клеток, позитивных по активной каспазе-3 (Рис.31).

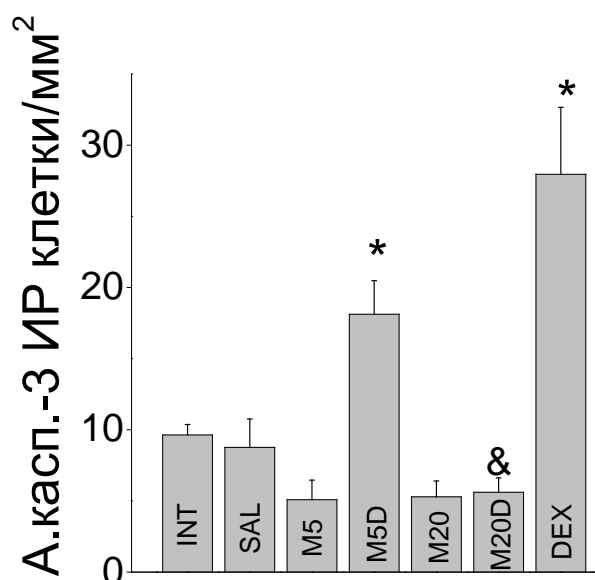
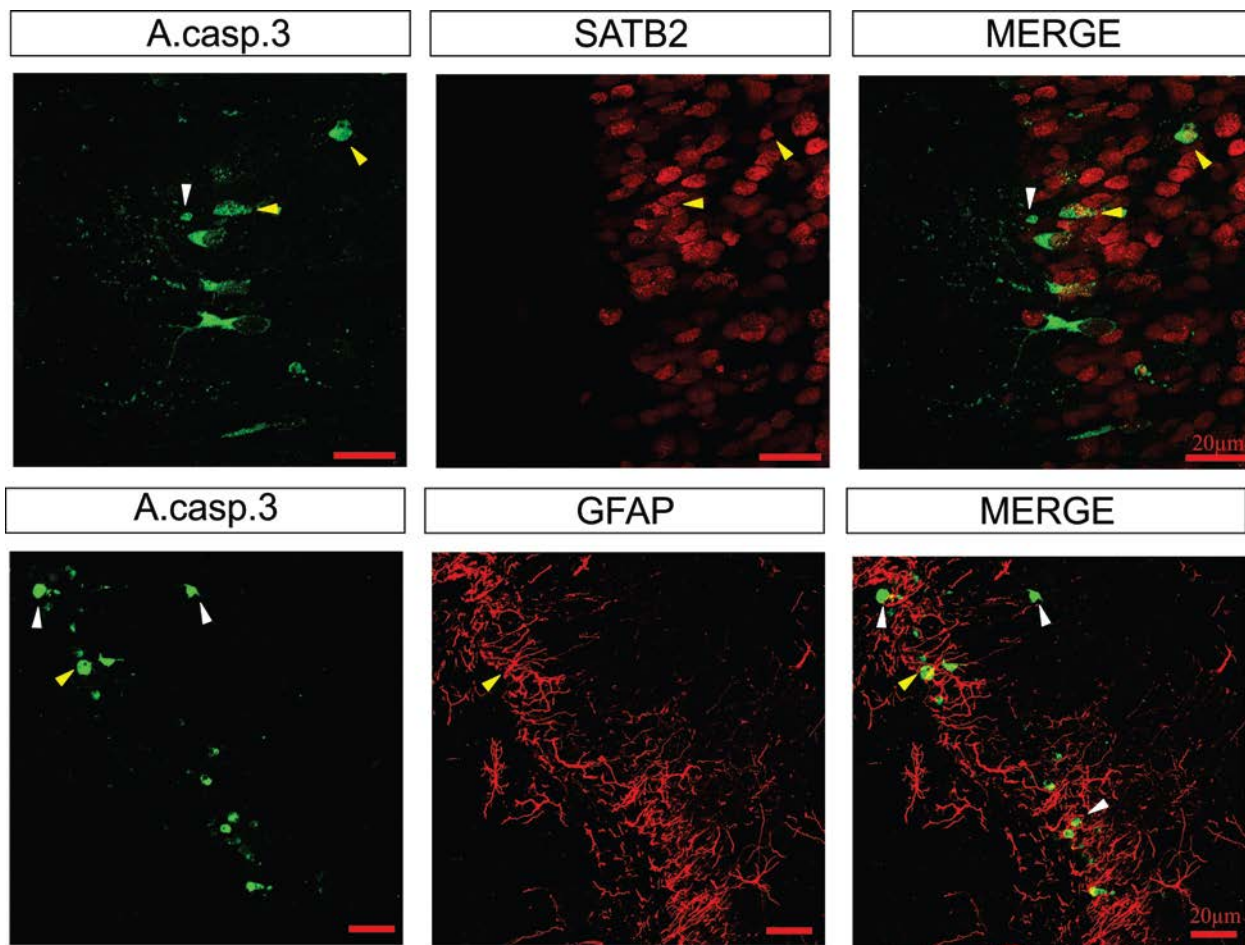


Рис. 31 Результаты подсчета клеток, позитивных по активной каспазе-3 в дорзальном субикулуме через 6 часов после введения дексаметазона-DEX, физ. р-ра – SAL, и предварительного введения мемантина в дозе 5мг\кг-M5 и 20 мг\кг – M20, а также совместного введения мемантина и дексаметазона – M5DEX и M20DEX.  
\* -  $p < 0.05$  по сравнению с контролем, & -  $p < 0.05$  по сравнению с DEX.

Введение мемантина вызывало дозозависимое снижение числа нейронов одновременно позитивных по SATB2 и по активной каспазе-3 по сравнению с группой с введением только дексаметазона (Рис.32,33).





*Рис. 32* Репрезентативные микрофотографии колокализации активной каспазы-3 и SATB2, активной каспазы-3 и GFAP у животных через 6 часов после введения дексаметазона в области субикулула. Желтыми стрелками отмечены клетки позитивные по обоим маркерам, белыми – только позитивные по активной каспазе-3. Шкала 20  $\mu\text{m}$  **В.** Количество SATB2 клеток позитивных одновременно по активной каспазе-3 \*,\*\* -  $p < 0.05$  по сравнению с интактной группой. **С.** Количество GFAP клеток позитивных по активной каспазе-3 \* -  $p < 0.05$ .

Следует также отметить, что предварительное введение этого блокатора NMDA рецепторов снижало количество астроцитов, позитивных по активной каспазе-3 вне зависимости от дозы мемантина по сравнению с наблюдаемым после введения одного DEX. (Рис 32,33).

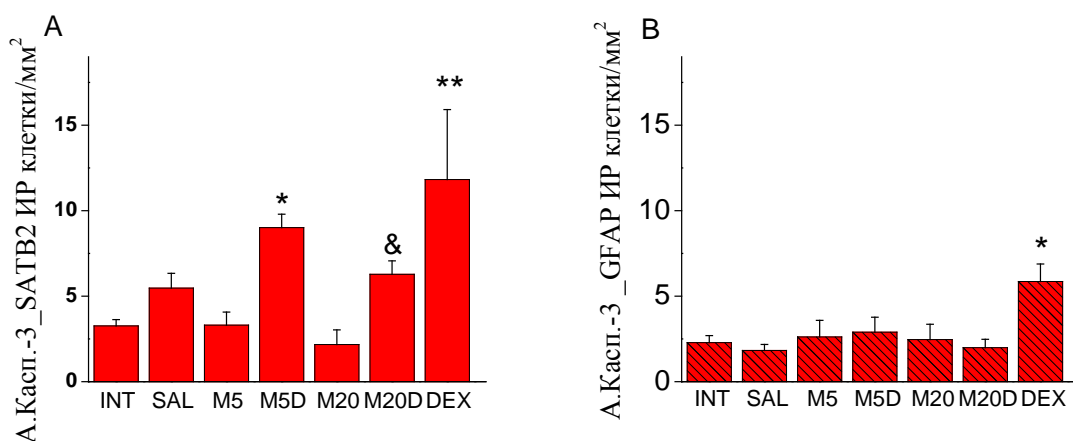


Рис. 33 А. Количество SATB2 клеток позитивных одновременно по активной каспазе-3 В. Количество GFAP клеток позитивных по активной каспазе-3 в дорзальном субикуле через 6 часов после введения дексаметазона-DEX, физ. р-ра – SAL, и предварительного введения мемантина в дозе 5мг\кг-M5 и 20 мг\кг – M20, и совместного введения мемантина и дексаметазона – M5DEX и M20DEX. \*,\*\* -  $p < 0.05$  по сравнению с контролем, & -  $p < 0.05$  по сравнению с DEX.

### 3.5.2 Количество клеток позитивных по реакции TUNEL в дорзальном субикуле через 6ч. после введения дексаметазона и антагониста глутаматных рецепторов мемантина.

Предварительное введение мемантина также дозозависимо снижало количество TUNEL позитивных клеток в дорзальном субикуле (Рис.34).

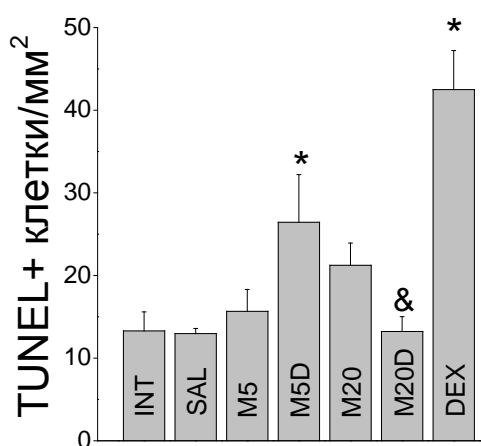


Рис. 34 Результаты подсчета клеток, позитивных по реакции TUNEL в дорзальном субикуле через 6 часов после введения дексаметазона-DEX, физ. р-ра – SAL, и предварительного введения мемантина в дозе 5мг\кг-M5 и 20 мг\кг – M20, и совместного введения мемантина и дексаметазона – M5DEX и M20DEX. \* -  $p < 0.05$  по сравнению с контролем. & -  $p < 0.05$  по сравнению с DEX.

При этом не происходило снижения TUNEL позитивных клеток дорзального субикулула среди клеток одновременно экспрессирующих SATB2 (Рис. 35,36). Популяция TUNEL+SATB2 клеток была заметно ниже А.Каспаз-3+SATB2 позитивных клеток. И наоборот число TUNEL+GFAP клеток было больше числа А.Каспаз-3+GFAP клеток. Эта асимметричность числа астроцитов позитивных по TUNEL и активной каспазе-3 и обратной корреляции этого соотношения для SATB2 нейронов может объясняться разным временем запуска и разной стадией апоптоза в этих типах клеток.

В отличие от нейронов экспрессирующих SATB2 введение мемантина дозозависимо снижало количество TUNEL позитивных клеток среди астроцитов (Рис. 35,36).

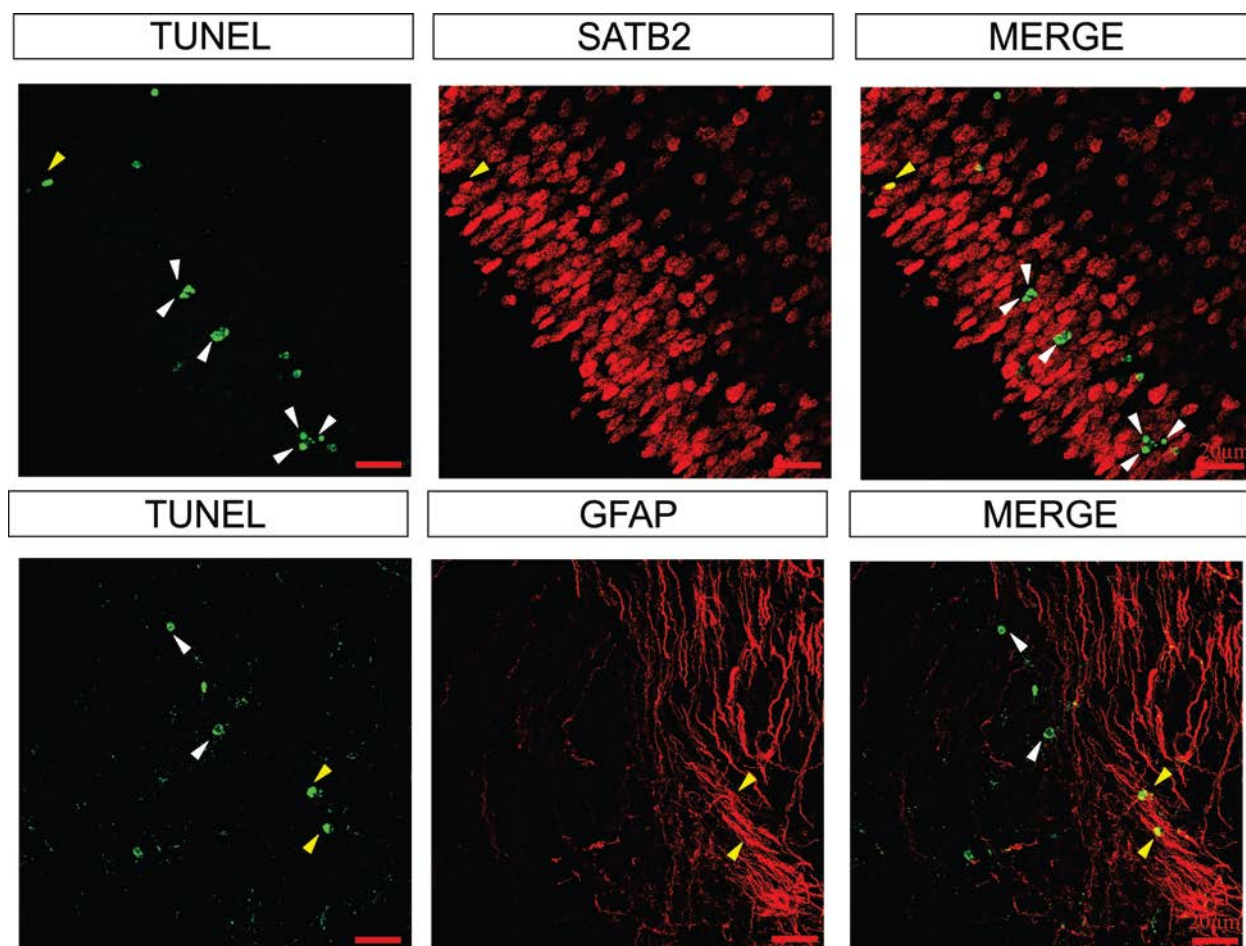


Рис. 35 Репрезентативные микрофотографии колокализации TUNEL позитивных ядер и SATB2, а также TUNEL и GFAP у животных через 6 часов после введения дексаметазона. Желтыми стрелками отмечены клетки позитивные по обоим маркерам, белыми – только позитивные по реакции TUNEL Шкала 20 μm.

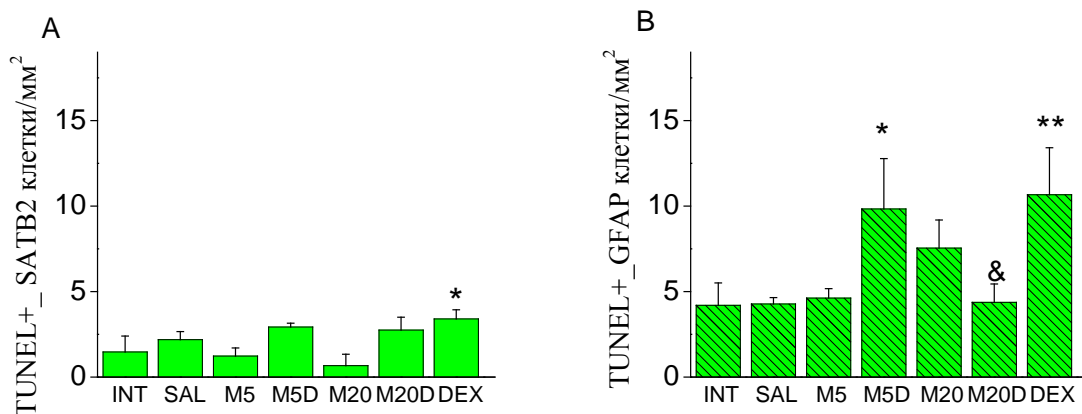


Рис. 36 (А) Количество SATB2 клеток позитивных одновременно по реакции TUNEL (В) Количество GFAP TUNEL позитивных клеток в дорзальном субикулуме через 6 часов после введения дексаметазона-DEX, физ. р-ра – SAL, и предварительного введения мемантина в дозе 5 мг\кг – M5 и 20 мг\кг – M20, и совместного введения мемантина и дексаметазона – M5DEX и M20DEX. \*, \*\* -  $p < 0.05$  по сравнению с контролем, & -  $p < 0.05$  по сравнению с DEX

Таким образом результаты работы в целом свидетельствуют что влияние дексаметазона на процессы ПКГ путем апоптоза в неонатальном мозге неоднозначно. Оно зависит от структуры и времени от начала действия гормона. Дексаметазон вызывает увеличение гибели клеток дорзального субикулума непрямым путем, опосредованным глутаматэргической эксайтотоксичностью и в то же время снижает экспрессию каспазы-3 в неокортексе через 6 часов после инъекции. Введение дексаметазона активирует нейроны гиппокампа, особенно в области CA1, с наибольшей плотностью глюкокортикоидных рецепторов. Это способно вызывать повышение внеклеточного глутамата в субикулуме, главной афферентной структуре нейронов гиппокампа, что судя по нашим данным и приводит клетки субикулума к гибели.

## Глава 4. Обсуждение.

---

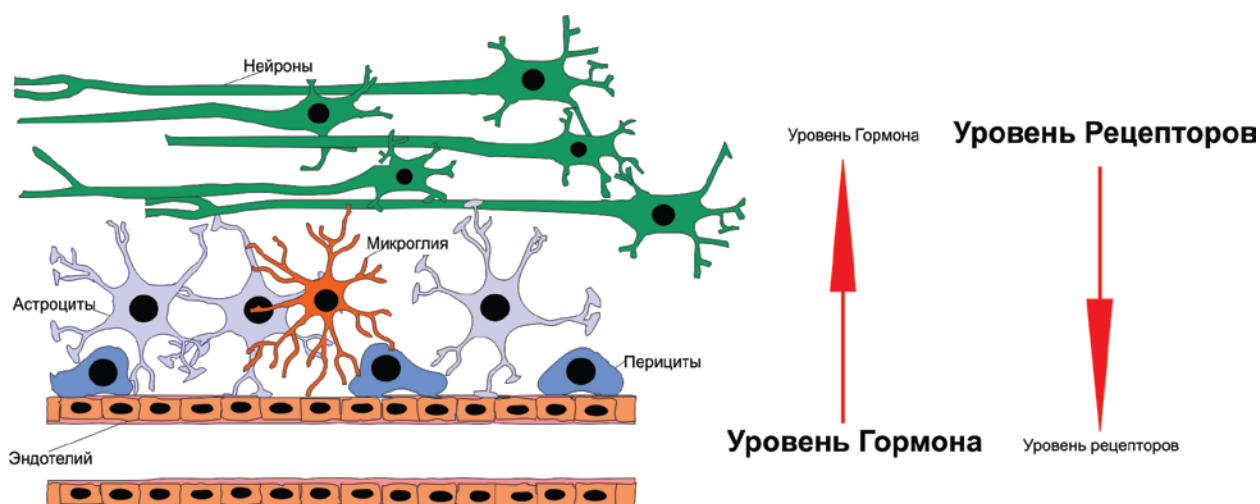
В процессе формирования головного мозга млекопитающих почти половина из изначально образовавшихся нервных клеток погибает в результате естественного физиологического апоптоза. Закладка избыточного количества клеток с последующей элиминацией неостребованных необходима для формирования строго упорядоченной структуры связей в ЦНС (Oppenheim, 1991; Mazarakis et al., 1997; Yuan, Yankner, 2000). Асинхронность развития головного мозга может вносить существенный вклад в уровень интенсивности процессов апоптоза в каждый конкретный период онтогенеза в разных его отделах (Будко, Шулейкина, 1985). Различия в исходной активности молекулярных механизмов апоптоза детерминируют специфическую предрасположенность нервных клеток каждой из структур мозга к его запуску. Количество клеток, которые могут быть элиминированы в процессе апоптоза в головном мозгу млекопитающих, в отличие от клеток *C. elegans*, не является жестко детерминированным (Meier et al., 2000). Данное обстоятельство открывает потенциальную возможность ряду средовых и онтогенетических факторов изменять интенсивность реализации программы апоптоза в мозге.

На протяжении всего перинатального периода организм подвергается различным стрессорным воздействиям. Стресс сопровождается увеличением в крови уровня глюкокортикоидных гормонов, которые легко проникают в головной мозг (Sapolsky et al., 2000). Поскольку известно, что глюкокортикоиды влияют на ПКГ путем апоптоза клеток ряда органов и тканей, в их числе и гиппокамп взрослых животных (Haynes et al., 2001), можно предполагать возможность действия этих гормонов и на экспрессию как регуляторных, так и эффекторных белков апоптоза в формирующемся

головном мозге, через изменение транскрипции генов активированным глюкокортикоидным рецептором.

Чтобы понять в каких клетках может произойти модуляция естественной гибели и какие клетки могут быть восприимчивы к влиянию глюкокортикоидов мы провели колокализацию глюкокортикоидных рецепторов с различными маркерами типов клеток ЦНС в энторинальном кортексе. Так, из изученных маркеров клеточных типов наибольшая степень колокализации была с кальретенином в интернейронах, а наименьшая с GFAP в астроцитах, это согласуется с тем, что при введении дексаметазона в неонатальный период, в амигдале гибнут в основном GABA-эргические интернейроны из кальбиндинового и кальретенинового субтипов (Zuloaga et al., 2011) , но вместе с тем введение дексаметазона также может оказывать влияние на число астроцитов в области мозолистого тела и гиппокампа (Claessens et al., 2012). Средние значения коэффициента перекрывания иммунофлуоресценции GR с другими транскрипционными факторами-маркерами SATB2 и NURR1 возможно объясняются тем, что в отсутствие стимуляции лигандом глюкокортикоидный рецептор имеет цитоплазматическую локализацию, и это очевидно является причиной более высокого коэффициента колокализации с цитоплазматически локализованным кальретенином. В то же время в астроцитах большая часть GR имеет ядерное расположение, так как эти клетки являясь частью гематоэнцефалического барьера, первыми находятся на пути гормона, приходящего из кровеносных сосудов. Не исключено, что уровень GR в астроцитах может быть ниже также из-за негативной регуляции собственным гормоном, поступающим из кровотока прежде всего в этот тип клеток (рис. 37)





*Рис.37 Негативная обратная связь регуляции глюкокортикоидных рецепторов в зависимости от градиента гормона, проникающего через гематоэнцефалический барьер.*

Формирование головного мозга крысят в течение первой недели жизни соответствует стадии развития мозга человека в предродовой период (Whitelaw, Thoresen, 2000; Flagel et al., 2002). В это время часто наблюдается гипоксия, связанная с осложненным процессом родов, а также при их преждевременном наступлении. Эта гипоксия вызвана возможным недостатком сурфактанта в легких (респираторный дистресс синдром новорожденных). Используемые в работе экспериментальные модели позволяют оценить влияние на процесс апоптоза в развивающемся мозге как отдельно глюкокортикоидов, так и фактора - «гипоксия новорожденных», а также и комплексного фактора «гипоксия-глюкокортикоиды», который является достаточно распространенным в перинатальной медицине, поскольку именно глюкокортикоиды, являющиеся индукторами сурфактанта, применяются для предотвращения респираторного дистресс синдрома новорожденных. Используемая нами в эксперименте доза дексаметазона эквивалентна так называемым умеренно-низким клиническим дозам, широко применяемым в перинатальной практике (Martinez et al., 2001).

Даже однократное введение глюкокортикоида на третий день жизни привело к снижению прироста массы через шесть часов после инъекции и достоверно снижало средний вес тела животных к восьмому дню жизни. Данный эффект глюкокортикоидов обусловлен подавлением синтеза белка de

ново, а также снижением активности ферментов, необходимых для нормального роста и общего развития организма. Такое действие этих гормонов хорошо известно (Whitelaw, Thoresen, 2000; Jobe, 2004; Muller et al., 2004) и является индикатором эффективности дозы DEX, использованной в работе. Гипоксия не привела к статистически значимым изменениям массы тела крысят в наших экспериментах.

Существенные изменения интенсивности ПКГ в неонатальной ЦНС наблюдаются уже через несколько часов после первоначального повреждающего воздействия, такого как, например, глутамат или гипоксия и проявляются на протяжении достаточно длительного времени (Mishra et al., 2001; Grojean et al., 2003). В работе были исследованы как острые эффекты (6ч) глюкокортикоидов, так и довольно отсроченное (через 120 ч.) действие глюкокортикоидов и гипоксии на формирующийся головной мозг.

Значительных изменений в морфологии мозга на срезах, окрашенных по Нисслию, нами не было обнаружено ни от действия глюкокортикоидов, ни от гипоксии. Вместе с тем дексаметазон, достоверно и существенно снижал размеры неокортекса крысят через 120 часов после введения. В основе этого эффекта может лежать ряд процессов. Так размеры неокортекса могут уменьшиться вследствие снижения количества белого вещества и олигодендроцитов (Murphy et al., 2001), а также числа отростков нейронов (Silva-Gomez et al., 2013). Кроме того глюкокортикоиды вызывают апоптоз нейрональных предшественников в SVZ (Bhatt et al., 2013), а также уменьшают число астроцитов, согласно данным литературы (Claessens et al., 2012). При том, что оба фактора снижали размеры коры головного мозга, усиления от их совместного действия не происходило. Этот результат может быть обусловлен тем, что и DEX и гипоксия вовлекают в нарушение формирования коры одни и те же механизмы, активация, которых достигает максимума уже при действии каждого из этих факторов в отдельности.

Глюкокортикоидные гормоны, широко используются в перинатальной практике для предотвращения респираторного дистресс



синдрома. Таким образом плод и новорожденный оказываются под воздействием сразу двух факторов: повышенного уровня глюкокортикоидов и гипоксии, каждый из которых по-своему влияет на ПКГ путем апоптоза.

Первичное повреждающее действие гипоксии связано с истощением энергетических запасов клеток мозга, индукцией свободно-радикальных механизмов перекисного окисления клеточных мембран и глутаматэргической активацией NMDA рецепторов и эксайтотоксичностью, сопровождающейся входом ионов кальция в клетки (Mishra, Delivoria-Papadopoulos, 1999; Mishra et al., 2001). Гипоксия также индуцирует активацию транскрипционного фактора HIF-1, который взаимодействует с так называемыми гипоксия реагирующими элементами (HRE) в промоторах ряда генов, регулируя транскрипцию этих генов при снижении концентрации кислорода в клетке (Wenger, 2000; Zagorska, Dulak, 2004).

В настоящее время известно, что гипоксия и глюкокортикоиды реализуют свое действие путем активации внутриклеточных транскрипционных факторов: HIF-1, GR и MR (Wenger, 2000; Aranda, Pascual, 2001; Zagorska, Dulak, 2004). Ранее было показано, что активированный глюкокортикоидный рецептор способен за счет белок-белковых взаимодействий с HIF-1 усиливать или подавлять транскрипцию некоторых генов при гипоксии *in vitro* (Kodama et al., 2003). Данные факты свидетельствуют о том, что в основе взаимного влияния глюкокортикоидов и гипоксии на экспрессию генов апоптоза могут быть межмолекулярные взаимодействия между активированными транскрипционными факторами GR, MR и HIF-1, сопровождающиеся последующей модуляцией их эффектов на процессы транскрипции разнообразных генов, среди которых могут оказаться и регуляторы посттранскрипционных событий. В то же время не исключено, что изменение экспрессии каспазы-3 в неонатальном мозге, обусловленное совместным действием гипоксии и глюкокортикоидов, может иметь и более сложную молекулярную природу.

Для исследования как совместного, так и по отдельности действия глюкокортикоидов и гипоксии на процессы апоптоза в неонатальном мозге мы провели анализ изменения уровня активной каспазы-3 во фронтальном неокортексе 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. 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 (Surjit et al., 2011; Polman et al., 2013), с индуцируемыми гипоксией транскрипционными факторами (HIF). Без взаимодействия с факторами гипоксии сам по себе гормон вызывал повышение уровня активной каспазы-3.

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, 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.

Данные о чувствительности клеток формирующегося мозга к действию глюкокортикоидных гормонов неоднозначны. Прямое действие глюкокортикоидов на экспрессию белков апоптозного каскада через

находящиеся в промоторах их генов гормон-отвечающие элементы генома (GRE), судя по имеющимся данным, следует ожидать анти-апоптозным. GRE обнаружены в промоторе гена анти-апоптозного белка Bcl-xL и глюкокортикоиды индуцируют экспрессию Bcl-xL в культурах клеток (Ni Chonghaile et al., 2006), а также в клетках некоторых структур неонатального мозга (Menshanov et al., 2013), снижая тем самым интенсивность программируемой гибели этих клеток. В наших опытах мы не наблюдали определенно позитивных клеток по активной каспазе-3 в коре головного мозга. Однако DEX снижал уровень мРНК прокаспазы-3 и интенсивность иммуноокрашивания по активной каспазе-3 в этой структуре. В последнее время появляется всё больше сведений о неапоптозных функциях каспазы-3, о её важности для функционирования цитоскелета (Rohn et al., 2004), долговременной депрессии LTD и интернализации AMPA рецепторов гиппокампа (Li et al., 2010). Понижение экспрессии активной каспазы-3 в неокортексе глюкокортикоидами может быть связано с катаболическим действием гормона и регуляцией неапоптозных функций каспазы-3 в этой структуре мозга.

В то же время, наблюдается и стимуляция апоптоза клеток ряда структур мозга глюкокортикоидом дексаметазоном, что, очевидно, может быть одной из причин негативного влияния этого гормона в раннем онтогенезе на поведение животных, у которых нарушается формирование локомоторной функции в неонатальном возрасте и в последующие периоды жизни проявляется депрессивно-подобное поведение (Nagano et al., 2008; Nagano et al., 2012; Menshanov et al., 2014). Отсутствие, согласно современным данным GREs (Polman et al., 2013) в промоторах про-апоптозных генов делает невозможным прямое активирующее действие дексаметазона через GRE на их экспрессию, оставляя открытым вопрос об опосредованной иными, до последнего времени не ясными глюкокортикоид-зависимыми процессами активации апоптоза. По данным, полученным на лимфоцитах, гормон вызывает их гибель из-за повышения активированным

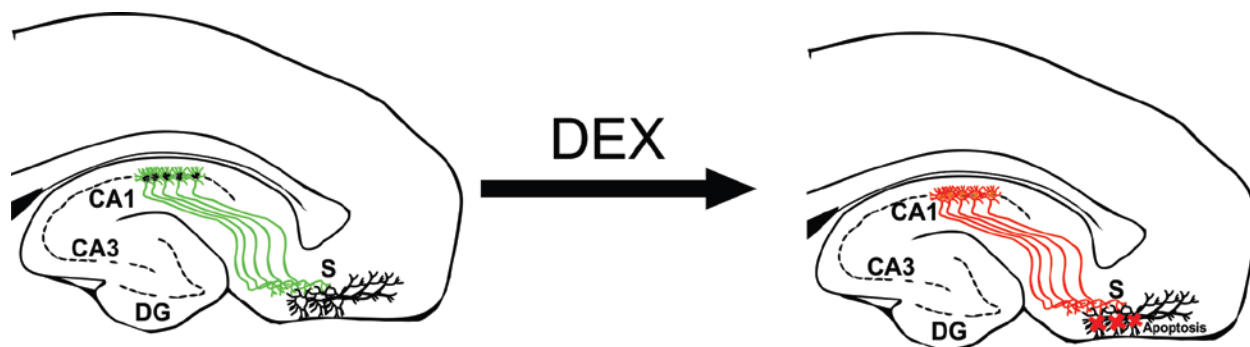
глюкокортикоидным рецептором экспрессии проапоптозного белка Vim (Kfir-Erenfeld et al., 2010). В неонатальном мозжечке глюкокортикоиды индуцируют апоптоз нейрональных стволовых клеток и предшественников нейронов путем также опосредованной пока еще неясными факторами не прямой активации белка PUMA – проапоптозного члена Bcl-2 семейства (Noguchi et al., 2008). Очевидно потенциально возможны и другие не прямые механизмы, как через индукцию глюкокортикоидными рецепторами клеточных белков, которые в свою очередь активируют экспрессию в этой клетке белков-участников апоптозного каскада (Noguchi et al., 2008; Kfir-Erenfeld et al., 2010; Wu et al., 2013), так и с вовлечением нескольких типов клеток или связанных нейронов через изменения секретируемых ими факторов или же нейромедиаторов.

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, Griffiths, 2013).

Дексаметазон вызывал достоверное увеличение числа клеток позитивных по маркерам апоптоза в дорзальном субикулуме 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 возрастало 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.38). Согласно этому механизму, дексаметазон возбуждает нейроны гиппокампа, и вызывает высвобождение из аксонов клеток извилины CA1 в субикулум глутамата, который в свою очередь вызывает гибель клеток этой структуры мозга (Рис.38).



*Рис. 38 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.*

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, Fuxe, 2008). Так мРНК *c-fos* возростала в гиппокампе уже через час после введения дексаметазона и немного снижалось по истечении двух часов. Иммуноокрашивание по *c-fos* через два часа после введения DEX также давало повышенный сигнал в гиппокампе, что свидетельствует об активации нейронов гиппокампа после введения глюкокортикоидов.

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 позволило нам установить опосредован ли глутаматэргической эксайтотоксичностью индуцированный дексаметазоном апоптоз.

В результате предварительного введения антагониста происходило достоверное и дозозависимое снижение количества позитивных по маркерам апоптоза клеток в дорзальном субикулуме. Уменьшалось как число клеток позитивных по активной каспазе-3, так и количество TUNEL позитивных клеток. Для выяснения какие типы клеток гибнут в дорзальном субикулуме после введения дексаметазона, и оказывается ли эффект мемантина на них таким же, как на всю популяцию клеток, позитивных по активной каспазе и TUNEL, нами были колокализированы эти маркеры апоптоза с маркером астроцитов GFAP и маркером кортико-кортикальных проекционных нейронов SATB2.

В этих экспериментах установлено, что количество клеток, гибнущих при введении дексаметазона соотносится следующим образом: количество TUNEL позитивных астроцитов больше количества позитивных SATB2 нейронов, и наоборот количество астроцитов позитивных по активной каспазе 3 меньше количества SATB2 нейронов, позитивных по этой протеазе. Большее количество TUNEL-позитивных астроцитов, а также отсутствие эффектов введения мемантина на количество астроцитов, положительных по активной каспазе-3 свидетельствует о возможном прямом действии глюкокортикоидов на апоптоз через глюкокортикоидные рецепторы в этих клетках. Астроциты являясь частью гемато-энцефалического барьера первыми получают приходящие из кровеносных сосудов глюкокортикоиды.

В отличии от астроцитов, предварительное введение мемантина уменьшало только количество SATB2 нейронов, положительных по активной каспазе-3 и не изменяло количество SATB2-TUNEL-позитивных нейронов, подтверждая, что эксайтотоксичность вызванная глутаматом CA1 гиппокампа,

после введения глюкокортикоидов может иметь место, а также о сложных механизмах воздействия глюкокортикоидов на апоптоз в неонатальном мозге, в зависимости от типа исследуемых клеток.

Введение антагониста изменяло количество TUNEL позитивных астроцитов. Частично это может объясняться тем, что TUNEL позитивные клетки вступили в апоптоз раньше, чем большинство клеток положительных по активной каспазе-3. Поэтому после введения мемантина нами наблюдается изменение числа TUNEL-позитивных астроцитов и не наблюдается изменения числа TUNEL – позитивных SATB2 нейронов, и обратная ситуация по количеству клеток, позитивных по активной каспазе-3. Эти данные свидетельствуют о сложном механизме влияния глюкокортикоидов на процессы ПКГ путем апоптоза в астроцитах и нейронах, что требует дальнейшего, более детального изучения в контексте их связи с окружающими кровеносными сосудами и работающими нейрональными клетками. В то же время на всю популяцию клеток субикулума предварительное введение мемантина оказало дозозависимый эффект снижения индуцированного DEX апоптоза, что представляет интерес для дальнейшего исследования этого эффекта на кальбиндиновые, кальретениновые интернейроны и холинэргические нейроны и перициты.

В работе впервые показано что в мозге крысят на третий день жизни глюкокортикоидный рецептор наиболее локализуется с маркером интернейронов кальретенином и в меньшей степени с маркером астроцитов GFAP. Также в ходе работы впервые выявлен механизм, по которому дексаметазон повышает апоптоз в субикулуме. Установлено влияние как повышенного уровня глюкокортикоидов, так и гипоксии на ПКГ путем апоптоза в неонатальной коре головного мозга.

## **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.



## **Библиография.**

1. Будко К.П., Шулейкина К.В. Нейроонтогенез. — М.: Наука. — 1985.
2. Abraham I., Juhasz G., Kekesi K.A., Kovacs K.J. Effect of intrahippocampal dexamethasone on the levels of amino acid transmitters and neuronal excitability. // *Brain Res.* — 1996. — Vol. 733. — N 1. — P. 56-63.
3. Abraham I.M., Harkany T., Horvath K.M., Luiten P.G. Action of glucocorticoids on survival of nerve cells: promoting neurodegeneration or neuroprotection? // *J Neuroendocrinol.* — 2001. — Vol. 13. — N 9. — P. 749-760.
4. Adler J., Parmryd I. Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. // *Cytometry A.* — 2010. — Vol. 77. — N 8. — P. 733-742.
5. Afanas'ev V.N., Korol B.A., Mantsygin Yu A., Nelipovich P.A., Pechatnikov V.A., Umansky S.R. Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. // *FEBS Lett.* — 1986. — Vol. 194. — N 2. — P. 347-350.
6. Akhtar R.S., Ness J.M., Roth K.A. Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. // *Biochim Biophys Acta.* — 2004. — Vol. 1644. — N 2-3. — P. 189-203.
7. Alcamo E.A., Chirivella L., Dautzenberg M., Dobрева G., Farinas I., Grosschedl R., McConnell S.K. Satb2 regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. // *Neuron.* — 2008. — Vol. 57. — N 3. — P. 364-377.
8. Almeida A., Bolanos J.P. A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. // *J Neurochem.* — 2001. — Vol. 77. — N 2. — P. 676-690.
9. Almeida O.F., Conde G.L., Crochemore C., Demeneix B.A., Fischer D., Hassan A.H., Meyer M., Holsboer F., Michaelidis T.M. Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. // *Faseb J.* — 2000. — Vol. 14. — N 5. — P. 779-790.

10. Amsterdam A., Tajima K., Sasson R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. // *Biochem Pharmacol.* — 2002. — Vol. 64. — N 5-6. — P. 843-850.
11. Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. // *Brain Res Brain Res Rev.* — 1999. — Vol. 29. — N 1. — P. 83-120.
12. Aranda A., Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. // *Physiol Rev.* — 2001. — Vol. 81. — N 3. — P. 1269-1304.
13. Armstrong R.C., Aja T.J., Hoang K.D., Gaur S., Bai X., Alnemri E.S., Litwack G., Karanewsky D.S., Fritz L.C., Tomaselli K.J. Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. // *J Neurosci.* — 1997. — Vol. 17. — N 2. — P. 553-562.
14. Aronsson M., Fuxe K., Dong Y., Agnati L.F., Okret S., Gustafsson J.A. Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1988. — Vol. 85. — N 23. — P. 9331-9335.
15. Arrendale A., Kim K., Choi J.Y., Li W., Geahlen R.L., Borch R.F. Synthesis of a phosphoserine mimetic prodrug with potent 14-3-3 protein inhibitory activity. // *Chem Biol.* — 2012. — Vol. 19. — N 6. — P. 764-771.
16. Arundine M., Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. // *Cell Mol Life Sci.* — 2004. — Vol. 61. — N 6. — P. 657-668.
17. Ashe P.C., Berry M.D. Apoptotic signaling cascades. // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* — 2003. — Vol. 27. — N 2. — P. 199-214.
18. Ashwell J.D., Lu F.W., Vacchio M.S. Glucocorticoids in T cell development and function\*. // *Annu Rev Immunol.* — 2000. — Vol. 18. — N. — P. 309-345.

19. Atlante A., Calissano P., Bobba A., Giannattasio S., Marra E., Passarella S. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. // *FEBS Lett.* — 2001. — Vol. 497. — N 1. — P. 1-5.
20. Babot Z., Cristofol R., Sunol C. Excitotoxic death induced by released glutamate in depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABAA receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels. // *Eur J Neurosci.* — 2005. — Vol. 21. — N 1. — P. 103-112.
21. Bae E.J., Lee H.S., Park C.H., Lee S.H. Orphan nuclear receptor Nurrl induces neuron differentiation from embryonic cortical precursor cells via an extrinsic paracrine mechanism. // *FEBS Lett.* — 2009. — Vol. 583. — N 9. — P. 1505-1510.
22. Bamberger C.M., Schulte H.M., Chrousos G.P. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. // *Endocr Rev.* — 1996. — Vol. 17. — N 3. — P. 245-261.
23. Banhegyi G., Mandl J., Csala M. Redox-based endoplasmic reticulum dysfunction in neurological diseases. // *J Neurochem.* — 2008. — Vol. 107. — N 1. — P. 20-34.
24. 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.
25. Benesova O., Pavlik A. Perinatal treatment with glucocorticoids and the risk of maldevelopment of the brain. // *Neuropharmacology.* — 1989. — Vol. 28. — N 1. — P. 89-97.
26. Benn S.C., Woolf C.J. Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. // *Nat Rev Neurosci.* — 2004. — Vol. 5. — N 9. — P. 686-700.
27. Berger S., Bleich M., Schmid W., Cole T.J., Peters J., Watanabe H., Kriz W., Warth R., Greger R., Schutz G. Mineralocorticoid receptor knockout mice:

pathophysiology of Na<sup>+</sup> metabolism. // Proc Natl Acad Sci U S A. — 1998. — Vol. 95. — N 16. — P. 9424-9429.

28. Berman F.W., Murray T.F. Domoic acid neurotoxicity in cultured cerebellar granule neurons is mediated predominantly by NMDA receptors that are activated as a consequence of excitatory amino acid release. // J Neurochem. — 1997. — Vol. 69. — N 2. — P. 693-703.

29. Bhatt A.J., Feng Y., Wang J., Famuyide M., Hersey K. Dexamethasone induces apoptosis of progenitor cells in the subventricular zone and dentate gyrus of developing rat brain. // J Neurosci Res. — 2013. — Vol. — N. — P.

30. Blaschke A.J., Staley K., Chun J. Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. // Development. — 1996. — Vol. 122. — N 4. — P. 1165-1174.

31. Bohn M.C., Dean D., Hussain S., Giuliano R. Development of mRNAs for glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in rat hippocampus. // Brain Res Dev Brain Res. — 1994. — Vol. 77. — N 2. — P. 157-162.

32. Borgers M., Shu L.G., Xhonneux R., Thone F., Van Overloop P. Changes in ultrastructure and Ca<sup>2+</sup> distribution in the isolated working rabbit heart after ischemia. A time-related study. // Am J Pathol. — 1987. — Vol. 126. — N 1. — P. 92-102.

33. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. // Mol Immunol. — 2003. — Vol. 39. — N 11. — P. 615-647.

34. Bouillet P., Strasser A. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. // J Cell Sci. — 2002. — Vol. 115. — N Pt 8. — P. 1567-1574.

35. Boyce M., Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. // Cell Death Differ. — 2006. — Vol. 13. — N 3. — P. 363-373.

36. Bratton D.L., Henson P.M. Apoptotic cell recognition: will the real phosphatidylserine receptor(s) please stand up? // Curr Biol. — 2008. — Vol. 18. — N 2. — P. R76-79.

37. Brennan M.A., Cookson B.T. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. // *Mol Microbiol.* — 2000. — Vol. 38. — N 1. — P. 31-40.
38. Breslin M.B., Vedeckis W.V. The human glucocorticoid receptor promoter upstream sequences contain binding sites for the ubiquitous transcription factor, Yin Yang 1. // *J Steroid Biochem Mol Biol.* — 1998. — Vol. 67. — N 5-6. — P. 369-381.
39. Britanova O., Akopov S., Lukyanov S., Gruss P., Tarabykin V. Novel transcription factor Satb2 interacts with matrix attachment region DNA elements in a tissue-specific manner and demonstrates cell-type-dependent expression in the developing mouse CNS. // *Eur J Neurosci.* — 2005. — Vol. 21. — N 3. — P. 658-668.
40. Britanova O., de Juan Romero C., Cheung A., Kwan K.Y., Schwark M., Gyorgy A., Vogel T., Akopov S., Mitkovski M., Agoston D., Sestan N., Molnar Z., Tarabykin V. Satb2 is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. // *Neuron.* — 2008. — Vol. 57. — N 3. — P. 378-392.
41. Brocato J., Chervona Y., Costa M. Molecular responses to hypoxia-inducible factor 1alpha and beyond. // *Mol Pharmacol.* — 2014. — Vol. 85. — N 5. — P. 651-657.
42. Brunk U.T., Neuzil J., Eaton J.W. Lysosomal involvement in apoptosis. // *Redox Rep.* — 2001. — Vol. 6. — N 2. — P. 91-97.
43. Buckley I.K. A light and electron microscopic study of thermally injured cultured cells. // *Lab Invest.* — 1972. — Vol. 26. — N 2. — P. 201-209.
44. Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. // *Annu Rev Cell Dev Biol.* — 1999. — Vol. 15. — N. — P. 269-290.
45. Burnashev N., Monyer H., Seeburg P.H., Sakmann B. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. // *Neuron.* — 1992. — Vol. 8. — N 1. — P. 189-198.

46. Canu N., Tufi R., Serafino A.L., Amadoro G., Ciotti M.T., Calissano P. Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. // *J Neurochem.* — 2005. — Vol. 92. — N 5. — P. 1228-1242.
47. Carafoli E., Santella L., Branca D., Brini M. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* — 2001. — Vol. 36. — N 2. — P. 107-260.
48. Carriedo S.G., Yin H.Z., Weiss J.H. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. // *J Neurosci.* — 1996. — Vol. 16. — N 13. — P. 4069-4079.
49. Castilho R.F., Hansson O., Ward M.W., Budd S.L., Nicholls D.G. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. // *J Neurosci.* — 1998. — Vol. 18. — N 24. — P. 10277-10286.
50. Certo M., Del Gaizo Moore V., Nishino M., Wei G., Korsmeyer S., Armstrong S.A., Letai A. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. // *Cancer Cell.* — 2006. — Vol. 9. — N 5. — P. 351-365.
51. Chae H.J., Chae S.W., Kang J.S., Bang B.G., Cho S.B., Park R.K., So H.S., Kim Y.K., Kim H.M., Kim H.R. Dexamethasone suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in osteoblasts: possible role for ceramide. // *Endocrinology.* — 2000. — Vol. 141. — N 8. — P. 2904-2913.
52. Chang H.Y., Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. // *Microbiol Mol Biol Rev.* — 2000. — Vol. 64. — N 4. — P. 821-846.
53. Chao D.T., Korsmeyer S.J. BCL-2 family: regulators of cell death. // *Annu Rev Immunol.* — 1998. — Vol. 16. — N. — P. 395-419.
54. Chauhan D., Pandey P., Ogata A., Teoh G., Treon S., Urashima M., Kharbanda S., Anderson K.C. Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism. // *Oncogene.* — 1997. — Vol. 15. — N 7. — P. 837-843.

55. Chen L., Willis S.N., Wei A., Smith B.J., Fletcher J.I., Hinds M.G., Colman P.M., Day C.L., Adams J.M., Huang D.C. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. // *Mol Cell*. — 2005. — Vol. 17. — N 3. — P. 393-403.
56. Chien K.R., Abrams J., Serroni A., Martin J.T., Farber J.L. Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. // *J Biol Chem*. — 1978. — Vol. 253. — N 13. — P. 4809-4817.
57. Chmielarz P., Kusmierczyk J., Parlato R., Schutz G., Nalepa I., Kreiner G. Inactivation of glucocorticoid receptor in noradrenergic system influences anxiety- and depressive-like behavior in mice. // *PLoS One*. — 2013. — Vol. 8. — N 8. — P. e72632.
58. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. // *Anal Biochem*. — 1987. — Vol. 162. — N 1. — P. 156-159.
59. Chrysis D., Zaman F., Chagin A.S., Takigawa M., Savendahl L. Dexamethasone induces apoptosis in proliferative chondrocytes through activation of caspases and suppression of the Akt-phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway. // *Endocrinology*. — 2005. — Vol. 146. — N 3. — P. 1391-1397.
60. Claessens S.E., Belanoff J.K., Kanatsou S., Lucassen P.J., Champagne D.L., de Kloet E.R. Acute effects of neonatal dexamethasone treatment on proliferation and astrocyte immunoreactivity in hippocampus and corpus callosum: towards a rescue strategy. // *Brain Res*. — 2012. — Vol. 1482. — N. — P. 1-12.
61. Cole T.J., Blendy J.A., Monaghan A.P., Krieglstein K., Schmid W., Aguzzi A., Fantuzzi G., Hummler E., Unsicker K., Schutz G. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. // *Genes Dev*. — 1995. — Vol. 9. — N 13. — P. 1608-1621.
62. Coleman L.S. A hypothesis: factor VII governs clot formation, tissue repair and apoptosis. // *Med Hypotheses*. — 2007. — Vol. 69. — N 4. — P. 903-907.

63. Collin T., Franconville R., Ehrlich B.E., Llano I. Activation of metabotropic glutamate receptors induces periodic burst firing and concomitant cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations in cerebellar interneurons. // *J Neurosci.* — 2009. — Vol. 29. — N 29. — P. 9281-9291.
64. Cookson B.T., Brennan M.A. Pro-inflammatory programmed cell death. // *Trends Microbiol.* — 2001. — Vol. 9. — N 3. — P. 113-114.
65. Costas M.A., Muller Igaz L., Holsboer F., Arzt E. Transrepression of NF-kappaB is not required for glucocorticoid-mediated protection of TNF-alpha-induced apoptosis on fibroblasts. // *Biochim Biophys Acta.* — 2000. — Vol. 1499. — N 1-2. — P. 122-129.
66. Cristofanilli M., Akopian A. Calcium channel and glutamate receptor activities regulate actin organization in salamander retinal neurons. // *J Physiol.* — 2006. — Vol. 575. — N Pt 2. — P. 543-554.
67. Czock D., Keller F., Rasche F.M., Haussler U. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. // *Clin Pharmacokinet.* — 2005. — Vol. 44. — N 1. — P. 61-98.
68. Degtarev A., Boyce M., Yuan J. A decade of caspases. // *Oncogene.* — 2003. — Vol. 22. — N 53. — P. 8543-8567.
69. Deveraux Q.L., Reed J.C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. // *Genes Dev.* — 1999. — Vol. 13. — N 3. — P. 239-252.
70. Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F. The glutamate receptor ion channels. // *Pharmacol Rev.* — 1999. — Vol. 51. — N 1. — P. 7-61.
71. Dobbing J., Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. // *Early Hum Dev.* — 1979. — Vol. 3. — N 1. — P. 79-83.
72. Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. // *Pharmacol Ther.* — 1999. — Vol. 81. — N 3. — P. 163-221.
73. Drakulic D., Velickovic N., Stanojlovic M., Grkovic I., Mitrovic N., Lavrnja I., Horvat A. Low-dose dexamethasone treatment promotes the pro-survival



- signalling pathway in the adult rat prefrontal cortex. // *J Neuroendocrinol.* — 2013. — Vol. 25. — N 7. — P. 605-616.
74. Duksal F., Kilic I., Tufan A.C., Akdogan I. Effects of different corticosteroids on the brain weight and hippocampal neuronal loss in rats. // *Brain Res.* — 2009. — Vol. 1250. — N. — P. 75-80.
75. Dunn K.W., Kamocka M.M., McDonald J.H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. // *Am J Physiol Cell Physiol.* — 2011. — Vol. 300. — N 4. — P. C723-742.
76. Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. // *Annu Rev Biochem.* — 1999. — Vol. 68. — N. — P. 383-424.
77. Edwards H.E., Burnham W.M. The impact of corticosteroids on the developing animal. // *Pediatr Res.* — 2001. — Vol. 50. — N 4. — P. 433-440.
78. Ekert P., MacLusky N., Luo X.P., Lehotay D.C., Smith B., Post M., Tanswell A.K. Dexamethasone prevents apoptosis in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) by a reactive oxygen species-independent mechanism. // *Brain Res.* — 1997. — Vol. 747. — N 1. — P. 9-17.
79. Fan L., Li J., Yu Z., Dang X., Wang K. The Hypoxia-Inducible Factor Pathway, Prolyl Hydroxylase Domain Protein Inhibitors, and Their Roles in Bone Repair and Regeneration. // *Biomed Res Int.* — 2014. — Vol. 2014. — N. — P. 239356.
80. Ferguson S.A., Paule M.G., Holson R.R. Neonatal dexamethasone on day 7 in rats causes behavioral alterations reflective of hippocampal, but not cerebellar, deficits. // *Neurotoxicol Teratol.* — 2001. — Vol. 23. — N 1. — P. 57-69.
81. Fink S.L., Cookson B.T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. // *Cell Microbiol.* — 2006. — Vol. 8. — N 11. — P. 1812-1825.
82. Fiskum G., Starkov A., Polster B.M., Chinopoulos C. Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. // *Ann N Y Acad Sci.* — 2003. — Vol. 991. — N. — P. 111-119.

83. Fligel S.B., Vazquez D.M., Watson S.J., Jr., Neal C.R., Jr. Effects of tapering neonatal dexamethasone on rat growth, neurodevelopment, and stress response. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* — 2002. — Vol. 282. — N 1. — P. R55-63.
84. Forbes-Lorman R.M., Kurian J.R., Auger A.P. MeCP2 regulates GFAP expression within the developing brain. // *Brain Res.* — 2014. — Vol. 1543. — N. — P. 151-158.
85. Funakoshi T., Matsuura A., Noda T., Ohsumi Y. Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. // *Gene.* — 1997. — Vol. 192. — N 2. — P. 207-213.
86. Gao C.J., Niu L., Ren P.C., Wang W., Zhu C., Li Y.Q., Chai W., Sun X.D. Hypoxic preconditioning attenuates global cerebral ischemic injury following asphyxial cardiac arrest through regulation of delta opioid receptor system. // *Neuroscience.* — 2012. — Vol. 202. — N. — P. 352-362.
87. Gao H.B., Tong M.H., Hu Y.Q., Guo Q.S., Ge R., Hardy M.P. Glucocorticoid induces apoptosis in rat leydig cells. // *Endocrinology.* — 2002. — Vol. 143. — N 1. — P. 130-138.
88. Gascoyne D.M., Kypta R.M., Vivanco M.M. Glucocorticoids inhibit apoptosis during fibrosarcoma development by transcriptionally activating Bcl-xL. // *J Biol Chem.* — 2003. — Vol. 278. — N 20. — P. 18022-18029.
89. Gasparini C.F., Griffiths L.R. The biology of the glutamatergic system and potential role in migraine. // *Int J Biomed Sci.* — 2013. — Vol. 9. — N 1. — P. 1-8.
90. Gass P., Kretz O., Wolfer D.P., Berger S., Tronche F., Reichardt H.M., Kellendonk C., Lipp H.P., Schmid W., Schutz G. Genetic disruption of mineralocorticoid receptor leads to impaired neurogenesis and granule cell degeneration in the hippocampus of adult mice. // *EMBO Rep.* — 2000. — Vol. 1. — N 5. — P. 447-451.
91. Golstein P., Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. // *Trends Biochem Sci.* — 2007. — Vol. 32. — N 1. — P. 37-43.

92. Gonzalez-Garcia M., Garcia I., Ding L., O'Shea S., Boise L.H., Thompson C.B., Nunez G. bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1995. — Vol. 92. — N 10. — P. 4304-4308.
93. Gonzalez-Polo R.A., Boya P., Pauleau A.L., Jalil A., Larochette N., Souquere S., Eskelinen E.L., Pierron G., Saftig P., Kroemer G. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. // *J Cell Sci.* — 2005. — Vol. 118. — N Pt 14. — P. 3091-3102.
94. Goping I.S., Gross A., Lavoie J.N., Nguyen M., Jemmerson R., Roth K., Korsmeyer S.J., Shore G.C. Regulated targeting of BAX to mitochondria. // *J Cell Biol.* — 1998. — Vol. 143. — N 1. — P. 207-215.
95. Greenstein S., Ghias K., Krett N.L., Rosen S.T. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. // *Clin Cancer Res.* — 2002. — Vol. 8. — N 6. — P. 1681-1694.
96. Greiner M., Cardenas S., Parra C., Bravo J., Avalos A.M., Paredes A., Lara H.E., Fiedler J.L. Adrenalectomy regulates apoptotic-associated genes in rat hippocampus. // *Endocrine.* — 2001. — Vol. 15. — N 3. — P. 323-333.
97. Grojean S., Pourie G., Vert P., Daval J.L. Differential neuronal fates in the CA1 hippocampus after hypoxia in newborn and 7-day-old rats: effects of pre-treatment with MK-801. // *Hippocampus.* — 2003. — Vol. 13. — N 8. — P. 970-977.
98. Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. // *Genes Dev.* — 1999. — Vol. 13. — N 15. — P. 1899-1911.
99. Gu Y.T., Zhang H., Xue Y.X. Dexamethasone treatment modulates aquaporin-4 expression after intracerebral hemorrhage in rats. // *Neurosci Lett.* — 2007. — Vol. 413. — N 2. — P. 126-131.
100. Gunther C., Neumann H., Neurath M.F., Becker C. Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. // *Gut.* — 2013. — Vol. 62. — N 7. — P. 1062-1071.

101. Gurusamy N., Lekli I., Gorbunov N.V., Gherghiceanu M., Popescu L.M., Das D.K. Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein. // *J Cell Mol Med.* — 2009. — Vol. 13. — N 2. — P. 373-387.
102. Hacker G., Weber A. BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? // *Arch Biochem Biophys.* — 2007. — Vol. 462. — N 2. — P. 150-155.
103. Halliday H.L., Ehrenkranz R.A., Doyle L.W. Early (< 8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. // *Cochrane Database Syst Rev.* — 2009a. — Vol. — N 1. — P. CD001146.
104. Halliday H.L., Ehrenkranz R.A., Doyle L.W. Late (>7 days) postnatal corticosteroids for chronic lung disease in preterm infants. // *Cochrane Database Syst Rev.* — 2009b. — Vol. — N 1. — P. CD001145.
105. Hansson A.C., Fuxe K. Time-course of immediate early gene expression in hippocampal subregions of adrenalectomized rats after acute corticosterone challenge. // *Brain Res.* — 2008. — Vol. 1215. — N. — P. 1-10.
106. Hassan A.H., von Rosenstiel P., Patchev V.K., Holsboer F., Almeida O.F. Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. // *Exp Neurol.* — 1996. — Vol. 140. — N 1. — P. 43-52.
107. Hawkins H.K., Ericsson J.L., Biberfeld P., Trump B.F. Lysosome and phagosome stability in lethal cell injury. Morphologic tracer studies in cell injury due to inhibition of energy metabolism, immune cytolysis and photosensitization. // *Am J Pathol.* — 1972. — Vol. 68. — N 2. — P. 255-258.
108. Haynes L.E., Griffiths M.R., Hyde R.E., Barber D.J., Mitchell I.J. Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: implications for mood disorders. // *Neuroscience.* — 2001. — Vol. 104. — N 1. — P. 57-69.
109. Heidenreich K.A. Molecular mechanisms of neuronal cell death. // *Ann N Y Acad Sci.* — 2003. — Vol. 991. — N. — P. 237-250.

110. Heine V.M., Rowitch D.H. Hedgehog signaling has a protective effect in glucocorticoid-induced mouse neonatal brain injury through an 11betaHSD2-dependent mechanism. // *J Clin Invest.* — 2009. — Vol. 119. — N 2. — P. 267-277.
111. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis. // *Nature.* — 2000. — Vol. 407. — N 6805. — P. 770-776.
112. Hoijman E., Rocha Viegas L., Keller Sarmiento M.I., Rosenstein R.E., Pecci A. Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. // *Endocrinology.* — 2004. — Vol. 145. — N 1. — P. 418-425.
113. Hollmann M., Heinemann S. Cloned glutamate receptors. // *Annu Rev Neurosci.* — 1994. — Vol. 17. — N. — P. 31-108.
114. Holson R.R., Gough B., Sullivan P., Badger T., Sheehan D.M. Prenatal dexamethasone or stress but not ACTH or corticosterone alter sexual behavior in male rats. // *Neurotoxicol Teratol.* — 1995. — Vol. 17. — N 4. — P. 393-401.
115. Hossain A., Hajman K., Charitidi K., Erhardt S., Zimmermann U., Knipper M., Canlon B. Prenatal dexamethasone impairs behavior and the activation of the BDNF exon IV promoter in the paraventricular nucleus in adult offspring. // *Endocrinology.* — 2008. — Vol. 149. — N 12. — P. 6356-6365.
116. Hudson W.H., Youn C., Ortlund E.A. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. // *Nat Struct Mol Biol.* — 2013. — Vol. 20. — N 1. — P. 53-58.
117. Huesmann G.R., Clayton D.F. Dynamic role of postsynaptic caspase-3 and BIRC4 in zebra finch song-response habituation. // *Neuron.* — 2006. — Vol. 52. — N 6. — P. 1061-1072.
118. Ikeda T., Mishima K., Yoshikawa T., Iwasaki K., Fujiwara M., Xia Y.X., Ikenoue T. Dexamethasone prevents long-lasting learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. // *Behav Brain Res.* — 2002. — Vol. 136. — N 1. — P. 161-170.

119. Inglefield J.R., Schwartz-Bloom R.D. Activation of excitatory amino acid receptors in the rat hippocampal slice increases intracellular Cl<sup>-</sup> and cell volume. // *J Neurochem.* — 1998. — Vol. 71. — N 4. — P. 1396-1404.
120. Inoue H., Okada Y. Roles of volume-sensitive chloride channel in excitotoxic neuronal injury. // *J Neurosci.* — 2007. — Vol. 27. — N 6. — P. 1445-1455.
121. Inoue H., Tani K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. // *Cell Death Differ.* — 2014. — Vol. 21. — N 1. — P. 39-49.
122. Jacobson M.D., Weil M., Raff M.C. Programmed cell death in animal development. // *Cell.* — 1997. — Vol. 88. — N 3. — P. 347-354.
123. Jennings R.B., Reimer K.A. Lethal myocardial ischemic injury. // *Am J Pathol.* — 1981. — Vol. 102. — N 2. — P. 241-255.
124. Jeon B.S., Kholodilov N.G., Oo T.F., Kim S.Y., Tomaselli K.J., Srinivasan A., Stefanis L., Burke R.E. Activation of caspase-3 in developmental models of programmed cell death in neurons of the substantia nigra. // *J Neurochem.* — 1999. — Vol. 73. — N 1. — P. 322-333.
125. Jiao S., Li Z. Nonapoptotic function of BAD and BAX in long-term depression of synaptic transmission. // *Neuron.* — 2011. — Vol. 70. — N 4. — P. 758-772.
126. Jobe A.H. Postnatal corticosteroids for preterm infants--do what we say, not what we do. // *N Engl J Med.* — 2004. — Vol. 350. — N 13. — P. 1349-1351.
127. Johnson E.M., Jr., Deckwerth T.L. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. // *Annu Rev Neurosci.* — 1993. — Vol. 16. — N. — P. 31-46.
128. Jurgensmeier J.M., Xie Z., Deveraux Q., Ellerby L., Bredesen D., Reed J.C. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1998. — Vol. 95. — N 9. — P. 4997-5002.
129. Kaczmarek A., Vandenabeele P., Krysko D.V. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. // *Immunity.* — 2013. — Vol. 38. — N 2. — P. 209-223.

130. Kanagawa T., Tomimatsu T., Hayashi S., Shioji M., Fukuda H., Shimoya K., Murata Y. The effects of repeated corticosteroid administration on the neurogenesis in the neonatal rat. // *Am J Obstet Gynecol.* — 2006. — Vol. 194. — N 1. — P. 231-238.
131. Kellendonk C., Tronche F., Reichardt H.M., Schutz G. Mutagenesis of the glucocorticoid receptor in mice. // *J Steroid Biochem Mol Biol.* — 1999. — Vol. 69. — N 1-6. — P. 253-259.
132. Kellendonk C., Gass P., Kretz O., Schutz G., Tronche F. Corticosteroid receptors in the brain: gene targeting studies. // *Brain Res Bull.* — 2002. — Vol. 57. — N 1. — P. 73-83.
133. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. // *Br J Cancer.* — 1972. — Vol. 26. — N 4. — P. 239-257.
134. Kfir-Erenfeld S., Sionov R.V., Spokoini R., Cohen O., Yefenof E. Protein kinase networks regulating glucocorticoid-induced apoptosis of hematopoietic cancer cells: fundamental aspects and practical considerations. // *Leuk Lymphoma.* — 2010. — Vol. 51. — N 11. — P. 1968-2005.
135. King L.B., Vacchio M.S., Dixon K., Hunziker R., Margulies D.H., Ashwell J.D. A targeted glucocorticoid receptor antisense transgene increases thymocyte apoptosis and alters thymocyte development. // *Immunity.* — 1995. — Vol. 3. — N 5. — P. 647-656.
136. Kodama T., Shimizu N., Yoshikawa N., Makino Y., Ouchida R., Okamoto K., Hisada T., Nakamura H., Morimoto C., Tanaka H. Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression. // *J Biol Chem.* — 2003. — Vol. 278. — N 35. — P. 33384-33391.
137. Kohr G., Melcher T., Seeburg P.H. Candidate editases for GluR channels in single neurons of rat hippocampus and cerebellum. // *Neuropharmacology.* — 1998. — Vol. 37. — N 10-11. — P. 1411-1417.

138. Kornhauser J.M., Nelson D.E., Mayo K.E., Takahashi J.S. Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. // *Neuron*. — 1990. — Vol. 5. — N 2. — P. 127-134.
139. Kroemer G., Marino G., Levine B. Autophagy and the integrated stress response. // *Mol Cell*. — 2010. — Vol. 40. — N 2. — P. 280-293.
140. Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Chipuk J.E., Bonzon C., Sullivan B.A., Green D.R., Newmeyer D.D. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. // *Mol Cell*. — 2005. — Vol. 17. — N 4. — P. 525-535.
141. Lan N.C., Graham B., Bartter F.C., Baxter J.D. Binding of steroids to mineralocorticoid receptors: implications for in vivo occupancy by glucocorticoids. // *J Clin Endocrinol Metab*. — 1982. — Vol. 54. — N 2. — P. 332-342.
142. Lawen A. Apoptosis-an introduction. // *Bioessays*. — 2003. — Vol. 25. — N 9. — P. 888-896.
143. Li Z., Jo J., Jia J.M., Lo S.C., Whitcomb D.J., Jiao S., Cho K., Sheng M. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. // *Cell*. — 2010. — Vol. 141. — N 5. — P. 859-871.
144. Liot G., Bossy B., Lubitz S., Kushnareva Y., Sejbuk N., Bossy-Wetzel E. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. // *Cell Death Differ*. — 2009. — Vol. 16. — N 6. — P. 899-909.
145. Liu W., Wang G., Yakovlev A.G. Identification and functional analysis of the rat caspase-3 gene promoter. // *J Biol Chem*. — 2002. — Vol. 277. — N 10. — P. 8273-8278.
146. Liu Y., Shoji-Kawata S., Sumpter R.M., Jr., Wei Y., Ginet V., Zhang L., Posner B., Tran K.A., Green D.R., Xavier R.J., Shaw S.Y., Clarke P.G., Puyal J., Levine B. Autosis is a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 2013. — Vol. 110. — N 51. — P. 20364-20371.



147. Lockshin R.A., Williams C.M. Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkmoth. // *J Insect Physiol.* — 1965. — Vol. 11. — N. — P. 123-133.
148. Lockshin R.A., Beaulaton J. Cell death: questions for histochemists concerning the causes of the various cytological changes. // *Histochem J.* — 1981. — Vol. 13. — N 4. — P. 659-666.
149. Ma K., Vattem K.M., Wek R.C. Dimerization and release of molecular chaperone inhibit activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. // *J Biol Chem.* — 2002. — Vol. 277. — N 21. — P. 18728-18735.
150. Manning S.M., Boll G., Fitzgerald E., Selip D.B., Volpe J.J., Jensen F.E. The clinically available NMDA receptor antagonist, memantine, exhibits relative safety in the developing rat brain. // *Int J Dev Neurosci.* — 2011. — Vol. 29. — N 7. — P. 767-773.
151. Manolagas S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. // *Endocr Rev.* — 2000. — Vol. 21. — N 2. — P. 115-137.
152. Martin L.J., Al-Abdulla N.A., Brambrink A.M., Kirsch J.R., Sieber F.E., Portera-Cailliau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. // *Brain Res Bull.* — 1998. — Vol. 46. — N 4. — P. 281-309.
153. Martinez A., Knappskog P.M., Haavik J. A structural approach into human tryptophan hydroxylase and its implications for the regulation of serotonin biosynthesis. // *Curr Med Chem.* — 2001. — Vol. 8. — N 9. — P. 1077-1091.
154. Matsuura A., Tsukada M., Wada Y., Ohsumi Y. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Gene.* — 1997. — Vol. 192. — N 2. — P. 245-250.
155. Matthews S.G. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. // *Pediatr Res.* — 2000. — Vol. 47. — N 3. — P. 291-300.

156. Mazarakis N.D., Edwards A.D., Mehmet H. Apoptosis in neural development and disease. // Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. — 1997. — Vol. 77. — N 3. — P. F165-170.
157. McCullers D.L., Sullivan P.G., Scheff S.W., Herman J.P. Mifepristone protects CA1 hippocampal neurons following traumatic brain injury in rat. // Neuroscience. — 2002. — Vol. 109. — N 2. — P. 219-230.
158. McKay L.I., Cidlowski J.A. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. // Endocr Rev. — 1999. — Vol. 20. — N 4. — P. 435-459.
159. Mei Y., Thompson M.D., Cohen R.A., Tong X. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases. // Biochim Biophys Acta. — 2014. — Vol. — N. — P.
160. Meier P., Finch A., Evan G. Apoptosis in development. // Nature. — 2000. — Vol. 407. — N 6805. — P. 796-801.
161. Menshanov P.N., Bannova A.V., Dygalo N.N. Dexamethasone suppresses the locomotor response of neonatal rats to novel environment. // Behav Brain Res. — 2014. — Vol. 271. — N. — P. 43-50.
162. Menshanov P.N., Bannova A.V., Bulygina V.V., Dygalo N.N. Acute antiapoptotic effects of hydrocortisone in the hippocampus of neonatal rats. // Physiol Res. — 2013. — Vol. 62. — N 2. — P. 205-213.
163. Merry D.E., Korsmeyer S.J. Bcl-2 gene family in the nervous system. // Annu Rev Neurosci. — 1997. — Vol. 20. — N. — P. 245-267.
164. Miller T.M., Moulder K.L., Knudson C.M., Creedon D.J., Deshmukh M., Korsmeyer S.J., Johnson E.M., Jr. Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death. // J Cell Biol. — 1997. — Vol. 139. — N 1. — P. 205-217.
165. Milligan C.E., Schwartz L.M. Programmed cell death during animal development. // Br Med Bull. — 1997. — Vol. 53. — N 3. — P. 570-590.

166. Mishra O.P., Delivoria-Papadopoulos M. Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. // *Brain Res Bull.* — 1999. — Vol. 48. — N 3. — P. 233-238.
167. Mishra O.P., Fritz K.I., Delivoria-Papadopoulos M. NMDA receptor and neonatal hypoxic brain injury. // *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* — 2001. — Vol. 7. — N 4. — P. 249-253.
168. Montkowski A., Barden N., Wotjak C., Stec I., Ganster J., Meaney M., Engelmann M., Reul J.M., Landgraf R., Holsboer F. Long-term antidepressant treatment reduces behavioural deficits in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. // *J Neuroendocrinol.* — 1995. — Vol. 7. — N 11. — P. 841-845.
169. Morris R.G., Hargreaves A.D., Duvall E., Wyllie A.H. Hormone-induced cell death. 2. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. // *Am J Pathol.* — 1984. — Vol. 115. — N 3. — P. 426-436.
170. Muller M.B., Uhr M., Holsboer F., Keck M.E. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical system and mood disorders: highlights from mutant mice. // *Neuroendocrinology.* — 2004. — Vol. 79. — N 1. — P. 1-12.
171. Murphy B.P., Inder T.E., Huppi P.S., Warfield S., Zientara G.P., Kikinis R., Jolesz F.A., Volpe J.J. Impaired cerebral cortical gray matter growth after treatment with dexamethasone for neonatal chronic lung disease. // *Pediatrics.* — 2001. — Vol. 107. — N 2. — P. 217-221.
172. Nagano M., Ozawa H., Suzuki H. Prenatal dexamethasone exposure affects anxiety-like behaviour and neuroendocrine systems in an age-dependent manner. // *Neurosci Res.* — 2008. — Vol. 60. — N 4. — P. 364-371.
173. Nagano M., Liu M., Inagaki H., Kawada T., Suzuki H. Early intervention with fluoxetine reverses abnormalities in the serotonergic system and behavior of rats exposed prenatally to dexamethasone. // *Neuropharmacology.* — 2012. — Vol. 63. — N 2. — P. 292-300.

174. Namba R., Pazdera T.M., Cerrone R.L., Minden J.S. *Drosophila* embryonic pattern repair: how embryos respond to bicoid dosage alteration. // *Development*. — 1997. — Vol. 124. — N 7. — P. 1393-1403.
175. Nechushtan A., Smith C.L., Hsu Y.T., Youle R.J. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. // *Embo J*. — 1999. — Vol. 18. — N 9. — P. 2330-2341.
176. Newton K., Dugger D.L., Wickliffe K.E., Kapoor N., de Almagro M.C., Vucic D., Komuves L., Ferrando R.E., French D.M., Webster J., Roose-Girma M., Warming S., Dixit V.M. Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. // *Science*. — 2014. — Vol. 343. — N 6177. — P. 1357-1360.
177. Ni Chonghaile T., Concannon C.G., Szegezdi E., Gorman A.M., Samali A. Dexamethasone inhibits apoptosis in C6 glioma cells through increased expression of Bcl-XL. // *Apoptosis*. — 2006. — Vol. 11. — N 7. — P. 1247-1255.
178. Nicholls D.G., Ward M.W. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. // *Trends Neurosci*. — 2000. — Vol. 23. — N 4. — P. 166-174.
179. Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C.K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P.R., Labelle M., Lazebnik Y.A., et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. // *Nature*. — 1995. — Vol. 376. — N 6535. — P. 37-43.
180. Nicoll D.A., Quednau B.D., Qui Z., Xia Y.R., Lusic A.J., Philipson K.D. Cloning of a third mammalian Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCX3. // *J Biol Chem*. — 1996. — Vol. 271. — N 40. — P. 24914-24921.
181. Noguchi K.K., Walls K.C., Wozniak D.F., Olney J.W., Roth K.A., Farber N.B. Acute neonatal glucocorticoid exposure produces selective and rapid cerebellar neural progenitor cell apoptotic death. // *Cell Death Differ*. — 2008. — Vol. 15. — N 10. — P. 1582-1592.

182. Northington F.J., Chavez-Valdez R., Martin L.J. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. // *Ann Neurol.* — 2011. — Vol. 69. — N 5. — P. 743-758.
183. O'Mara S. The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. // *J Anat.* — 2005. — Vol. 207. — N 3. — P. 271-282.
184. O'Mara S.M., Commins S., Anderson M., Gigg J. The subiculum: a review of form, physiology and function. // *Prog Neurobiol.* — 2001. — Vol. 64. — N 2. — P. 129-155.
185. Oberstein A., Jeffrey P.D., Shi Y. Crystal structure of the Bcl-XL-Bcl-2 peptide complex: Bcl-2 is a novel BH3-only protein. // *J Biol Chem.* — 2007. — Vol. 282. — N 17. — P. 13123-13132.
186. Olney J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. // *Science.* — 1969. — Vol. 164. — N 3880. — P. 719-721.
187. Oppenheim R.W. Cell death during development of the nervous system. // *Annu Rev Neurosci.* — 1991. — Vol. 14. — N. — P. 453-501.
188. Oyadomari S., Araki E., Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. // *Apoptosis.* — 2002. — Vol. 7. — N 4. — P. 335-345.
189. Pan T., Kondo S., Le W., Jankovic J. The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. // *Brain.* — 2008. — Vol. 131. — N Pt 8. — P. 1969-1978.
190. Patel K.R., Andreadi C., Britton R.G., Horner-Glister E., Karmokar A., Sale S., Brown V.A., Brenner D.E., Singh R., Steward W.P., Gescher A.J., Brown K. Sulfate metabolites provide an intracellular pool for resveratrol generation and induce autophagy with senescence. // *Sci Transl Med.* — 2013. — Vol. 5. — N 205. — P. 205ra133.

191. Peng T.I., Greenamyre J.T. Privileged access to mitochondria of calcium influx through N-methyl-D-aspartate receptors. // *Mol Pharmacol.* — 1998. — Vol. 53. — N 6. — P. 974-980.
192. Perlmann T., Wallen-Mackenzie A. Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells. // *Cell Tissue Res.* — 2004. — Vol. 318. — N 1. — P. 45-52.
193. Pettmann B., Henderson C.E. Neuronal cell death. // *Neuron.* — 1998. — Vol. 20. — N 4. — P. 633-647.
194. Philipson K.D., Nicoll D.A. Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. // *Annu Rev Physiol.* — 2000. — Vol. 62. — N. — P. 111-133.
195. Pin J.P., Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. // *Neuropharmacology.* — 1995. — Vol. 34. — N 1. — P. 1-26.
196. Pohl D., Bittigau P., Ishimaru M.J., Stadthaus D., Hubner C., Olney J.W., Turski L., Ikonomidou C. N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1999. — Vol. 96. — N 5. — P. 2508-2513.
197. Polman J.A., de Kloet E.R., Datson N.A. Two populations of glucocorticoid receptor-binding sites in the male rat hippocampal genome. // *Endocrinology.* — 2013. — Vol. 154. — N 5. — P. 1832-1844.
198. Putchá G.V., Harris C.A., Moulder K.L., Easton R.M., Thompson C.B., Johnson E.M., Jr. Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice. // *J Cell Biol.* — 2002. — Vol. 157. — N 3. — P. 441-453.
199. Reed J.C. Mechanisms of apoptosis. // *Am J Pathol.* — 2000. — Vol. 157. — N 5. — P. 1415-1430.
200. Reichardt H.M., Umland T., Bauer A., Kretz O., Schutz G. Mice with an increased glucocorticoid receptor gene dosage show enhanced resistance to stress and endotoxic shock. // *Mol Cell Biol.* — 2000. — Vol. 20. — N 23. — P. 9009-9017.

201. Reichardt H.M., Kaestner K.H., Tuckermann J., Kretz O., Wessely O., Bock R., Gass P., Schmid W., Herrlich P., Angel P., Schutz G. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. // *Cell*. — 1998. — Vol. 93. — N 4. — P. 531-541.
202. Riedl S.J., Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. — 2004. — Vol. 5. — N 11. — P. 897-907.
203. Roberts D., Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. // *Cochrane Database Syst Rev*. — 2006. — Vol. — N 3. — P. CD004454.
204. Rohn T.T., Cusack S.M., Kessinger S.R., Oxford J.T. Caspase activation independent of cell death is required for proper cell dispersal and correct morphology in PC12 cells. // *Exp Cell Res*. — 2004. — Vol. 295. — N 1. — P. 215-225.
205. Rojas P., Joodmardi E., Perlmann T., Ogren S.O. Rapid increase of Nurr1 mRNA expression in limbic and cortical brain structures related to coping with depression-like behavior in mice. // *J Neurosci Res*. — 2010. — Vol. 88. — N 10. — P. 2284-2293.
206. Rothman S.M., Olney J.W. Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years. // *Trends Neurosci*. — 1995. — Vol. 18. — N 2. — P. 57-58.
207. Roy M., Sapolsky R.M. The exacerbation of hippocampal excitotoxicity by glucocorticoids is not mediated by apoptosis. // *Neuroendocrinology*. — 2003. — Vol. 77. — N 1. — P. 24-31.
208. Rupprecht R., Reul J.M., van Steensel B., Spengler D., Soder M., Berning B., Holsboer F., Damm K. Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. // *Eur J Pharmacol*. — 1993. — Vol. 247. — N 2. — P. 145-154.
209. Saile B., Knittel T., Matthes N., Schott P., Ramadori G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating

- uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. // *Am J Pathol.* — 1997. — Vol. 151. — N 5. — P. 1265-1272.
210. Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. // *Endocr Rev.* — 2000. — Vol. 21. — N 1. — P. 55-89.
211. Sastry P.S., Rao K.S. Apoptosis and the nervous system. // *J Neurochem.* — 2000. — Vol. 74. — N 1. — P. 1-20.
212. Saxen L., Sariola H. Early organogenesis of the kidney. // *Pediatr Nephrol.* — 1987. — Vol. 1. — N 3. — P. 385-392.
213. Schanne F.A., Kane A.B., Young E.E., Farber J.L. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. // *Science.* — 1979. — Vol. 206. — N 4419. — P. 700-702.
214. Schofield C.J., Ratcliffe P.J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* — 2004. — Vol. 5. — N 5. — P. 343-354.
215. Schwartzman R.A., Cidlowski J.A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. // *Endocr Rev.* — 1993. — Vol. 14. — N 2. — P. 133-151.
216. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. // *Mol Cell.* — 2002. — Vol. 9. — N 3. — P. 459-470.
217. Shimazawa M., Inokuchi Y., Ito Y., Murata H., Aihara M., Miura M., Araie M., Hara H. Involvement of ER stress in retinal cell death. // *Mol Vis.* — 2007. — Vol. 13. — N. — P. 578-587.
218. Silva-Gomez A.B., Aguilar-Salgado Y., Reyes-Hernandez D.O., Flores G. Dexamethasone induces different morphological changes in the dorsal and ventral hippocampus of rats. // *J Chem Neuroanat.* — 2013. — Vol. 47. — N. — P. 71-78.
219. Sloviter R.S., Sollas A.L., Neubort S. Hippocampal dentate granule cell degeneration after adrenalectomy in the rat is not reversed by dexamethasone. // *Brain Res.* — 1995. — Vol. 682. — N 1-2. — P. 227-230.



220. Smith M.W., Collan Y., Kahng M.W., Trump B.F. Changes in mitochondrial lipids of rat kidney during ischemia. // *Biochim Biophys Acta*. — 1980. — Vol. 618. — N 2. — P. 192-201.
221. Son G.H., Geum D., Chung S., Park E., Lee K.H., Choi S., Kim K. A protective role of 27-kDa heat shock protein in glucocorticoid-evoked apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. // *Biochem Biophys Res Commun*. — 2005. — Vol. 338. — N 4. — P. 1751-1758.
222. Stacey N.H., Bishop C.J., Halliday J.W., Halliday W.J., Cooksley W.G., Powell L.W., Kerr J.F. Apoptosis as the mode of cell death in antibody-dependent lymphocytotoxicity. // *J Cell Sci*. — 1985. — Vol. 74. — N. — P. 169-179.
223. Sun W., Gould T.W., Vinsant S., Prevette D., Oppenheim R.W. Neuromuscular development after the prevention of naturally occurring neuronal death by Bax deletion. // *J Neurosci*. — 2003. — Vol. 23. — N 19. — P. 7298-7310.
224. Sundberg M., Savola S., Hienola A., Korhonen L., Lindholm D. Glucocorticoid hormones decrease proliferation of embryonic neural stem cells through ubiquitin-mediated degradation of cyclin D1. // *J Neurosci*. — 2006. — Vol. 26. — N 20. — P. 5402-5410.
225. Surjit M., Ganti K.P., Mukherji A., Ye T., Hua G., Metzger D., Li M., Chambon P. Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. // *Cell*. — 2011. — Vol. 145. — N 2. — P. 224-241.
226. Sylvia C.J. The role of neutrophil apoptosis in influencing tissue repair. // *J Wound Care*. — 2003. — Vol. 12. — N 1. — P. 13-16.
227. Takahashi K., Saitoh A., Yamada M., Iwai T., Inagaki M. Dexamethasone indirectly induces Ndr2 expression in rat astrocytes. // *J Neurosci Res*. — 2012. — Vol. 90. — N 1. — P. 160-166.
228. Takeda A., Suzuki M., Tamano H., Takada S., Ide K., Oku N. Involvement of glucocorticoid-mediated Zn<sup>2+</sup> signaling in attenuation of hippocampal CA1 LTP by acute stress. // *Neurochem Int*. — 2012. — Vol. 60. — N 4. — P. 394-399.

229. Thornberry N.A. Caspases: a decade of death research. // *Cell Death Differ.* — 1999. — Vol. 6. — N 11. — P. 1023-1027.
230. Tominaga K., Nakanishi H., Yasuda Y., Yamamoto K. Excitotoxin-induced neuronal death is associated with response of a unique intracellular aspartic proteinase, cathepsin E. // *J Neurochem.* — 1998. — Vol. 71. — N 6. — P. 2574-2584.
231. Tronche F., Kellendonk C., Kretz O., Gass P., Anlag K., Orban P.C., Bock R., Klein R., Schutz G. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. // *Nat Genet.* — 1999. — Vol. 23. — N 1. — P. 99-103.
232. Trump B.F., Bulger R.E. Studies of cellular injury in isolated flounder tubules. I. Correlation between morphology and function of control tubules and observations of autophagocytosis and mechanical cell damage. // *Lab Invest.* — 1967. — Vol. 16. — N 3. — P. 453-482.
233. Trump B.F., Berezsky I.K., Laiho K.U., Osornio A.R., Mergner W.J., Smith M.W. The role of calcium in cell injury. A review. // *Scan Electron Microsc.* — 1980. — Vol. — N Pt 2. — P. 437-462, 492.
234. Trump B.F., Berezsky I.K., Sato T., Laiho K.U., Phelps P.C., DeClaris N. Cell calcium, cell injury and cell death. // *Environ Health Perspect.* — 1984. — Vol. 57. — N. — P. 281-287.
235. Tsiarli M.A., Paula Monaghan A., Defranco D.B. Differential subcellular localization of the glucocorticoid receptor in distinct neural stem and progenitor populations of the mouse telencephalon in vivo. // *Brain Res.* — 2013. — Vol. 1523. — N. — P. 10-27.
236. Tsujimoto Y., Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. // *Cell Death Differ.* — 2005. — Vol. 12 Suppl 2. — N. — P. 1528-1534.
237. Tuor U.I. Glucocorticoids and the prevention of hypoxic-ischemic brain damage. // *Neurosci Biobehav Rev.* — 1997. — Vol. 21. — N 2. — P. 175-179.

238. Tuor U.I., Del Bigio M.R. Protection against hypoxic-ischemic damage with corticosterone and dexamethasone: inhibition of effect by a glucocorticoid antagonist RU38486. // *Brain Res.* — 1996. — Vol. 743. — N 1-2. — P. 258-262.
239. Tuor U.I., Chumas P.D., Del Bigio M.R. Prevention of hypoxic-ischemic damage with dexamethasone is dependent on age and not influenced by fasting. // *Exp Neurol.* — 1995. — Vol. 132. — N 1. — P. 116-122.
240. Tuor U.I., Simone C.S., Barks J.D., Post M. Dexamethasone prevents cerebral infarction without affecting cerebral blood flow in neonatal rats. // *Stroke.* — 1993a. — Vol. 24. — N 3. — P. 452-457.
241. Tuor U.I., Yager J.Y., Bascaramurty S., Del Bigio M.R. Dexamethasone prevents hypoxia/ischemia-induced reductions in cerebral glucose utilization and high-energy phosphate metabolites in immature brain. // *J Neurochem.* — 1997. — Vol. 69. — N 5. — P. 1954-1963.
242. Tuor U.I., Simone C.S., Arellano R., Tanswell K., Post M. Glucocorticoid prevention of neonatal hypoxic-ischemic damage: role of hyperglycemia and antioxidant enzymes. // *Brain Res.* — 1993b. — Vol. 604. — N 1-2. — P. 165-172.
243. Turk B., Stoka V., Rozman-Pungercar J., Cirman T., Droga-Mazovec G., Oresic K., Turk V. Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases. // *Biol Chem.* — 2002. — Vol. 383. — N 7-8. — P. 1035-1044.
244. Twomey C., McCarthy J.V. Pathways of apoptosis and importance in development. // *J Cell Mol Med.* — 2005. — Vol. 9. — N 2. — P. 345-359.
245. Van Damme P., Callewaert G., Eggermont J., Robberecht W., Van Den Bosch L. Chloride influx aggravates Ca<sup>2+</sup>-dependent AMPA receptor-mediated motoneuron death. // *J Neurosci.* — 2003. — Vol. 23. — N 12. — P. 4942-4950.
246. van Eekelen J.A., Bohn M.C., de Kloet E.R. Postnatal ontogeny of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor gene expression in regions of the rat tel- and diencephalon. // *Brain Res Dev Brain Res.* — 1991. — Vol. 61. — N 1. — P. 33-43.

247. Vanden Berghe T., Linkermann A., Jouan-Lanhouet S., Walczak H., Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* — 2014. — Vol. 15. — N 2. — P. 135-147.
248. Vekrellis K., McCarthy M.J., Watson A., Whitfield J., Rubin L.L., Ham J. Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. // *Development.* — 1997. — Vol. 124. — N 6. — P. 1239-1249.
249. Viegas L.R., Vicent G.P., Baranao J.L., Beato M., Pecci A. Steroid hormones induce bcl-X gene expression through direct activation of distal promoter P4. // *J Biol Chem.* — 2004. — Vol. 279. — N 11. — P. 9831-9839.
250. von Moltke J., Ayres J.S., Kofoed E.M., Chavarria-Smith J., Vance R.E. Recognition of bacteria by inflammasomes. // *Annu Rev Immunol.* — 2013. — Vol. 31. — N. — P. 73-106.
251. Wang J., Lenardo M.J. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. // *J Cell Sci.* — 2000. — Vol. 113 ( Pt 5). — N. — P. 753-757.
252. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. // *Genes Dev.* — 2001. — Vol. 15. — N 22. — P. 2922-2933.
253. Wang Y., Qin Z.H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. // *Apoptosis.* — 2010. — Vol. 15. — N 11. — P. 1382-1402.
254. Wang Y., Qin Z.H., Nakai M., Chase T.N. Glutamate metabotropic receptor agonist 1S,3R-ACPD induces internucleosomal DNA fragmentation and cell death in rat striatum. // *Brain Res.* — 1997. — Vol. 772. — N 1-2. — P. 45-56.
255. Wang Y., Gu Z.L., Cao Y., Liang Z.Q., Han R., Bennett M.C., Qin Z.H. Lysosomal enzyme cathepsin B is involved in kainic acid-induced excitotoxicity in rat striatum. // *Brain Res.* — 2006. — Vol. 1071. — N 1. — P. 245-249.
256. Wang Y., Han R., Liang Z.Q., Wu J.C., Zhang X.D., Gu Z.L., Qin Z.H. An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons

- induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid. // *Autophagy*. — 2008. — Vol. 4. — N 2. — P. 214-226.
257. Wang Y., Dong X.X., Cao Y., Liang Z.Q., Han R., Wu J.C., Gu Z.L., Qin Z.H. p53 induction contributes to excitotoxic neuronal death in rat striatum through apoptotic and autophagic mechanisms. // *Eur J Neurosci*. — 2009. — Vol. 30. — N 12. — P. 2258-2270.
258. Welberg L.A., Seckl J.R. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. // *J Neuroendocrinol*. — 2001. — Vol. 13. — N 2. — P. 113-128.
259. Wenger R.H. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. // *J Exp Biol*. — 2000. — Vol. 203. — N Pt 8. — P. 1253-1263.
260. Westphal D., Sytnyk V., Schachner M., Leshchyns'ka I. Clustering of the neural cell adhesion molecule (NCAM) at the neuronal cell surface induces caspase-8- and -3-dependent changes of the spectrin meshwork required for NCAM-mediated neurite outgrowth. // *J Biol Chem*. — 2010. — Vol. 285. — N 53. — P. 42046-42057.
261. Whitelaw A., Thoresen M. Antenatal steroids and the developing brain. // *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. — 2000. — Vol. 83. — N 2. — P. F154-157.
262. Whiteside G., Munglani R. TUNEL, Hoechst and immunohistochemistry triple-labelling: an improved method for detection of apoptosis in tissue sections--an update. // *Brain Res Brain Res Protoc*. — 1998. — Vol. 3. — N 1. — P. 52-53.
263. Willis S., Day C.L., Hinds M.G., Huang D.C. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. // *J Cell Sci*. — 2003. — Vol. 116. — N Pt 20. — P. 4053-4056.
264. Wu I., Shin S.C., Cao Y., Bender I.K., Jafari N., Feng G., Lin S., Cidlowski J.A., Schleimer R.P., Lu N.Z. Selective glucocorticoid receptor translational isoforms reveal glucocorticoid-induced apoptotic transcriptomes. // *Cell Death Dis*. — 2013. — Vol. 4. — N. — P. e453.
265. Wyllie A. Apoptosis. An endonuclease at last. // *Nature*. — 1998. — Vol. 391. — N 6662. — P. 20-21.

266. Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R. Cell death: the significance of apoptosis. // *Int Rev Cytol.* — 1980. — Vol. 68. — N. — P. 251-306.
267. Xiong Z.G., Zhu X.M., Chu X.P., Minami M., Hey J., Wei W.L., MacDonald J.F., Wemmie J.A., Price M.P., Welsh M.J., Simon R.P. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. // *Cell.* — 2004. — Vol. 118. — N 6. — P. 687-698.
268. Yakovlev A.G., Ota K., Wang G., Movsesyan V., Bao W.L., Yoshihara K., Faden A.I. Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury. // *J Neurosci.* — 2001. — Vol. 21. — N 19. — P. 7439-7446.
269. Yang Z., Levison S.W. Hypoxia/ischemia expands the regenerative capacity of progenitors in the perinatal subventricular zone. // *Neuroscience.* — 2006. — Vol. 139. — N 2. — P. 555-564.
270. Yu S., Patchev A.V., Wu Y., Lu J., Holsboer F., Zhang J.Z., Sousa N., Almeida O.F. Depletion of the neural precursor cell pool by glucocorticoids. // *Ann Neurol.* — 2010. — Vol. 67. — N 1. — P. 21-30.
271. Yuan G., Zhang L., Yang G., Yang J., Wan C., Song G., Chen S., Chen Z. The distribution and ultrastructure of the forming blood capillaries and the effect of apoptosis on vascularization in mouse embryonic molar mesenchyme. // *Cell Tissue Res.* — 2014. — Vol. 356. — N 1. — P. 137-145.
272. Yuan J., Yankner B.A. Apoptosis in the nervous system. // *Nature.* — 2000. — Vol. 407. — N 6805. — P. 802-809.
273. Yudit M.R., Cidlowski J.A. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. // *Mol Endocrinol.* — 2002. — Vol. 16. — N 8. — P. 1719-1726.
274. Zagorska A., Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. // *Acta Biochim Pol.* — 2004. — Vol. 51. — N 3. — P. 563-585.
275. Zetterstrom R.H., Williams R., Perlmann T., Olson L. Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene

- regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. // *Brain Res Mol Brain Res.* — 1996. — Vol. 41. — N 1-2. — P. 111-120.
276. Zhang L.X., Levine S., Dent G., Zhan Y., Xing G., Okimoto D., Kathleen Gordon M., Post R.M., Smith M.A. Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. // *Brain Res Dev Brain Res.* — 2002. — Vol. 133. — N 1. — P. 1-11.
277. Zhang X.D., Wang Y., Zhang X., Han R., Wu J.C., Liang Z.Q., Gu Z.L., Han F., Fukunaga K., Qin Z.H. p53 mediates mitochondria dysfunction-triggered autophagy activation and cell death in rat striatum. // *Autophagy.* — 2009. — Vol. 5. — N 3. — P. 339-350.
278. Zinchuk V., Grossenbacher-Zinchuk O. Quantitative colocalization analysis of confocal fluorescence microscopy images. // *Curr Protoc Cell Biol.* — 2011. — Vol. Chapter 4. — N. — P. Unit4 19.
279. Zinchuk V., Grossenbacher-Zinchuk O. Quantitative colocalization analysis of fluorescence microscopy images. // *Curr Protoc Cell Biol.* — 2014. — Vol. 62. — N. — P. Unit 4 19 11-14.
280. Zuloaga D.G., Carbone D.L., Hiroi R., Chong D.L., Handa R.J. Dexamethasone induces apoptosis in the developing rat amygdala in an age-, region-, and sex-specific manner. // *Neuroscience.* — 2011. — Vol. 199. — N. — P. 535-547.
281. Zuloaga D.G., Carbone D.L., Quihuis A., Hiroi R., Chong D.L., Handa R.J. Perinatal dexamethasone-induced alterations in apoptosis within the hippocampus and paraventricular nucleus of the hypothalamus are influenced by age and sex. // *J Neurosci Res.* — 2012. — Vol. 90. — N 7. — P. 1403-1412.