

ВЕТРОВОЙ

Олег Васильевич

**РОЛЬ HIF1-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО
ПУТИ В ОБЕСПЕЧЕНИИ РЕАКЦИЙ МОЗГА НА ГИПОКСИЮ**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2018

Работа выполнена на кафедре биохимии Биологического факультета
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научный руководитель:

Ещенко Наталья Дмитриевна
доктор биологических наук, профессор
кафедры биохимии Биологического факультета
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет», г. Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

Кирова Юлия Игоревна
доктор биологических наук, ведущий научный
сотрудник лаборатории биоэнергетики
и проблем гипоксии ФГБНУ НИИ общей
патологии и патофизиологии РАН, г. Москва

Журавин Игорь Александрович
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией сравнительной
физиологии и патологии ЦНС, ФГБУН Институт
эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург

Ведущая организация: ФГБНУ «Томский национальный исследовательский
медицинский центр РАН», г. Томск.

Защита состоится 26 апреля 2018 г. в 16:00 часов на заседании Диссертационного
совета Д.212.232.10 по защите докторских и кандидатских диссертаций на базе
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» по адресу:
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9, ауд. 90.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. А.М. Горького
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» по адресу:
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д. 7/9, а также на сайте Санкт-
Петербургского государственного университета по адресу:
<https://disser.spbu.ru/files/disser2/disser/8t2dZr6WnD.pdf>

e-mail: n.alekseev@spbu.ru

тел.: +7 (812) 328-95-74

Автореферат разослан 28 февраля 2018 г.

Учёный секретарь
Диссертационного совета 212.232.10,
доктор биологических наук, профессор

Н.П. Алексеев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Нарушение кислородного снабжения мозга рассматривается в настоящее время как ключевой фактор в развитии множества неврологических заболеваний. Тяжелые формы гипоксического стресса, такие как ишемический инсульт, представляют собой одну из самых распространенных причин смерти и снижения качества жизни. Поэтому поиск путей повышения устойчивости мозга к гипоксии/ишемии представляет собой одну из важнейших задач современной биологии и медицины. Основные подходы для решения этой задачи включают не только разработку новых лекарственных средств, но и использование немедикаментозных методов мобилизации эндогенных защитных механизмов (Самойлов и др., 2012). Особого внимания среди таких немедикаментозных методов заслуживает посткондиционирование (ПостК) - предъявление экстремальных воздействий умеренной интенсивности особям, пережившим тяжелое повреждающее воздействие (Zhao et al., 2003), с целью мобилизации эндогенных адаптивных и регенеративных механизмов.

Настоящее исследование направлено на изучение механизмов нейропротективного действия гипоксического посткондиционирования, а также на расширение представлений о метаболических перестройках мозга, лежащих в основе патологических и адаптивных реакций на гипоксию и реоксигенацию. В фокусе нашего внимания была роль гипоксия-индуцируемого фактора-1 (HIF1) в регуляции пентозофосфатного пути (ПФП) метаболизма глюкозы – основного источника НАДФН в мозге. В связи с тем, что без НАДФН невозможно восстановление таких антиоксидантов как тиоредоксины и глутатион, ПФП представляет собой ключевой регулятор эффективности антиоксидантных систем мозга. Поскольку опосредованная гипоксией гибель нейронов осуществляется с участием активных форм кислорода (АФК), изучение вопроса о возможной взаимосвязи между гипоксией/реоксигенацией в различных режимах, ключевым регулятором клеточного ответа на гипоксию, HIF1, пентозофосфатным путем и опосредованными им функциями является крайне важным как для понимания эндогенных механизмов адаптации мозга, так и для разработки подходов к таргетной терапии постгипоксических состояний.

Степень разработанности темы исследования. Ранее в лаборатории регуляции функций нейронов мозга Института физиологии им. И.П.Павлова РАН был разработан неинвазивный способ коррекции последствий тяжелой повреждающей гипоксии мозга сеансами умеренной гипобарической гипоксии (УГГ) - воздействия на организм пониженным атмосферным давлением, приводящим к ослаблению кислородного снабжения (патент РФ №2437164). В моделях на крысах показано, что посткондиционирование (ПостК) трехкратной УГГ эффективно предотвращает индуцируемую тяжелой гипоксией гибель нейронов гиппокампа и неокортекса, способствует функциональной реабилитации после тяжелой гипобарической гипоксии (ТГ) или психоэмоциональных стрессов, нормализуя активность гипоталамо-гипофизарно-адреналокортикальной системы и поведение у крыс (Rybnikova et al., 2012). При этом, в отличие от ишемических моделей (Gao et al., 2008), нейропротекция наблюдается даже в тех случаях, когда

ПостК производится в отдаленный период после повреждающего воздействия (1-3 дня). Однако, помимо описательных данных, информации о конкретных механизмах реализации протективного действия ПостК УГГ на сегодняшний день недостаточно.

Роль ключевого регулятора адаптации к гипоксии отводится гипоксия-индуцируемому фактору-1 (HIF1), в связи с чем в мировой литературе активно обсуждается возможность фармакологической активации HIF1 с целью терапии, в частности, постинсультных состояний. Однако, патогенез относительно непродолжительных острых форм гипоксии/ишемии в первую очередь реализуется в период реоксигенации (Nita et al., 2001), когда неконтролируемая активация данного фактора транскрипции на фоне дефицита активности киназ, ответственных за обеспечение правильного паттерна пост-трансляционных модификаций HIF1 (Chen et al., 2003, Vetrovoy et al., 2015), потенциально способна оказывать дезадаптивный эффект, что может вносить неблагоприятный вклад в формирование постгипоксических патологий (Sun Y. et al., 2017). Поэтому вопрос о конкретной роли HIF1 в реализации эффектов тяжелых форм гипоксии также остается открытым.

Цель исследования. Изучить молекулярные механизмы, лежащие в основе нейропротективного действия гипоксического посткондиционирования при компенсации последствий тяжелой гипоксии мозга крыс, и оценить роль HIF1 в реализации эффектов тяжелой гипоксии.

Задачи. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние гипоксического посткондиционирования на развитие процессов клеточной гибели в гиппокампе и неокортексе крыс, переживших тяжелую гипоксию.
2. Провести сравнительный анализ содержания нейропротективных белков Bcl-2 и BDNF в гиппокампе и неокортексе крыс, переживших тяжелую гипоксию и тяжелую гипоксию в сочетании с гипоксическим посткондиционированием.
3. Сравнить эффекты тяжелой гипоксии и гипоксического посткондиционирования на активность пентозофосфатного пути и связанные с ним процессы регуляции окислительно-восстановительного статуса и свободнорадикального окисления в гиппокампе и неокортексе крыс.
4. Изучить роль HIF1 в реализации процессов клеточной гибели в гиппокампе крыс, переживших тяжелую гипоксию.
5. Определить влияние HIF1 на активность пентозофосфатного пути и связанные с ПФП процессы регуляции окислительно-восстановительного статуса и свободнорадикального окисления в гиппокампе крыс, переживших тяжелую гипоксию.
6. В модели трехкратной умеренной гипобарической гипоксии проанализировать взаимосвязь между активностью HIF1 и транскрипцией ключевого фермента пентозофосфатного пути, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы.

Научная новизна. В результате проведенных исследований с применением модели умеренной гипобарической гипоксии (УГГ) *in vivo* в гиппокампе крыс впервые выявлена обратная связь между активностью HIF1 и транскрипцией Г6ФДГ

– первого скорость-лимитирующего фермента ПФП. Впервые установлено, что тяжелая гипоксия (ТГ) и последующая реоксигенация, вызывающие краткосрочную гиперэкспрессию регуляторной альфа субъединицы HIF1 (HIF1 α) в CA1 поле гиппокампа, индуцируют снижение количества и активности Г6ФДГ, а также количества НАДФН, что сопровождается окислительным стрессом и запуском процессов апоптотической клеточной гибели. Приоритетными являются результаты, доказывающие, что воздействие на крыс, переживших ТГ, УГГ в режиме ПостК либо инъекция ингибитора HIF1 топотекана непосредственно перед ТГ предотвращают отсроченное уменьшение количества и активности Г6ФДГ, увеличивая уровень НАДФН. Это сопровождается нормализацией окислительно-восстановительного статуса и снижением свободнорадикального окисления, а также предотвращением апоптотических процессов в гиппокампе.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы расширяют современные представления о молекулярно-биологических процессах, приводящих к развитию постгипоксических патологий, и способствуют пониманию механизмов антиапоптотического и антиоксидантного действия гипоксического посткондиционирования. Практическая значимость работы заключается в том, что полученные нами результаты могут лечь в основу разработки нейропротективных стратегий при лечении инсультов и других патологий, вызванных кислородной недостаточностью.

Методология и методы исследования. Исследование молекулярных механизмов адаптивных и патологических реакций мозга на гипоксию и реоксигенацию проведено с использованием разработанной в лаборатории регуляции функций нейронов мозга Института физиологии им. И.П.Павлова РАН модели гипобарической гипоксии *in vivo* на взрослых самцах крыс линии Wistar весом 200-250г в трех режимах: тяжелая повреждающая гипоксия, тяжелая гипоксия в сочетании с посткондиционированием трехкратной умеренной гипобарической гипоксией, а также трехкратная умеренная гипобарическая гипоксия. Решение поставленных задач требовало применения ряда современных биохимических, молекулярно-биологических и гистохимических методов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Посткондиционирование умеренной гипобарической гипоксией оказывает выраженное нейропротективное действие, предотвращая развитие вызванных тяжелой гипоксией апоптотических процессов и способствуя увеличению содержания противоапоптотического белка Bcl-2 и нейротрофина BDNF в гиппокампе и неокортексе.
2. Нарушение функционирования пентозофосфатного пути метаболизма глюкозы вносит существенный вклад в развитие индуцируемого тяжелой гипоксией окислительного стресса. Посткондиционирование умеренной гипобарической гипоксией способствует нормализации активности пентозофосфатного пути, предотвращая развитие состояния окислительного стресса и снижая интенсивность процессов свободнорадикального окисления в гиппокампе.
3. Ингибирование HIF1 перед тяжелой гипоксией способствует предотвращению развития состояния окислительного стресса и процессов клеточной гибели, что

сопровождается увеличением эффективности пентозофосфатного пути в гиппокампе.

4. Транскрипционный фактор NIF1 выполняет функцию отрицательного регулятора экспрессии гена ключевого фермента пентозофосфатного пути, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы. Трехкратная умеренная гипобарическая гипоксия вызывает увеличение транскрипции мРНК глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы в гиппокампе.

Степень достоверности и апробации результатов. Результаты получены с помощью современных методов. Объем выборок и число независимых экспериментов позволили оценить значимость результатов после обработки с помощью адекватных методов статистического анализа. Результаты работы были представлены и обсуждены на 37 конференциях, в частности: ESN Conference on Molecular Mechanisms of Regulation in the Nervous System (Tartu, Estonia, 14-17.06.15), FENS Forum of Neuroscience (Copenhagen, Denmark, 2-6.07.2016), International Symposium on Metabolic and redox interactions between neurons and astrocytes in health and disease (Salamanca, Spain, 26-28.06.2017), ISN-ESN Meeting (Paris, France, 20-24.08.2017).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 67 работ, из них 10 статей в рецензируемых журналах, 7 из которых – статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, 57 тезисов конференций.

Личный вклад соискателя. Личный вклад диссертанта состоял в анализе литературы по проблеме исследования, разработке гипотезы, планировании экспериментов и их выполнении, статистической обработке полученных результатов, обсуждении результатов, подготовке публикаций по теме диссертации.

Структура диссертации. Диссертация построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение» «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», включающий 154 источников, из них 22 – отечественных. Диссертация изложена на 118 страницах. Результаты и обсуждение представлены на одной таблице и иллюстрированы 34 рисунками.

Финансовая поддержка. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 13-04-00532, 16-04-00987, 16-34-00027.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Работа была проведена на взрослых самцах крыс линии Wistar весом 200-250г из Биоколлекции Института Физиологии им. И.П. Павлова РАН. Все измерения проведены с использованием материалов минимум из двух независимых экспериментов. В каждой экспериментальной группе (контрольной или опытной) на каждой временной точке использовано не менее 6 животных. Для исследований выбраны гиппокамп и сенсомоторная кора, так как эти структуры мозга признаны наиболее чувствительными к гипоксии и последующей реоксигенации (Kumar et al., 2016).

Гипобарическая гипоксия. Для создания условий повреждающей гипоксии использована модель тяжелой гипобарической гипоксии (ТГ) - трехчасовой сеанс пребывания крыс при 180 мм.рт.ст. (5% O₂) (Rybnikova et al., 2006). Для оценки эффектов посткондиционирования (ПостК) животных подвергали ТГ в сочетании с сеансами умеренной гипобарической гипоксии (УГГ) (360 мм.рт.ст., 10% O₂) - 3 двухчасовых воздействия с интервалом 24 часа между сеансами и после завершения ТГ) (Rybnikova et al., 2012). Для проверки гипотезы о HIF1-зависимой регуляции экспрессии гена глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г6ФДГ) в гиппокампе использовали HIF1-позитивную модель трехкратной УГГ (Samoilov et al. 2015).

С целью оценки роли транскрипционного фактора HIF1 в изучаемых процессах использовали **ингибитор трансляции HIF1** - топотекан (Ban et al., 2011, Rapisarda et al., 2009). Топотекан растворяли в смеси ДМСО:0,09 % NaCl и вводили животным внутрибрюшинно (5мг/кг веса) за 10 минут до каждого гипоксического сеанса (группы тяжелая гипобарическая гипоксия + ингибитор (ТГ+HIF1i) либо трехкратная умеренная гипобарическая гипоксия + ингибитор (3УГГ+HIF1i)). В качестве инъекционного контроля использовали смесь ДМСО:0,09 % NaCl (группы ТГ, ТГ + посткондиционирование (ПостК) либо 3УГГ). Не подвергавшимся гипоксическим воздействиям крысам также вводили топотекан для ингибирования HIF1 (Контроль+HIF1i) либо смесь ДМСО:0,09 % NaCl (Контроль).

Для выявления интенсивности процессов апоптотической клеточной гибели **выделяли ДНК** из клеток гиппокампа и неокортекса и производили анализ наличия фрагментации **электрофоретическим методом**, а также использовали гистохимический **метод TUNEL** (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling - dUTP концевое мечение ДНК терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой) для подсчета апоптотических клеток.

Для оценки количества и локализации белков интереса (Vcl-2, BDNF, HIF1a, эритропоэтин, Г6ФДГ) в CA1 поле гиппокампа и втором слое сенсомоторной коры был применен непрямой **АВС иммуногистохимический метод**, а для проверки селективности используемых антител - метод **вестерн блотт**.

Измерения активности Г6ФДГ и количества продукта пентозофосфатного пути, НАДФН, в экстрактах гиппокампа и неокортекса проводили, используя коммерческие наборы для **энзиматического колориметрического анализа** в 96-луночных планшетах (Sigma Ald.).

Количество восстановленных тиоловых групп, свидетельствующее об общем окислительно-восстановительном статусе, определяли в цитозольной фракции гиппокампа и неокортекса при помощи реактива Элмана **колориметрическим методом**.

Количество общего глутатиона измеряли в цитозольной фракции гиппокампа и неокортекса **энзиматическим колориметрическим методом** с применением глутатион редуктазы дрожжей и реактива Элмана.

Для определения интенсивности процессов свободнорадикального окисления производили **выделение липофильной фракции** гиппокампа и неокортекса и измеряли количество продуктов перекисного окисления липидов (диеновых и

триеновых конъюгатов) спектрофотометрическим методом и оснований Шиффа флуориметрическим методом в 96-луночных планшетах.

Роль NIF1 в регуляции транскрипции гена Г6ФДГ оценивали с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние тяжелой гипоксии и тяжелой гипоксии в сочетании с посткондиционированием умеренной гипобарической гипоксией на процессы клеточной гибели в гиппокампе и неокортексе крыс. С целью изучения влияния тяжелой гипобарической гипоксии на процессы клеточной гибели в гиппокампе и неокортексе крыс, а также оценки нейропротективного потенциала гипоксического посткондиционирования использовали два метода: электрофоретический анализ фрагментации ДНК и гистохимический метод выявления апоптотических клеток.

Фрагментация ДНК в гиппокампе крыс выявлена уже через два дня после окончания сеанса ТГ (Рисунок 1, А). При этом по крайней мере в течение четырех дней после ТГ фрагментация ДНК остается на высоком уровне. Напротив, в гиппокампе животных, переживших ТГ в сочетании с сеансами гипоксического ПостК, фрагментация ДНК не выявлена, что указывает на наличие противоапоптотического эффекта ПостК (Рисунок 1, А) для этой структуры мозга.

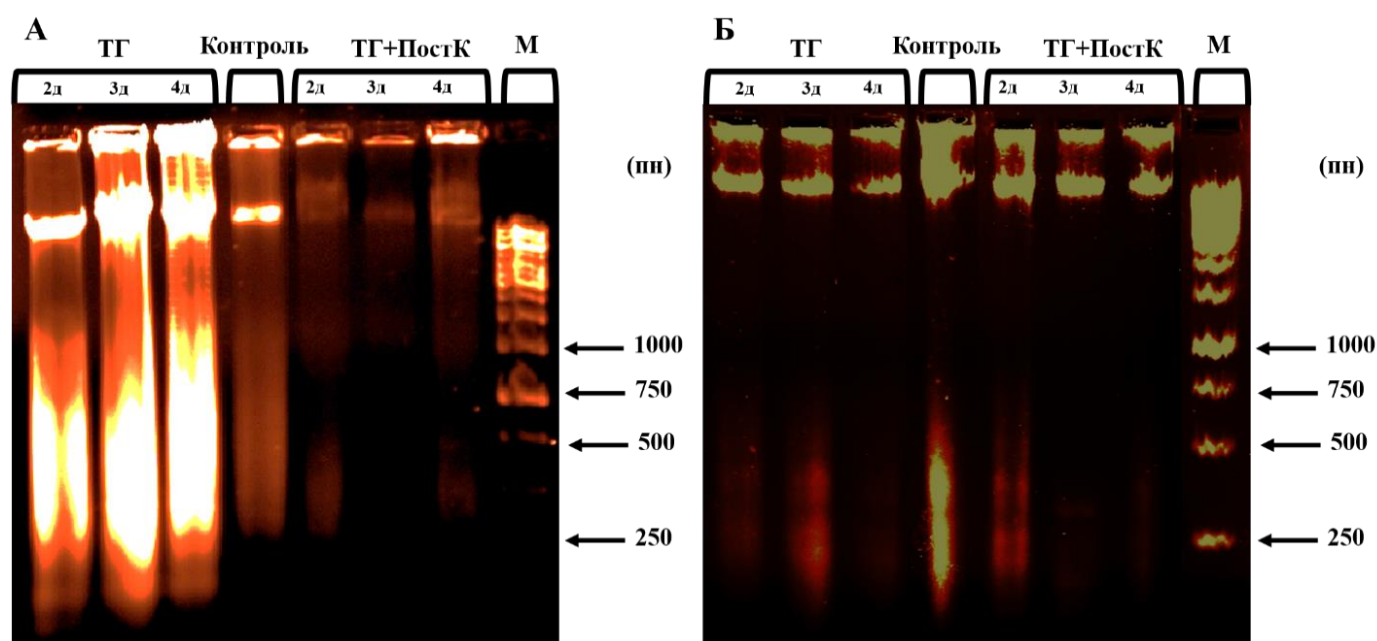


Рисунок 1. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с сеансами посткондиционирования (ТГ+ПостК) на фрагментацию ДНК в гиппокампе (А) и неокортексе (Б) крыс (электрофоретическое разделение в 2% агарозе; количество ДНК в каждой пробе: 5мкг).

В отличие от гиппокампа, в неокортексе как посткондиционированных крыс, так и животных, переживших ТГ без ПостК, не выявлено изменения фрагментации ДНК по сравнению с контролем (Рисунок 1, Б), что указывает на меньшую чувствительность неокортекса крыс к повреждающему действию ТГ по сравнению с гиппокампом, либо на повышенную регенеративную способность данной структуры мозга.

Гистохимическим методом анализа апоптотических процессов по соотношению TUNEL-позитивных клеток к общему количеству клеток не выявлено апоптотических процессов в течение первых трех дней после ТГ. Через 4 дня после реоксигенации в СА1 поле гиппокампа крыс наблюдаются ярко выраженные апоптотические процессы (Рисунок 2). Во втором слое сенсомоторной коры крыс этой группы апоптотические клетки также присутствуют, однако их существенно меньше, чем в гиппокампе.

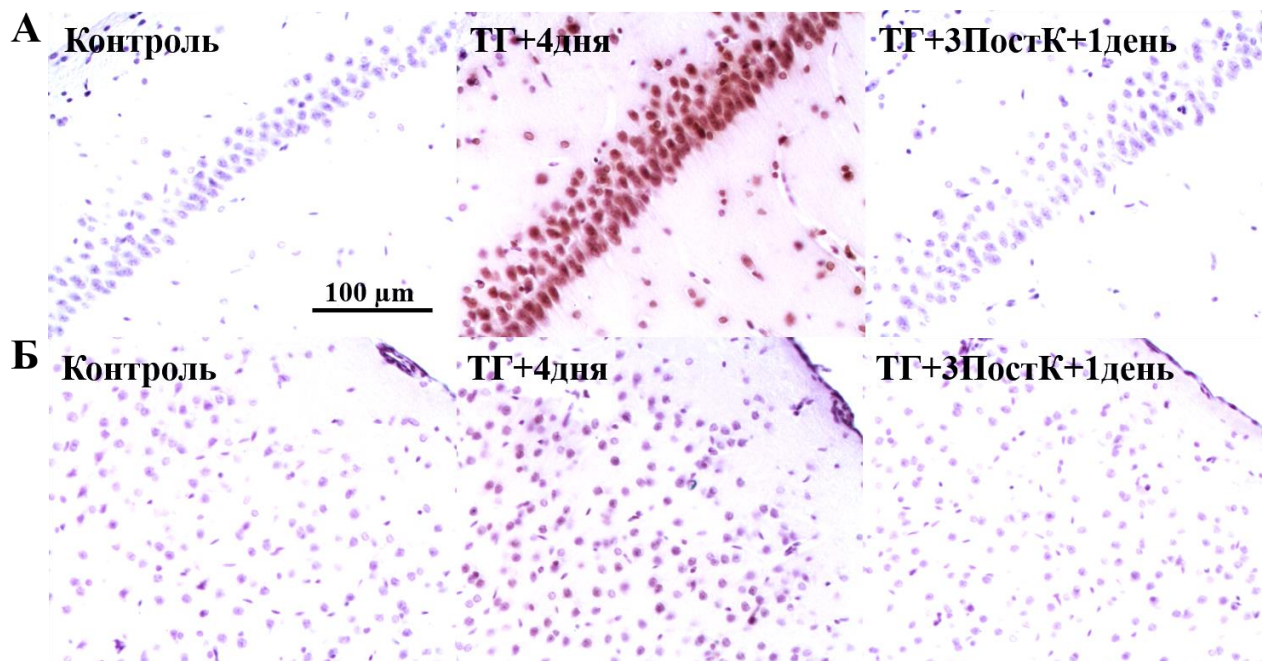


Рисунок 2. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с тремя сеансами гипоксического посткондиционирования (ТГ+3ПостК) на количество TUNEL-позитивных клеток. Микрофотографии (40х) СА1 поля гиппокампа (А) и второго слоя неокортекса (Б) контрольных крыс (Контроль), через 4 дня после тяжелой гипоксии (ТГ+4дня) и через день после тяжелой гипоксии в сочетании с трехкратным посткондиционированием умеренной гипобарической гипоксией (ТГ+3ПостК+1день). Маркер, 100 мкм.

ПостК, предъявляемое после ТГ, оказывает выраженный нейропротективный эффект, предотвращая отсроченное развитие апоптотических процессов как в гиппокампе, так и в неокортексе (Рисунок 2).

Влияние тяжелой гипоксии и тяжелой гипоксии в сочетании с посткондиционированием умеренной гипобарической гипоксией на содержание противоапоптотического белка Bcl-2 и нейротрофина BDNF в гиппокампе и неокортексе крыс. С применением АВС иммуногистохимического метода исследовали содержания маркеров нейропротекции, антиапоптотического белка Bcl-2 и нейротрофина BDNF, в СА1 поле гиппокампа и втором слое сенсомоторной коры крыс. Среднюю оптическую плотность иммунопозитивных к Bcl-2 и BDNF определяли через 75 и 96 часов после ТГ и, соответственно, через 3 и 24 часа после третьего сеанса ПостК.

Через 75 часов после ТГ средняя оптическая плотность иммунопозитивных к Vcl-2 клеток в СА1 поле гиппокампа крыс достоверно не отличается от контроля, однако через 96 часов после реоксигенации количество этого белка уменьшается до 20% от контроля (Рисунок 3, А). Предъявление трех сеансов гипоксического ПостК после ТГ сопровождается увеличением средней оптической плотности иммунопозитивных к Vcl-2 клеток в три раза по сравнению с контролем на исследуемых временных точках (Рисунок 3, А).

ТГ не приводит к изменению средней оптической плотности иммунопозитивных к BDNF клеток в СА1 поле гиппокампа ни через 75, ни через 96 часов после воздействия (Рисунок 3, Б). В то же время у ПостК животных выявлена у-регуляция содержания BDNF в гиппокампе (Рисунок 3, Б), достигающего пятикратного увеличения относительно базального уровня.

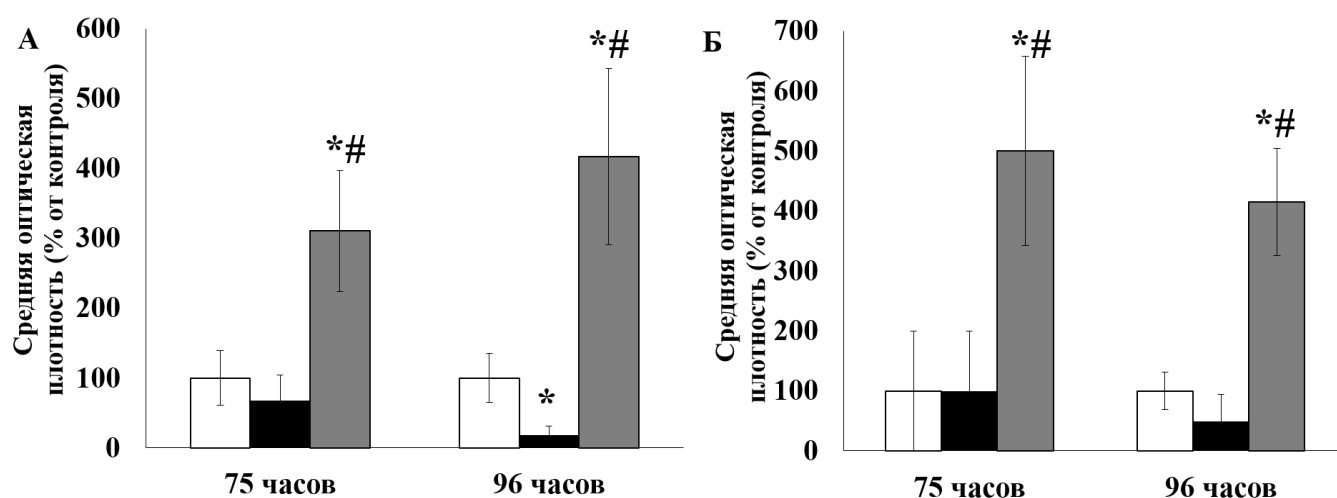


Рисунок 3. Средняя оптическая плотность иммунопозитивных к Vcl-2 (А) и BDNF (Б) клеток в СА1 поле гиппокампа контрольных крыс (белые столбики), через 75 и 96 часов после тяжелой гипобарической гипоксии у непосткондиционированных (черные столбики) и посткондиционированных животных (серые столбики). По оси абсцисс - время после тяжелой гипоксии; по оси ординат – средняя оптическая плотность иммунопозитивных клеток в % от контроля. *, различия с контролем статистически достоверны, $p \leq 0.05$; #, различия статистически достоверны по сравнению с ТГ, $p \leq 0.05$.

На Рисунке 4 представлены репрезентативные микрофотографии иммунопозитивных к Vcl-2 (Рисунок 4, А-В) и BDNF (Рисунок 4, Г-Е) клеток во втором слое сенсомоторной коры контрольных крыс и крыс, подвергавшихся воздействию ТГ или ТГ в сочетании с трехкратным ПостК. Результаты статистической обработки микрофотографий данной структуры мозга показывают, что через 4 дня после ТГ наблюдается увеличение средней оптической плотности иммунопозитивных к Vcl-2 клеток до 376% относительно контроля, в то время как у ПостК животных происходит снижение этого показателя относительно ТГ, однако он остается выше контрольных значений (233% от контроля).

На четвертый день после воздействия ТГ также наблюдается увеличение количества BDNF во втором слое неокортекса (Рисунок 4, Д). В то же время УГГ в режиме ПостК приводит к дальнейшему увеличению содержания этого белка.

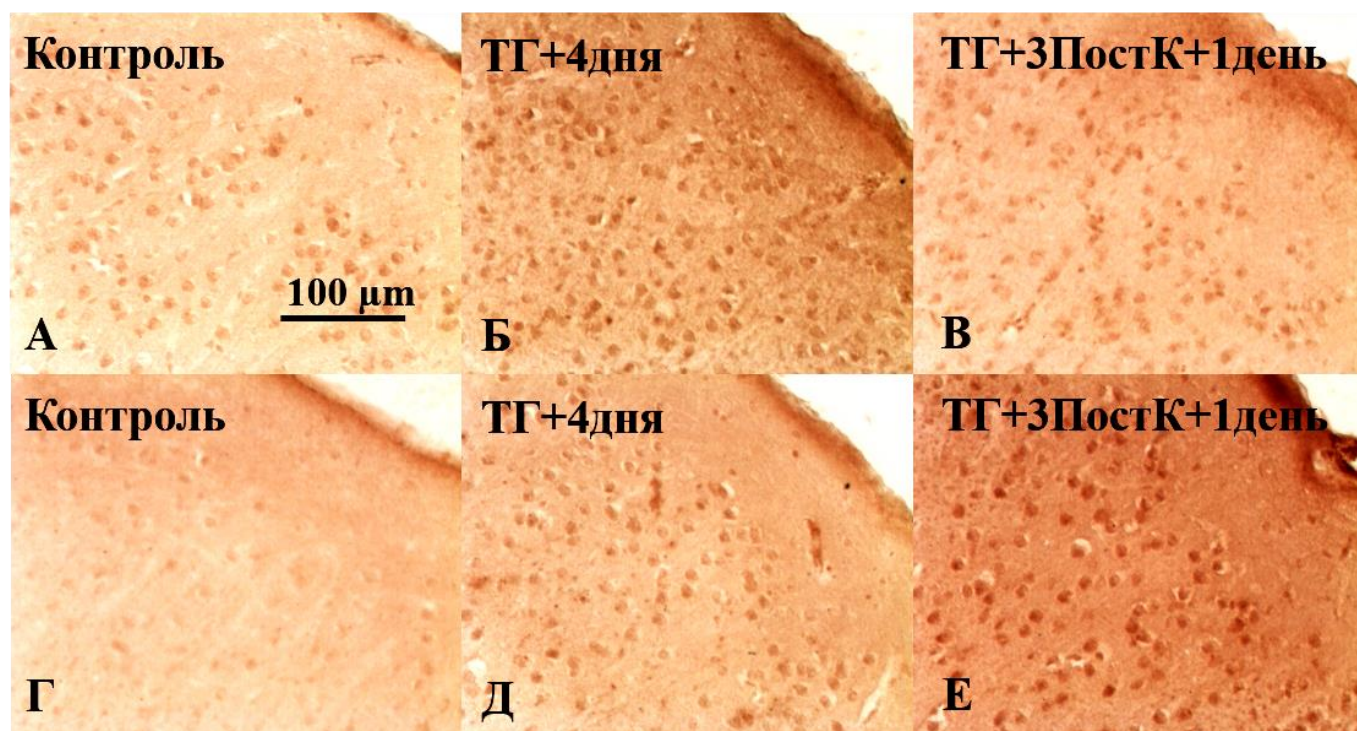


Рисунок 4. Микрофотографии (40x) второго слоя неокортекса контрольных крыс (Контроль) (А,Г), через 4 дня после тяжелой гипоксии (ТГ+4дня) (Б,Д) и через день после тяжелой гипоксии в сочетании с трехкратным посткондиционированием умеренной гипобарической гипоксией (ТГ+3ПостК+1день) (В,Е). Иммуногистохимическая реакция на Vcl-2 (А,Б,В) и BDNF (Г,Д,Е). Маркер, 100 мкм.

Влияние тяжелой гипоксии и тяжелой гипоксии в сочетании с посткондиционированием умеренной гипобарической гипоксией на содержание NIF1a и Г6ФДГ в СА1 поле гиппокампа и втором слое сенсомоторной коры крыс. С применением АВС иммуногистохимического метода для определения содержания регуляторной альфа субъединицы NIF1 в СА1 поле гиппокампа (Рисунок 5, А) нами была показана up-регуляция этого белка через 1 день после реоксигенации, сопровождающаяся дальнейшим уменьшением средней оптической плотности иммунопозитивных к NIF1a клеток относительно контроля. В случае предъявления ТГ в сочетании с сеансами ПостК УГГ динамика NIF1a в гиппокампе существенно изменяется (Рисунок 5, А), а именно происходит нормализация уровня этого транскрипционного фактора через 2 дня и сверх-экспрессия через 4 дня после ТГ.

В неокортексе крыс, переживших ТГ, выявлена противоположная динамика содержания NIF1a по сравнению с гиппокампом (Рисунок 5, Б): через 1 день после реоксигенации происходит уменьшение средней оптической плотности иммунопозитивных к этому белку клеток, после чего содержание NIF1a постепенно восстанавливается до контрольных значений. ПостК не оказывает влияния на индуцированную ТГ динамику NIF1a во втором слое неокортекса.

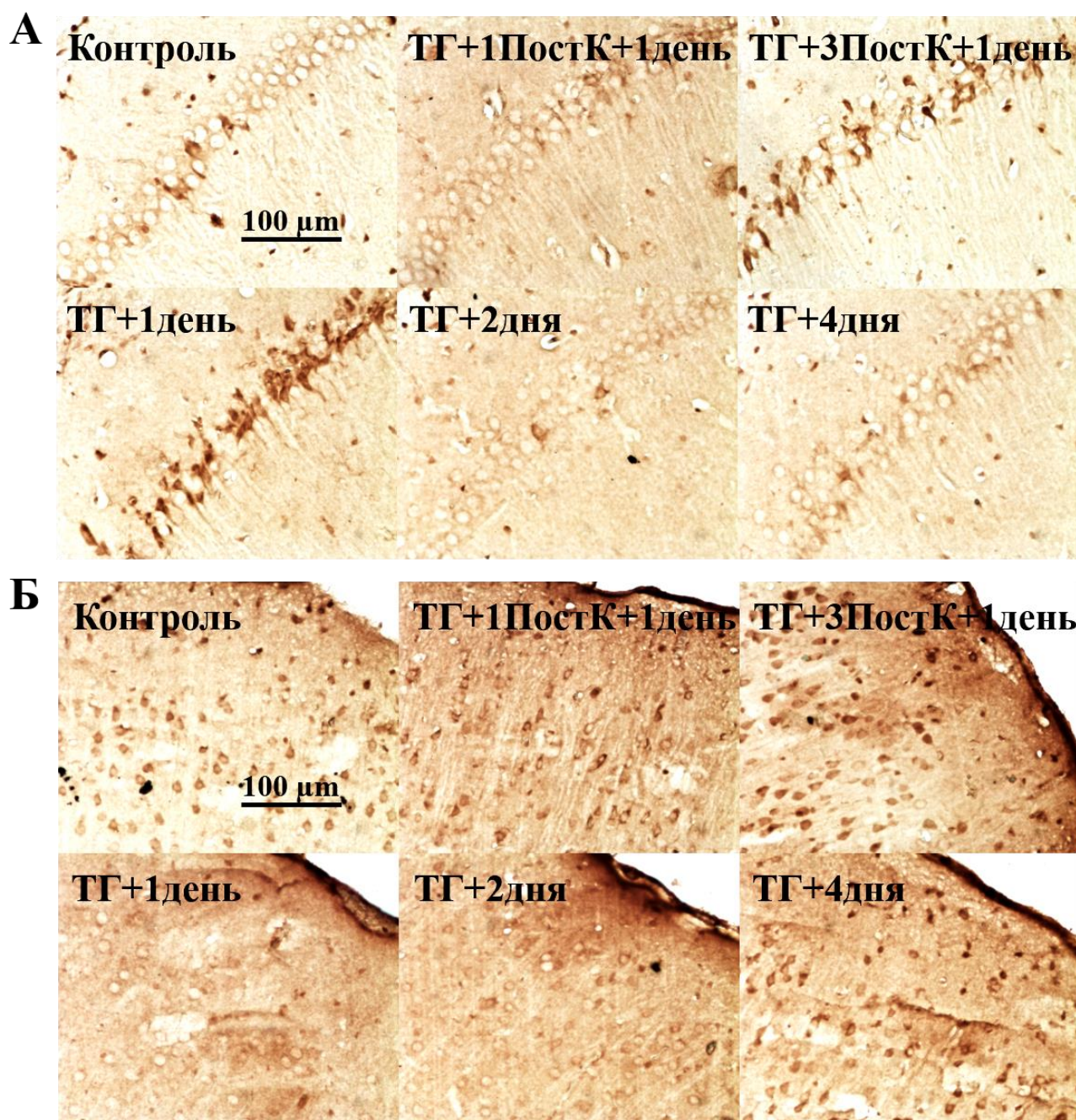


Рисунок 5. Микрофотографии (40х). Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с гипоксическим посткондиционированием (ТГ+ПостК) на количество NIF1a в СА1 поле гиппокампа (А) и втором слое неокортекса (Б) через 1,2 и 4 дня после ТГ. Маркер, 100мкм

При исследовании содержания скорость-лимитирующего фермента ПФП, Г6ФДГ, в СА1 поле гиппокампа (Рисунок 6, А), нами выявлено отсроченное уменьшение средней оптической плотности иммунопозитивных к этому ферменту клеток через 4 дня после ТГ по сравнению с контролем. При этом в неокортексе происходит уменьшение количества Г6ФДГ ко второму дню после ТГ, после чего содержание исследуемого белка восстанавливается до контрольного уровня (Рисунок 6, Б).

ПостК предотвращает отсроченное снижение количества Г6ФДГ в СА1 поле гиппокампа (Рисунок 6, А), не влияя на динамику этого белка в неокортексе (Рисунок 6, Б).

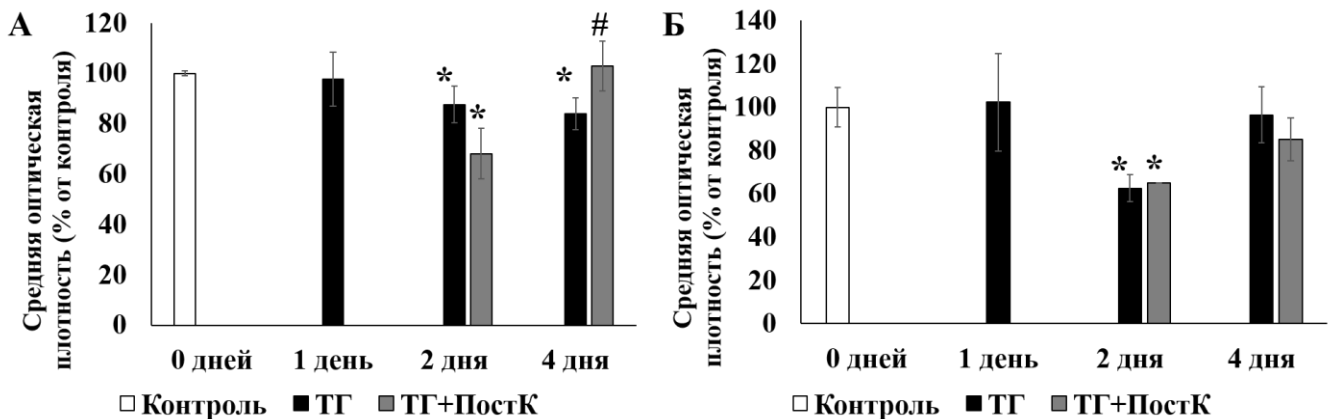


Рисунок 6. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с гипоксическим посткондиционированием (ТГ+ПостК) на среднюю оптическую плотность иммунопозитивных к Г6ФДГ клеток в СА1 поле гиппокампа (А) и втором слое неокортекса (Б) через 1,2 и 4 дня после ТГ. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

Влияние тяжелой гипоксии и тяжелой гипоксии в сочетании с посткондиционированием умеренной гипобарической гипоксией на активность Г6ФДГ и количество НАДФН в гиппокампе и неокортексе крыс. Для оценки функционального состояния пентозофосфатного пути в гиппокампе и неокортексе крыс, переживших ТГ или ТГ в сочетании с ПостК, нами было произведено измерение активности Г6ФДГ и количества восстановленного НАДФ. Как видно из Рисунка 7, А, через 1 день после ТГ активность Г6ФДГ в гиппокампе возрастает до 135% от контроля. Однако в дальнейшем происходит снижение активности этого фермента - до 65% через 4 дня после тяжелого гипоксического воздействия. Параллельно этому наблюдается устойчивое уменьшение количества продукта ПФП, НАДФН (Рисунок 7, Б).

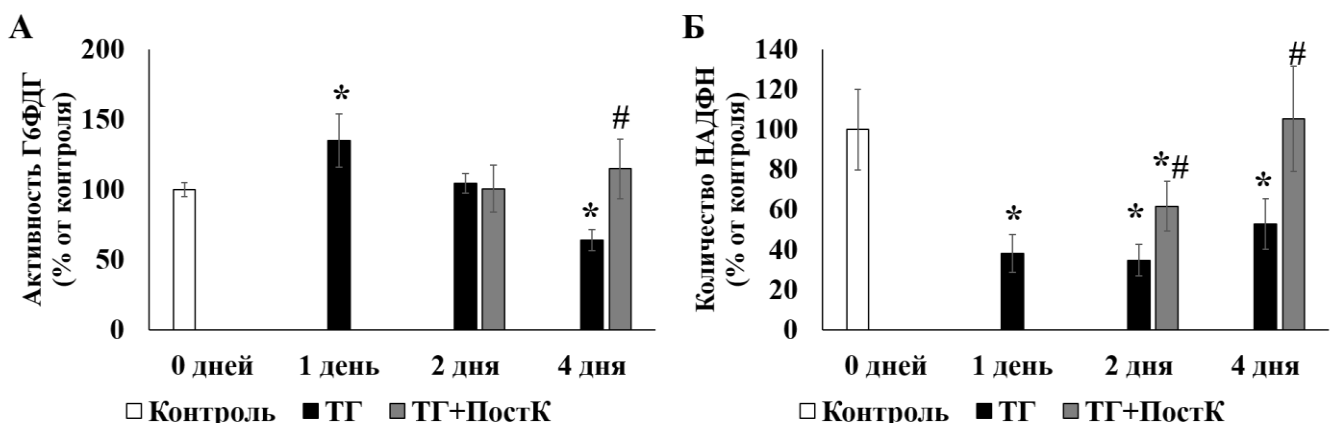


Рисунок 7. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с гипоксическим посткондиционированием (ТГ+ПостК) на активность Г6ФДГ (А) и количество НАДФН (Б) в гиппокампе крыс. Активность Г6ФДГ и количество НАДФН нормализовано на количество общего белка и выражено в % от контроля. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

Трехкратное ПостК предотвращает отсроченное снижение активности Г6ФДГ в гиппокампе (Рисунок 7, А), что сопровождается постепенной нормализацией количества НАДФН (Рисунок 7, Б).

В неокортексе крыс, переживших ТГ, через 1 и 4 дня реоксигенации не выявлено достоверных изменений активности Г6ФДГ по сравнению с контролем, однако через 2 дня после ТГ наблюдается небольшое уменьшение активности Г6ФДГ. Количество НАДФН в данной структуре мозга крыс снижено в течение двух дней после реоксигенации.

ПостК предотвращает снижение активности Г6ФДГ, нормализуя количество НАДФН уже через 2 дня после ТГ.

Влияние тяжелой гипоксии и тяжелой гипоксии в сочетании с посткондиционированием умеренной гипобарической гипоксией на окислительно-восстановительный статус, количество общего глутатиона и интенсивность процессов перекисного окисления липидов в гиппокампе и неокортексе крыс. Для оценки наличия окислительного стресса нами был измерен окислительно-восстановительный статус цитозольной фракции гиппокампа и неокортекса крыс по соотношению тиоловых групп к общему содержанию белка. Как видно из Рисунка 8, А, снижение эффективности пентозофосфатного пути в гиппокампе крыс, переживших ТГ, сопровождается долгосрочным смещением окислительно-восстановительного статуса клеток в сторону закисления. Устойчивое уменьшение количества глутатиона (Рисунок 8, Б) также указывает на развитие состояния окислительного стресса в этой структуре мозга крыс в результате ТГ и последующей реоксигенации.

ПостК нормализует количество тиоловых групп в гиппокампе (Рисунок 8, А), вызывая существенное, хоть и не достигающее контрольных значений, увеличение количества глутатиона через 4 дня после ТГ (Рисунок 8, Б).

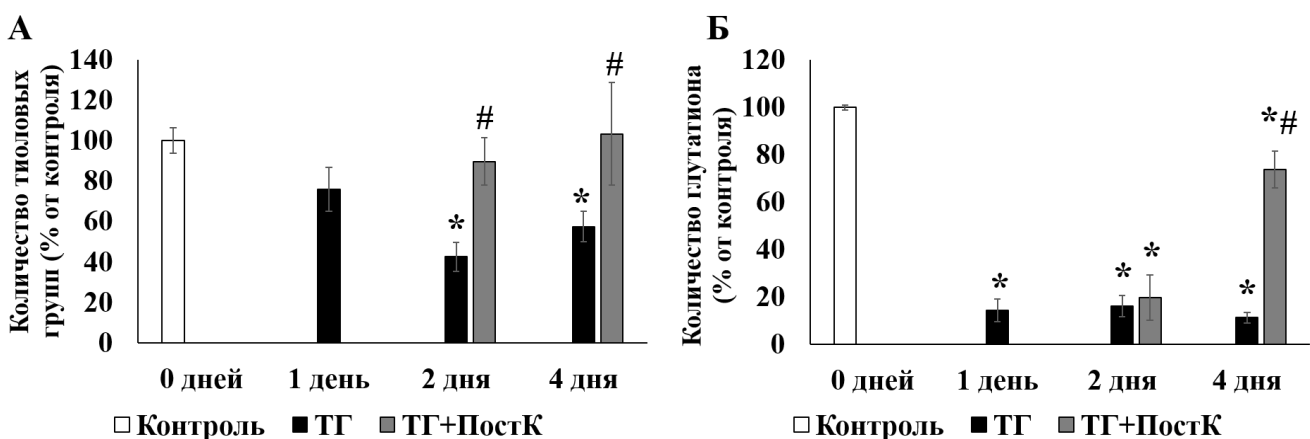


Рисунок 8. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с гипоксическим посткондиционированием (ТГ+ПостК) на количество тиоловых групп (А) и глутатиона (Б) в гиппокампе крыс. Количество тиоловых групп и глутатиона нормализовано на количество общего белка и выражено в % от контроля. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

Маркеры окислительного стресса в неокортексе крыс, переживших ТГ, выявлены только через 1 день реоксигенации. В дальнейшем эти показатели достоверно не отличаются от контрольного уровня.

ПостК не вызывает достоверного изменения количества тиоловых групп в неокортексе по сравнению с непосткондиционированной ТГ, однако приводит к небольшому уменьшению количества глутатиона через 4 дня после ТГ.

При анализе эффектов ТГ на процессы свободнорадикального окисления в ранний период реоксигенации, когда забор материала осуществляли сразу после сеанса ТГ, показано, что ТГ оказывает различный эффект на гиппокамп и сенсомоторную кору. Так в гиппокампе наблюдается интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Рисунок 9), в то время как в неокортексе достоверных изменений процессов ПОЛ не выявлено.

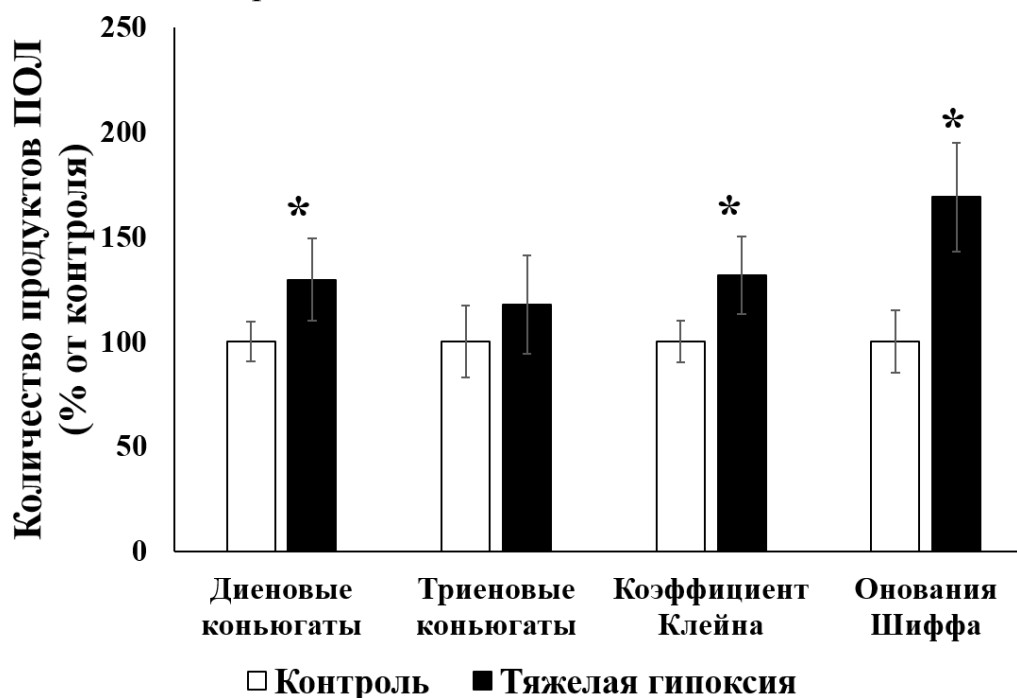


Рисунок 9. Влияние тяжелой гипоксии на количество диеновых и триеновых конъюгатов, коэффициент Клейна и количество оснований Шиффа в гиппокампе крыс. Количество продуктов перекисного окисления липидов нормализовано на количество общего фосфора фосфолипидов и выражено в % от контроля. * Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$.

В дальнейшем в гиппокампе крыс, переживших ТГ, на протяжении 4 дней после воздействия не выявлено достоверных отличий количества оснований Шиффа по сравнению с контролем, однако через 1 день после третьего сеанса ПостК этот показатель составляет всего 30% от контроля, что указывает на антиоксидантный эффект ПостК на эту структуру мозга и согласуется с данными о мобилизации ПФП.

В неокортексе крыс в течение 4 дней после ТГ количество оснований Шиффа достоверно ниже, чем в контроле. Через 3 дня после ТГ, а также на всех исследуемых сроках ТГ в сочетании с ПостК достоверных отличий количества оснований Шиффа по сравнению с контролем для этой структуры мозга не выявлено.

Влияние инъекции ингибитора HIF1 на апоптотические процессы в CA1 поле гиппокампа крыс, переживших тяжелую гипоксию. Ингибирование трансляции HIF1 топотеканом позволило нам изучить участие данного транскрипционного фактора в развитии индуцируемых тяжелой гипоксией процессов в гиппокампе крыс. Как оказалось, введение ингибитора HIF1 перед сеансом повреждающей гипоксии приводит к существенному уменьшению количества апоптотических клеток в CA1 поле гиппокампа по сравнению с ТГ (Рисунок 10).

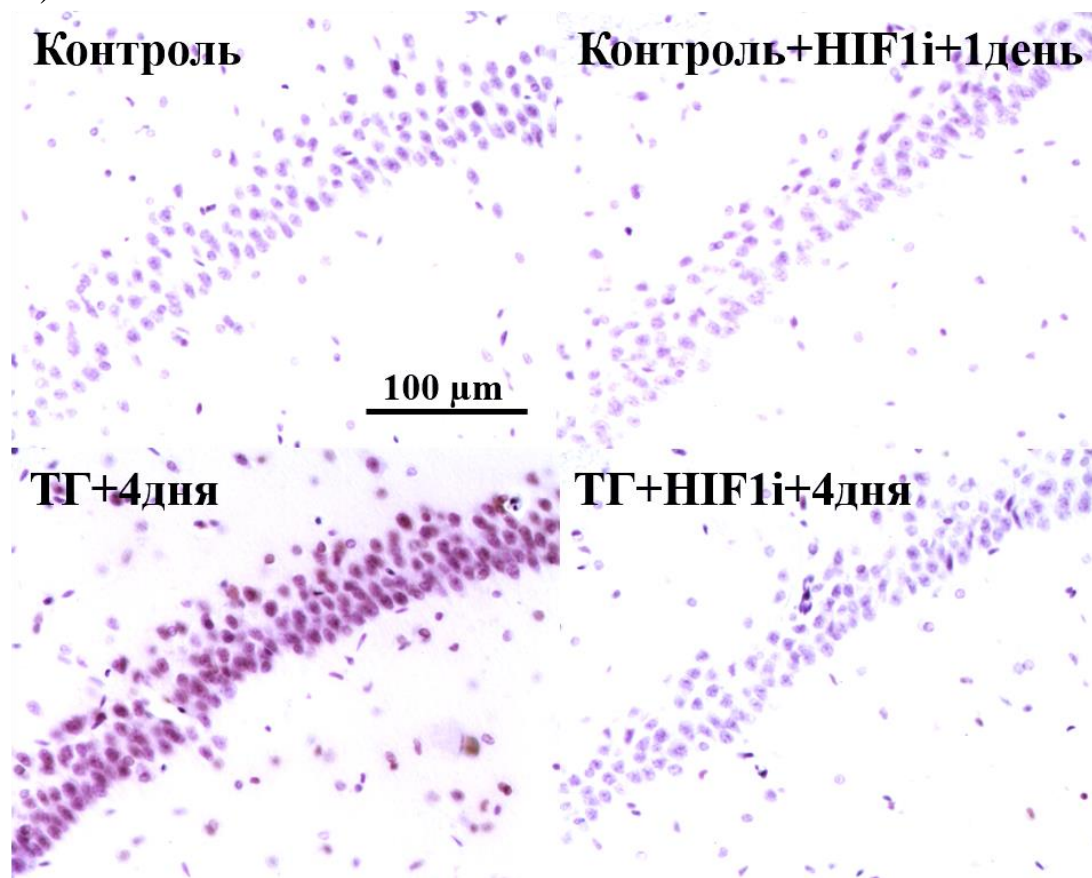


Рисунок 10. Микрофотографии (40х). Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием HIF1 (ТГ+HIFi) на количество TUNEL-позитивных клеток через 4 дня после реоксигенации в CA1 поле гиппокампа крыс. Маркер, 100 мкм.

Влияние инъекции ингибитора HIF1 на содержание HIF1a, эритропоэтина и Г6ФДГ в CA1 поле гиппокампа крыс, переживших тяжелую гипоксию. С помощью АВС иммуногистохимического метода анализа содержания HIF1a в CA1 поле гиппокампа (Рисунок 11, А) нами было показано, что через 1 день после ТГ происходит увеличение средней оптической плотности иммунопозитивных к HIF1a клеток до 180% от контроля, после чего средняя оптическая плотность иммунопозитивных клеток снижается. В случае введения ингибитора HIF1 крысам перед сеансом ТГ через 1 день после начала реоксигенации up-регуляция HIF1a не наблюдается (Рисунок 11, А), что можно было ожидать, исходя из сведений о механизме действия топотекана, блокирующего трансляцию этого транскрипционного фактора. В отсроченном периоде после ТГ уровень HIF1a в гиппокампе крыс этой группы не отличается от контроля, однако происходит

уменьшение содержания эритропоэтина (Рисунок 11, Б), представляющего собой белковый продукт транскрипционной активности HIF1, что указывает на эффективность используемого ингибитора.

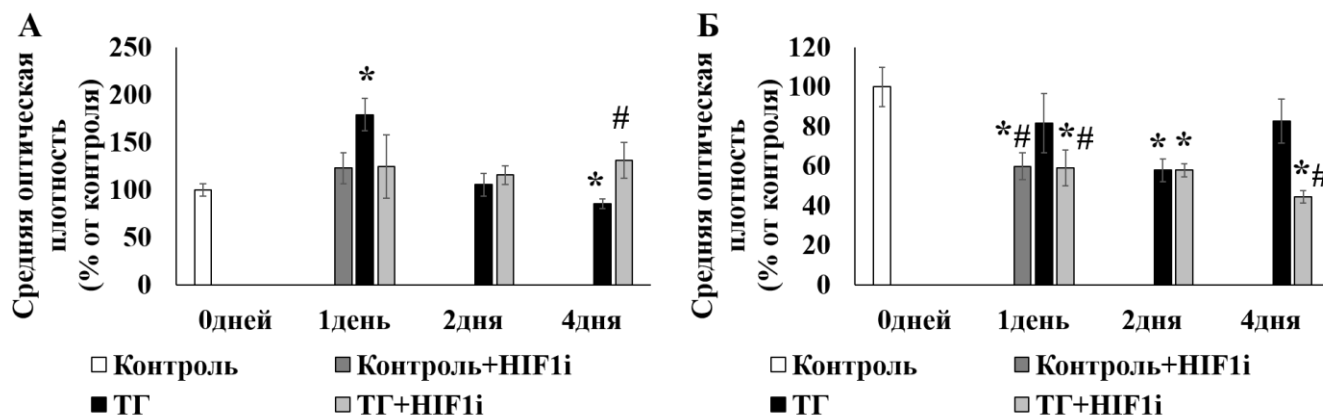


Рисунок 11. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием HIF1 (ТГ+HIF1i) на среднюю оптическую плотность иммунопозитивных к HIF1a (А) и эритропоэтину (Б) клеток в СА1 поле гиппокампа через 1,2 и 4 дня после ТГ. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

При исследовании содержания скорость-лимитирующего фермента пентозофосфатного пути, Г6ФДГ (Рисунок 12), в СА1 поле гиппокампа нами было обнаружено, что ТГ вызывает уменьшение содержания этого фермента через 4 дня после реоксигенации по сравнению с контролем. В свою очередь ингибирование HIF1 перед ТГ предотвращает ослабление экспрессии Г6ФДГ в гиппокампе.

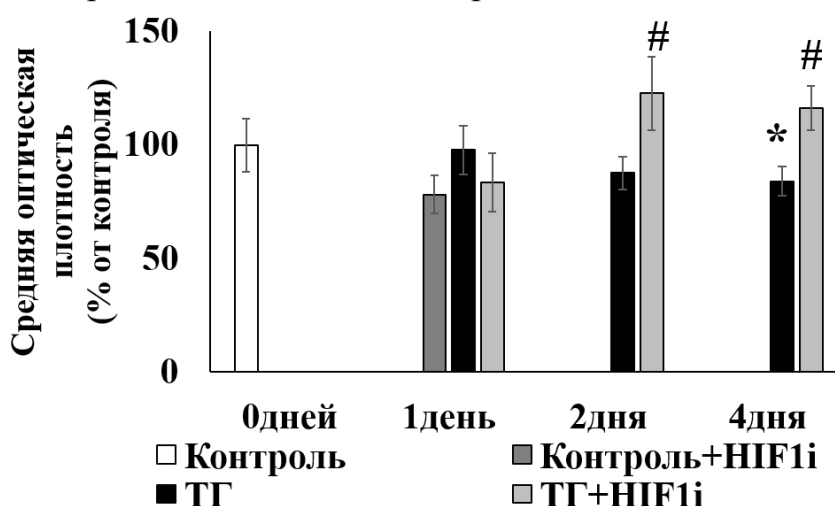


Рисунок 12. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием HIF1 (ТГ+HIF1i) на среднюю оптическую плотность иммунопозитивных к Г6ФДГ клеток в СА1 поле гиппокампа через 1,2 и 4 дня после ТГ. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

Влияние инъекции ингибитора HIF1 на активность Г6ФДГ и количество НАДФН в гиппокампе крыс, переживших тяжелую гипоксию. Для оценки функционального состояния пентозофосфатного пути в гиппокампе крыс, переживших ТГ, следующую за инъекцией ингибитора HIF1 или без нее, мы

определили активность Г6ФДГ и измерили количество восстановленного НАДФ. Как показано на Рисунке 13, А, через 1 день после ТГ активность Г6ФДГ возрастает до 135% от контроля. Однако в дальнейшем происходит снижение активности этого фермента до 65% через 4 дня реоксигенации. Параллельно этому наблюдается устойчивое уменьшение количества продукта пентозофосфатного пути, НАДФН (Рисунок 13, Б).

Ингибирование NIF1 через 1 день после ТГ вызывает снижение, а затем постепенную нормализацию активности Г6ФДГ до контрольных значений (Рисунок 13, А), при этом способствуя увеличению количества НАДФН в гиппокампе крыс (Рисунок 13, Б).

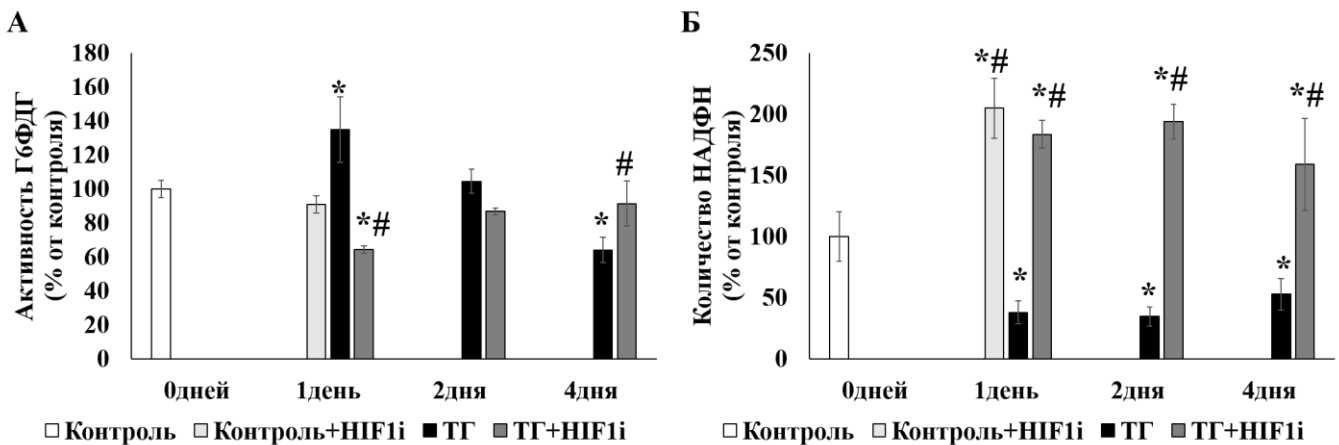


Рисунок 13. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием NIF1 (ТГ+NIF1i) на активность Г6ФДГ (А) и количество НАДФН (Б) в гиппокампе крыс. Активность Г6ФДГ и количество НАДФН нормализовано на количество общего белка и выражено в % от контроля. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

Влияние инъекции ингибитора NIF1 на окислительно-восстановительный статус, количество общего глутатиона и оснований Шиффа в гиппокампе крыс, переживших тяжелую гипоксию. Для оценки эффектов ингибирования NIF1 перед ТГ на процессы окислительного стресса нами был оценен окислительно-восстановительный статус цитозольной фракции гиппокампа крыс по соотношению тиоловых групп к общему содержанию белка. Как видно из Рисунка 14, А, ТГ вызывает долгосрочное смещение окислительно-восстановительного статуса клеток в сторону окисленного состояния. При этом в случае инъекции ингибитора NIF1, способствующей увеличению эффективности ПФП, перед ТГ не выявлено достоверных изменений окислительно-восстановительного статуса цитозольной фракции гиппокампа по сравнению с контролем (Рисунок 14, А).

Количество общего глутатиона в гиппокампе крыс на всех исследованных временных точках после ТГ без инъекции ингибитора NIF1 достоверно ниже по сравнению с контролем (Рисунок 14, Б). В то же время инъекция ингибитора NIF1 перед ТГ существенно ослабляет снижение уровня глутатиона (Рисунок 14, Б).

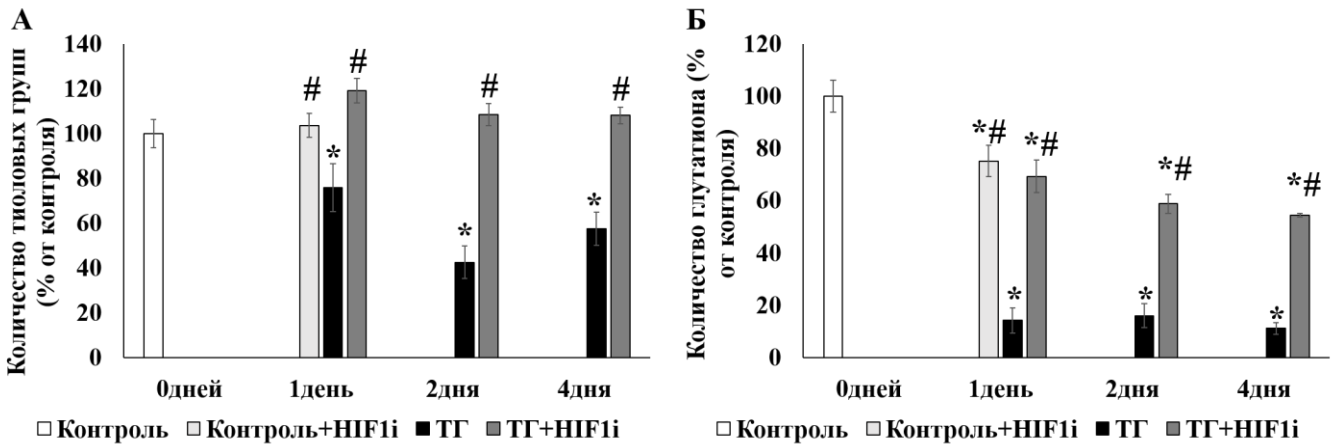


Рисунок 14. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием NIF1 (ТГ+NIF1i) на количество тиоловых групп (А) и количество глутатиона (Б) в гиппокампе крыс. Количество тиоловых групп и глутатиона нормализовано на количество общего белка и выражено в % от контроля. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к ТГ, $p \leq 0.05$.

При оценке интенсивности перекисного окисления липидов, мы использовали основания Шиффа в качестве возможного маркера. Использование ингибитора NIF1 способствует ослаблению свободнорадикального окисления в течение 2 дней после ТГ (Рисунок 15).

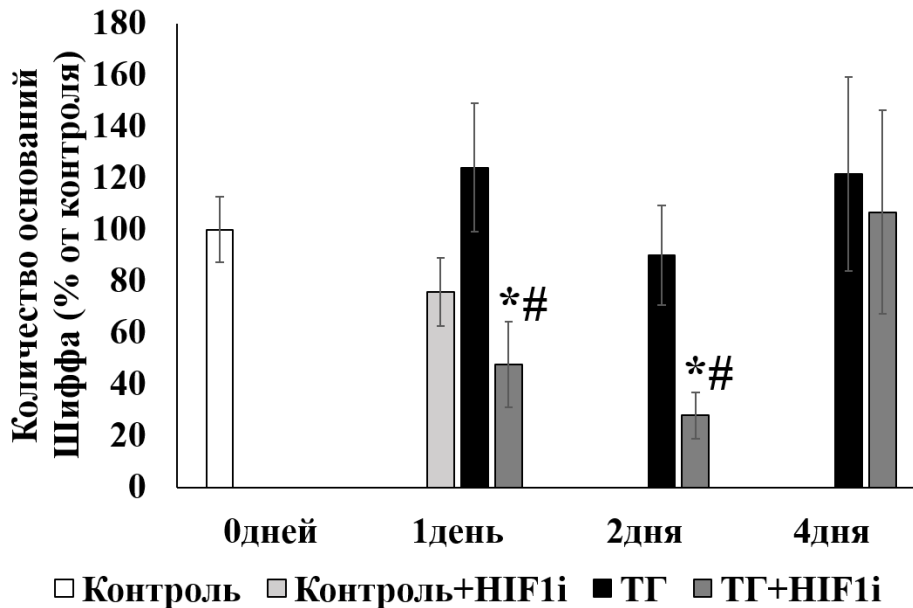


Рисунок 15. Влияние тяжелой гипоксии (ТГ) и тяжелой гипоксии в сочетании с ингибированием NIF1 (ТГ+NIF1i) на количество оснований Шиффа в гиппокампе крыс. Количество оснований Шиффа нормализовано на количество общего фосфора фосфолипидов и выражено в % от контроля. *, различия с контролем статистически достоверны, $p \leq 0.05$; #, различия статистически достоверны по сравнению с тяжелой гипоксией, $p \leq 0.05$.

Использование модели трехкратной умеренной гипобарической гипоксии для анализа роли NIF1 в регуляции транскрипции мРНК Г6ФДГ. Исследование взаимосвязи между активностью NIF1 и транскрипцией Г6ФДГ в гиппокампе мы провели с использованием метода ПЦР в реальном времени. В качестве NIF1-

позитивной модели использовали режим трехкратной умеренной гипобарической гипоксии (Samoilov et al., 2015) на фоне инъекции ингибитора HIF1 либо без нее. Как видно на Рисунке 16, количество мРНК Г6ФДГ существенно увеличивается через 3 часа и 24 часа после последнего сеанса УГГ. При этом, ведение ингибитора HIF1 непосредственно перед гипоксическими сеансами усиливает этот эффект как через 3 часа, так и через 24 часа после последнего гипоксического эпизода.

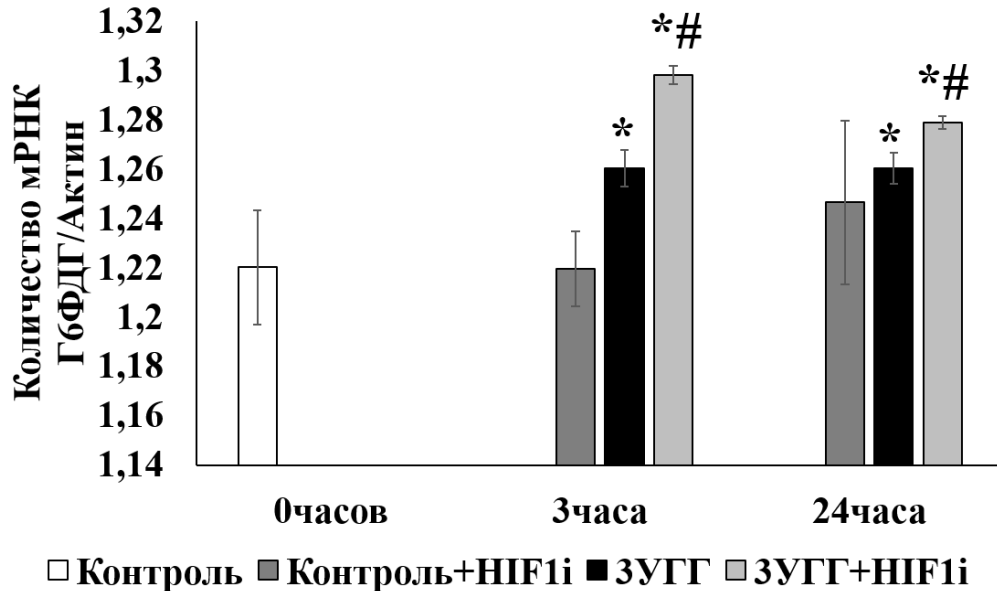


Рисунок 16. Влияние трехкратной умеренной гипобарической гипоксии (3УГГ) и 3УГГ в сочетании с ингибированием HIF1 (3УГГ+HIF1i) на уровень мРНК Г6ФДГ в гиппокампе крыс через 3 и 24 часа после воздействия. Количество мРНК Г6ФДГ нормализовано на количество мРНК актина-бета. *, Различия достоверны по отношению к контролю, $p \leq 0.05$; #, Различия достоверны по отношению к группе 3УГГ, $p \leq 0.05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения настоящей работы, посвященной расшифровке нейропротективных механизмов гипобарического ПостК, а также оценке вклада HIF1 в реализацию постгипоксических эффектов, нами было показано, что тяжелая гипобарическая гипоксия (ТГ) аналогично ишемическим моделям приводит к краткосрочному увеличению содержания HIF1a, в дальнейшем вызывая уменьшение его количества. Также в результате гистохимического исследования апоптотических клеток и электрофоретического анализа фрагментации ДНК нами подтверждены ранее полученные в нашей лаборатории данные о ТГ-зависимой индукции апоптоза (Rybnikova et al., 2006, 2012). При этом как инъекция ингибитора HIF1 перед ТГ, так и применение ПостК предотвращают развитие апоптотических процессов.

Важнейшим элементом метаболизма мозга, вовлеченным в поддержание антиоксидантных систем и обеспечение нормального окислительно-восстановительного статуса за счет генерации восстановленного НАДФ, признан пентозофосфатный путь (ПФП) метаболизма глюкозы (Fernandez-Fernandez et al., 2012, Ven-Yoseph et al., 1996). В частности, недавно была показана существенная роль ПФП в предотвращении последствий окислительного стресса, индуцированного депривацией кислорода и глюкозы *in vitro* (Sun S., et al. 2017). В

настоящем исследовании, с использованием HIF1-позитивной модели трехкратной умеренной гипобарической гипоксии *in vivo*, мы установили наличие обратной связи между активностью HIF1 и транскрипцией первого скорость-лимитирующего фермента ПФП, Г6ФДГ, а также позитивную регуляцию экспрессии гена этого фермента входе реоксигенации после трехкратной умеренной гипобарической гипоксии.

В модели ТГ краткосрочное увеличение количества HIF1a непосредственно после реоксигенации хоть и сопровождалось увеличением активности Г6ФДГ, но не приводило к эффективной наработке НАДФН. В свою очередь уменьшение количества и активности Г6ФДГ и снижение уровня НАДФН в отсроченный постгипоксический период сопровождалось формированием долгосрочного окислительного стресса в гиппокампе крыс, приводя к массивной клеточной гибели.

В связи с этим, ингибирование HIF1 перед ТГ, также, как и использование ПостК умеренной гипобарической гипоксией предположительно могли способствовать предотвращению патологии, индуцируемой тяжелой повреждающей гипоксией. В результате проведенных нами исследований установлено, что использование ингибитора HIF1 перед ТГ предотвращает краткосрочную стимуляцию этого транскрипционного фактора, нормализует работу ПФП, усиливая восстановление НАДФ и нивелируя окислительный стресс, что способствует снижению интенсивности свободнорадикального окисления липидов и предотвращению запуска клеточной гибели по типу апоптоза. ПостК также стабилизирует функционирование ПФП, вероятно HIF1-независимым путем, нормализует редокс статус, количество глутатиона и предотвращает развитие апоптотических процессов.

Функциональная значимость показанной нами роли ПФП в обеспечении защитных реакций мозга на последствия тяжелых форм гипоксии косвенно подтверждается недавно опубликованными данными о протективном эффекте введения НАДФН в ранний постинсультный период (Li et al., 2017). Полученные нами данные объясняют этиологию данного явления, расширяя современные представления о механизмах постгипоксических патологий и способствуя пониманию путей реализации антиапоптотического и антиоксидантного действия гипоксического посткондиционирования. Использование ингибиторов HIF1 в ранний постинсультный период, а также введение НАДФН пациентам, пережившим инсульт, может оказаться эффективной нейропротективной стратегией.

На Рисунке 17 представлено схематическое обобщение основных результатов, полученных нами в ходе выполнения настоящей работы.



Рисунок 17. Схема регуляции пентозофосфатного пути и связанных с пентозофосфатным путем процессов в гиппокампе крыс, переживших тяжелую гипоксию, тяжелую гипоксию в сочетании с гипоксическим посткондиционированием либо на фоне ингибирования HIF1.

ВЫВОДЫ

1. Тяжелая гипоксия вызывает развитие процессов клеточной гибели в мозге крыс, наиболее выражено проявляющиеся в гиппокампе. Гипоксическое посткондиционирование оказывает противоапоптотическое действие в гиппокампе и неокортексе.
2. Тяжелая гипоксия вызывает уменьшение содержания противоапоптотического белка Bcl-2 в гиппокампе крыс, не оказывая влияния на уровень нейротрофина BDNF в этой структуре мозга, в то же время повышая содержание Bcl-2 и BDNF во втором слое сенсомоторной коры. Гипоксическое посткондиционирование способствует увеличению содержания белков Bcl-2 и BDNF как в гиппокампе, так и в неокортексе крыс, переживших тяжелую гипоксию.
3. Тяжелая гипоксия вызывает гиперэкспрессию HIF1a в CA1 поле гиппокампа в ранний период реоксигенации, ведя к отсроченному снижению содержания и активности Г6ФДГ, уровня НАДФН, общего глутатиона и снижению окислительно-восстановительного статуса в гиппокампе крыс, не оказывая долгосрочного влияния на эти показатели в неокортексе. Предъявление крысам, пережившим тяжелую гипоксию, умеренной гипобарической гипоксии в режиме посткондиционирования предотвращает отсроченное уменьшение содержания и активности Г6ФДГ, в то же время способствуя нормализации количества НАДФН, общего глутатиона, окислительно-восстановительного статуса и

- снижению процессов свободнорадикального окисления липидов в гиппокампе, но не в сенсомоторной коре крыс.
4. Инъекция ингибитора NIF1 крысам перед тяжелой гипоксией способствует предотвращению процессов клеточной гибели в гиппокампе.
 5. Инъекция ингибитора NIF1 крысам перед тяжелой гипоксией предотвращает отсроченное уменьшение содержания и активности Г6ФДГ, в то же время способствуя увеличению количества НАДФН, нормализации уровня общего глутатиона, редокс статуса и снижению процессов свободнорадикального окисления липидов в гиппокампе.
 6. В модели трехкратной умеренной гипобарической гипоксии установлено наличие обратной связи между активностью NIF1 и экспрессией гена Г6ФДГ. В то же время выявлено увеличение количества мРНК Г6ФДГ в ответ на трехкратную умеренную гипобарическую гипоксию и реоксигенацию.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ:

- 1) **О.В. Ветровой**, Е.А. Рыбникова, Т.С. Глущенко, К.А. Баранова, М.О. Самойлов «Умеренная гипобарическая гипоксия в режиме посткондиционирования повышает экспрессию NIF-1a и эритропоэтина в CA1 поле гиппокампа крыс, переживших тяжелую гипоксию», Нейрохимия, том 31, номер 2, 2014, стр. 134-139.
- 2) **О.В. Ветровой**, Е.А. Рыбникова, Т.С. Глущенко, М.О. Самойлов «Влияние гипоксического посткондиционирования на экспрессию противоапоптотического белка Bcl-2 и нейротрофина BDNF в CA1 поле гиппокампа крыс, переживших тяжелую гипоксию», Морфология, том 145, номер 2, 2014, стр. 16-20.
- 3) К.А.Баранова, Е.А.Рыбникова, А.В.Чурилова, **О.В.Ветровой**, М.О.Самойлов «Проадаптивная роль нейрональных транскрипционных факторов CREB и NF-κB в моделях постстрессовых психопатологий на крысах», Нейрохимия, том 31, номер 1, 2014, стр. 23-30.
- 4) Е.И.Тюлькова, Л.И.Ватаева, **О.В.Ветровой** «Пренатальная гипоксия модифицирует рабочую память и активность полифосфоинозитидной системы гиппокампа крыс», Журнал эволюционной физиологии и биохимии, том 51, номер 2, 2015, стр. 115-121.
- 5) **О.В. Ветровой**, Е.А. Рыбникова, Т.С. Глущенко, М.О. Самойлов «Влияние различных режимов гипобарической гипоксии на экспрессию маркера нейрогенеза NeuroD2 в зубчатой извилине гиппокампа крыс», Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, том 160, номер 10, 2015, стр. 519-522.
- 6) **О.В. Ветровой**, Е.А. Рыбникова, М.О. Самойлов «Церебральные механизмы гипоксического/ишемического посткондиционирования», Биохимия, том 82, номер 3, 2017, стр. 542-551.
- 7) Е. И. Тюлькова, **О. В. Ветровой**, К. В. Сариева, Л. А. Ватаева, Т. С. Глущенко Особенности ацетилирования гистона H3 по Lys24 в гиппокампе и неокортексе крыс, переживших гипоксический стресс в различные сроки пренатального развития, Нейрохимия, том 34, номер 4, 2017, стр. 310-316.

Статьи в рецензируемых журналах:

1) Е.А.Рыбникова, К.А.Баранова, Т.С.Глущенко, **О.В.Ветровой**, М.В.Сидорова «Участие транскрипционного фактора HIF-1 в нейрональных механизмах адаптации к психоэмоциональному и гипоксическому стрессу». Фізіологічний журнал НАН України, том 59, номер 6, 2013, стр. 88-97.

2) М. Samoilov, А. Churilova, Т. Gluschenko, **О. Vetrovoy**, N. Dyuzhikova and E. Rybnikova “Acetylation of histones in neocortex and hippocampus of rats exposed to different modes of hypobaric hypoxia: implications for brain hypoxic injury and tolerance,” Acta Histochemica, vol. 118, no. 2, 2016, pp. 80-89.

3) **О. Vetrovoy**, E. Tulkova, K. Sarieva, E. Kotryahova, M. Zenko, E. Rybnikova “Neuroprotective effect of hypobaric hypoxic postconditioning is accompanied by dna protection and lipid peroxidation changes in rat hippocampus”, Neuroscience Letters, vol. 639, 2017, pp. 49–52.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК - активные формы кислорода;

Г6ФДГ - глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа;

НАДФ(Н) - никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленный);

ПОЛ - перекисное окисление липидов;

ПостК - гипоксическое посткондиционирование;

ПФП - пентозофосфатный путь;

ПЦР - полимеразная цепная реакция;

ТГ - тяжелая повреждающая гипоксия;

УГГ - умеренная гипобарическая гипоксия;

Bcl2 - белки семейства Bcl2-подобных белков, ассоциированных с митохондриальной индукцией апоптоза;

BDNF - brain-derived neurotrophic factor – нейротрофический фактор мозга;

HIF1(α) - гипоксия-индуцируемый фактор-1 (альфа);

TUNEL - terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling - dUTP концевое мечение ДНК терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазой.