

БЕЛЯКОВ  
АЛЕКСАНДР ВИТАЛЬЕВИЧ

**РОЛЬ МЕТАБОТРОПНЫХ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ I ГРУППЫ  
В ФОРМИРОВАНИИ ТОЛЕРАНТНОСТИ НЕЙРОНОВ МОЗГА К ГИПОКСИИ**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург  
2010

Работа выполнена в лаборатории регуляции функций нейронов мозга  
Института физиологии им. И.П. Павлова РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук  
**Семенов Дмитрий Германович**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
**Лопатина Нина Георгиевна**  
Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН

доктор биологических наук  
**Чернышева Марина Павловна**  
Санкт-Петербургский государственный  
университет

Ведущая организация: НИИ Экспериментальной медицины СЗО РАМН

Защита состоится 15 марта 2010 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета (Д 002.020.01) по защите докторских и кандидатских диссертаций при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6.)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке  
Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Автореферат разослан 11 февраля 2010 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Н.Э. Ордян

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность проблемы.** Нарушение кислородного снабжения мозга - ведущий нейрпатологический фактор и конечное звено в причинно-следственной цепи большинства тяжелых заболеваний. Известно, что даже непродолжительные периоды ишемии или тяжелой гипоксии могут приводить к повреждениям областей мозга с сопутствующим неврологическим дефицитом и поведенческой дисфункцией. Ведущий фактор гибели нервных клеток при тяжелом гипоксическом воздействии - глутаматная эксайтотоксичность, связанная с гиперактивацией ионотропных глутаматных рецепторов NMDA и AMPA типа. Она сопровождается избыточным входом экстраклеточного  $Ca^{2+}$ , запускающего каскады деструктивных внутриклеточных реакций (Choi, 1988; Самойлов, 1999; Kristian, 2004). Дополнительный механизм гипоксического повреждения нейронов - активация сигнальных путей метаботропных глутаматных рецепторов первой группы (ImGluRs). Их стимуляция способствует повышению внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  как при его входе, так и при высвобождении из внутриклеточных пулов. Вместе с тем установлено, что ImGluRs могут принимать участие как в потенциации, так и в угнетении ионотропных глутаматных рецепторов (iGluRs), что часто вызывает противоречивые оценки их роли в формировании гипоксических и постгипоксических состояний мозга.

Одна из центральных задач современной биологии и медицины - поиск путей повышения устойчивости мозга к гипоксии. Основные подходы к решению этой задачи: применение лекарственных средств и использование немедикаментозных приемов, направленных на мобилизацию эндогенных эволюционно приобретенных и генетически детерминированных защитных механизмов. Эти подходы взаимообусловлены и развитие первого не возможно без изучения второго. В рамках первой группы методов фармакологическое воздействие на модуляторную функцию ImGluRs представляется менее жестким, чем прямая блокада iGluRs, и имеет перспективы успешного применения в профилактике и лечении последствий гипоксического воздействия на мозг.

При изучении эндогенных механизмов толерантности обнаружено, что умеренное по силе и длительности упреждающее гипоксическое воздействие (т. н. гипоксическое прекондиционирование) повышает толерантность нервных клеток к патогенному воздействию последующих тяжелых форм гипоксии. В последнее десятилетие феномен и механизмы ишемической/гипоксической толерантности мозга интенсивно исследуются (Самойлов, 1999; Semenov et al., 2002; Tauskela and Morley, 2004; Rybnikova et al., 2006; Dirnagl and Meisel, 2008; Obrenovitch, 2008). Доказано существование быстрого и отсроченного механизмов гипоксической толерантности. Они формируются,

соответственно, в течение десятков минут или десятков часов после прекондиционирующего стимула. Изучение первого типа толерантности на срезах пириформной коры крысы выявило ведущую роль умеренной активации глутаматных рецепторов, прежде всего NMDA-типа, в инициации защитных механизмов, но остается неясным участие обоих известных подтипов ImGluRs (1 и 5) в таком феномене. Молекулярные механизмы долговременной толерантности и роль глутаматных рецепторов в ее запуске и/или развитии так же мало изучены, а литературные данные, полученные на разных объектах и моделях гипоксии/ишемии, противоречивы.

При изучении долговременной толерантности особый интерес представляют ImGluRs, так как их основная функция заключается в тонкой регулировке  $Ca^{2+}$  обмена в различных стрессовых ситуациях, что, возможно, определяет «выбор» адаптивного или патологического пути реагирования клетки на гипоксию. Противоречивым является характер участия mGluR1 и mGluR5 в формировании гипоксических состояний (Pellegrini et al., 2003). Обычно производится их дифференциальная оценка, поскольку эти подтипы имеют не одинаковую локализацию и различную роль в  $Ca^{2+}$ -опосредованной сигнализации.

Для изучения вклада ImGluRs в различные стадии формирования толерантности к гипоксии необходимо использовать хорошо изученные модели: аноксия *in vitro*, на которой показано изменение состояния  $Ca^{2+}$  системы в ответах на аноксические стимулы различной интенсивности (Самойлов, 1999; Семенов и др., 1999); гипобарическая гипоксия (ГГ) *in vivo*, на которой изучены поведенческие, кальциевые и генетические изменения в различных областях мозга крысы (Ватаева, 2004; Rybnikova et al., 2006, 2008, 2009).

**Цели и задачи исследования.** Целью настоящего исследования явилось изучение роли ImGluRs в развитии толерантности нейронов мозга к тяжелым формам гипоксии, индуцируемой прекондиционирующими гипоксическими воздействиями.

Основные задачи исследования:

1. Определение динамики содержания внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , вызываемой стимуляцией глутаматных рецепторов (NMDA, AMPA и ImGlu типов) их агонистами в срезах коры крыс, переживших умеренную, тяжелую и сочетанную ГГ *in vivo*.

2. Определение участия ImGluRs в индукции быстрой (1-2 часа) и долговременной (24 часа) толерантности в соответствующих моделях аноксии *in vitro* и ГГ *in vivo* путем применения антагонистов рецепторов в период прекондиционирования.

3. Определение участия mGluR1 и mGluR5 в феномене кальциевой перегрузки, вызываемом тяжелой аноксией *in vitro* путем применения антагонистов в период аноксии.

4. Определение методами иммуноцитохимии и иммуноблоттинга изменений в уровнях иммунореактивности белков mGluR1, mGluR5 и PLC $\beta$ 1 в препаратах коры и гиппокампа крыс, прекондиционированных умеренной ГГ.

***Основные положения, выносимые на защиту.***

1. ImGluRs-Ca<sup>2+</sup> сигнальная система через 24 часа после тяжелой и прекондиционирующей ГГ *in vivo* претерпевает сильные противоположно направленные изменения. Следствие тяжелой гипоксии - модификация сигнальной активности ImGluRs, приводящая к усилению эксайтотоксичности и патогенной перегрузке нейронов входящим внеклеточным Ca<sup>2+</sup>. Следствие прекондиционирующей гипоксии - формирование ImGluRs сигнализации адаптивной направленности с преобладанием мобилизации Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо. В патогенные механизмы, в основном, вовлечены, mGluR1, а в нейропротективные - mGluR5.

2. ImGluRs участвуют в *индукции* быстрой и *экспрессии* долговременной толерантности к гипоксии (на моделях аноксии *in vitro* и ГГ *in vivo*, соответственно). Долговременная толерантность характеризуется различающимися сдвигами в синтезе и внутриклеточном распределении двух подтипов ImGluRs: снижение экспрессии и изменение локализации mGluR1 предполагают уменьшение риска развития эксайтотоксичности; а перинуклеарная иммунореактивность обоих подтипов в пириформной коре и mGluR5 в гиппокампе обозначает усиление «Ca<sup>2+</sup> обеспечения» ядерной сигнализации, направленной на экспрессию адаптивных генов.

***Научная новизна.*** Впервые с использованием двух моделей гипоксического прекондиционирования (аноксия срезов коры *in vitro* и ГГ *in vivo*) проведено комплексное изучение участия ImGluRs в Ca<sup>2+</sup>- опосредованных сигнальных механизмах формирования быстрой и отсроченной толерантности нейронов мозга к гипоксии. Измерения Ca<sup>2+</sup> ответов переживающего среза мозга проводились в двух его внутриклеточных пулах (свободном и связанном), что позволяет с двух сторон оценивать его субклеточную локализацию и функциональную нагрузку в различных экспериментальных условиях. Мониторинг ImGluRs/Ca<sup>2+</sup> сигналов осуществлен по этой методике впервые.

Известно мало работ, проведённых на пириформной коре, хотя эта структура мозга высоко уязвима к гипоксическому воздействию и относится к достаточно древним функциональным образованиям, как и гиппокамп – основной объект в исследованиях гипоксии мозга. Данная работа проведена в основном на пириформной коре.

Новыми являются данные о паттернах экспрессии и локализации mGluR1, mGluR5 и PLC $\beta$ 1 в пириформной коре и гиппокампе, индуцируемых прекондиционирующей ГГ.

Впервые в ответе на это воздействие зарегистрирована перинуклеарная иммунореактивность ImGluRs, свидетельствующая об усилении  $Ca^{2+}$  опосредованных ядерных сигнальных механизмов, в том числе приводящих к экспрессии адаптивных генов.

***Теоретическая и практическая значимость работы.*** Работа посвящена исследованию одной из фундаментальных проблем нейробиологии - расшифровке эндогенных молекулярно-клеточных механизмов, обеспечивающих повышение устойчивости мозга к гипоксии/ишемии.

Совокупность полученных данных вносит существенный вклад в развитие современных представлений о феномене индуцируемой толерантности мозга, в целом, и об участии в нем ImGluRs –опосредованной сигнальной трансдукции, в частности.

В практическом плане исследование этой проблемы также представляется важным, поскольку позволяет развивать новые методы профилактики гипоксических и постгипоксических нарушений функций мозга. В этом плане перспективными представляются две стратегии: немедикаментозная стимуляция механизмов гипоксической толерантности и направленная фармакологическая модуляция ImGluRs.

Результаты диссертации дополняют представление о протективной эффективности модели ГГ, предполагаемой для введения в медицинскую практику в качестве новой немедикаментозной профилактической процедуры.

Материалы диссертации рекомендованы для ввода в курсы лекций: «Общая биология» (РГГМУ), «Принципы межклеточной и внутриклеточной сигнализации» (СПбГУ), «Актуальные проблемы нейробиологии» (РГПУ им. Герцена); «Регуляция внутриклеточных процессов» (СПбГПУ), и использованы в научно-инновационных разработках ООО «Локамед» в сфере спектрофотометрии.

***Апробация работы.*** Материалы исследования были представлены на XX Съезде физиологического общества им. И.П.Павлова. (Москва, 2007); 2-х Международных конгрессах Польского общества нейронаук (Краков, 2007; Варшава, 2009); Международных конференциях: «Медико-биологические аспекты действия физических факторов» (Минск, 2006), «Новые технологии коррекции ишемических и гипоксических состояний» (Минск, 2009), «Современные методы микроскопии в биологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2009), 13-ой Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пущино, 2009); Международном симпозиуме «Гипоксическое, ишемическое preconditionирование мозга» (Санкт-Петербург, 2008); Конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург, 2008); Межинститутской конференции молодых

ученых, посвященная 100-летию академика В. Н. Черниговского «Механизмы регуляции и взаимодействия физиологических систем организма человека и животных в процессах приспособления к условиям окружающей среды» (Санкт-Петербург, 2007).

По материалам диссертации с 2005 по 2009 года опубликовано 17 научных работ. Из них 15 тезисов и 2 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследований, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 162 страницах печатного текста, содержит 50 рисунков и 5 таблиц. Список литературы включает 428 источников.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Животные.** Работа выполнена на 206 взрослых крысах самцах линии Вистар массой 220-250 г. (из них 58 – составляли контрольные группы) с соблюдением требований комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им И.П. Павлова РАН.

Объектами исследования были высоко чувствительные к гипоксии отделы головного мозга крыс: пириформная кора и гиппокамп.

**Гипобарическая гипоксия in vivo.** Подопытных животных подвергали воздействию ГГ в декомпрессионной камере проточного типа в одном из трех режимов. 1. Однократную тяжелую гипобарическую гипоксию (ТГГ) длительностью 3 часа создавали путем разрежения воздуха до 180 ммНг, эквивалентного подъему на высоту 11000 м над уровнем моря. 2. Трехкратная (раз в сутки по 2 часа) умеренная гипобарическая гипоксия (УГГ) достигалась разрежением воздуха до 360 ммНг, эквивалентным подъему на высоту 5000 м над уровнем моря. Именно этому режиму далее соответствуют термины «прекондиционирующая гипоксия» или «УГГ». 3. Последовательное воздействие УГГ и ТГГ с 24 часовым интервалом между ними. Контрольные группы животных, не подвергавшиеся гипоксическому воздействию, проходили соответствующие процедуры пребывания в барокамере. Через сутки после ТГГ или последнего сеанса УГГ мозг животных извлекали для последующих исследований ex vivo или in vitro.

### **Исследования на переживающих срезах пириформной коры мозга крыс.**

***Приготовление и инкубация переживающих срезов мозга.*** После декапитации участки головного мозга, содержащие пириформную кору, иссекали из обоих полушарий и фиксировали в камере вибротома EMS-4000 (Electron Microscopy Sciences, USA), где

приготавливали тангенциальные срезы коры толщиной 400 мкм. Подготовительные процедуры проводили максимально быстро в присутствии преинкубационной среды, охлажденной до 4-6°C. Срезы помещали в специальную камеру с проточным инкубационным раствором следующего состава (в мМ): 124 NaCl, 5 KCl, 2.6 CaCl<sub>2</sub>, 1.24 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 3 NaHCO<sub>3</sub>, 10 глюкоза и 24 tris-HCl при pH 7.3 и температуре 37.5°C.

**Флуориметрия внутриклеточного кальция.** Для определения динамики содержания кальция Ca<sup>2+</sup>, связанного с гидрофобными доменами белковых и липидных внутриклеточных структур (Ca-b), применяли хлортетрациклиновый (ХТЦ) флуоресцентный индикатор (Sigma, USA) и контактный микроскоп ЛЮМAM-K (ЛОМО, Россия), с осветителем, оснащенным светодиодами L2523UVC (Kingbright, Hong Kong), и оптоволоконным спектрометром AvaSpec-2048 (Avantes BV, Netherlands). При этом квантовый выход флуоресценции измеряли в микроучастках срезов (100 мкм) в спектральной области с максимумом 522 нм, возбуждаемой облучением с пиковой длиной волны 396 нм (Беляков, 2007). Для определения динамики содержания свободного внутриклеточного кальция (Ca-f) применяли флуорохром fura-2AM (Molecular Probes, USA) и спектрофлуориметр Hitachi F-2000 (Hitachi, Japan). Расчетной характеристикой изменений уровня Ca-f служило отношение флуоресцентных сигналов с максимумом 510 нм, полученных при возбуждающих облучениях с длинами волн 340 нм и 380 нм (Semenov et al., 2002). Все измерения флуоресценции проводили с 5-мин интервалами при стабильной длительности возбуждения флуоресценции. Изменения уровней флуоресценции Ca-b или Ca-f, вызванные агонистами глутаматных рецепторов (Ca-b или Ca-f ответы), представлены в работе либо в динамической форме (графики с дискретностью абсцисс 5 мин), либо в интегральной форме (суммы ординат ответов), в интервале времени от начала аппликации агониста до 40 мин (для NMDA – 30 мин) его отмыва.

**Аноксия in vitro.** Аноксию использовали как тестовое воздействие для определения нейропротективного или патологического эффектов антагонистов рецепторов, вводимых в систему in vitro либо животным in vivo. Её создавали заменой перфузионного раствора с O<sub>2</sub> - содержащего на N<sub>2</sub> – содержащий и сменой обдувающего газа с O<sub>2</sub> на N<sub>2</sub>. При реоксигенации O<sub>2</sub> - снабжение срезов восстанавливали обратными манипуляциями.

**Применение агонистов и антагонистов глутаматных рецепторов.** Для неселективной стимуляции всего пула глутаматных рецепторов в срезе применяли 2 мин Аппликацию раствора L-глутамата натрия (L-Glu, ICN Biomedicals Inc., USA) в конечной концентрации 50 мкМ. Для селективной стимуляции отдельных типов глутаматных рецепторов применяли: для NMDAR - N-метил-D-аспартат (NMDA, Sigma, USA) в



конечной концентрации 100 мкМ в безмагниево, глицин содержащем растворе в течение 15; для AMPAR - альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолепропионат (AMPA Sigma, USA) в конечной концентрации 50 мкМ в течение 2 мин; для метаботропных глутаматных рецепторов первой группы (ImGluRs) - S(3-5)-дигидрокси-фенилглицин (DHPG, Sigma, USA) в конечной концентрации 100мкМ в течение 2 мин. Все агонисты апплицировали двукратно с интервалом 40-45 мин.

Для блокады 1 и 5 подтипов ImGluR в срезах мозга применяли постоянную аппликацию соответствующих селективных антагонистов либо (+)2-метил-4-карбоксифенилглицин (LY367385, Sigma, USA), либо 6-метил-2-(фенилэтил)пиридин (MPEP, Merz, Germany), соответственно, которые вводили в инкубационную среду в конечной концентрации 25 мкМ за 45 мин до начала аноксии. Для неселективной блокады ImGluR в эксперименте с прекондиционирующей 2 минутной аноксией использовали постоянную аппликацию (S)-аметил-4-карбоксифенилглицин (MCPG, Merz, Germany) в конечной концентрации 500мкМ непосредственно перед прекондиционирующей аноксией.

В ряде опытов с УГГ животным внутрибрюшинно вводили антагонисты 1 или 5 подтипов ImGluR в дозе 5мг/кг за 15 мин перед помещением в барокамеру или через 10 мин после завершения УГГ сессии. Использовали неконкурентные антагонисты (3-этил-2-метил-квинолин-6-ил)-(4-метокси-циклогексил)-метанолметансилфонат (EMQMCM, Merz, Germany) и 6-метил-2-(фенилэтил)пиридин (MPEP, Merz, Germany), для 1-го и 5-го подтипов, соответственно.

### **Иммунохимический анализ материала**

**Иммуноблоттинг.** Ткань пириформной коры и гиппокампа из обоих полушарий мозга контрольной и УГГ группы крыс была гомогенизирована в буфере, содержащем Neres (5мМ), Сахарозу (0,32М), PMSF (100мкМ) и коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, USA), с использованием стеклянного гомогенизатора. После определения количества белка каждая проба (50мкг) была разделена электрофорезом в 4-10% SDS полиакриламидном геле и перенесена на нитроцеллюлозную мембрану. Основные этапы метода: 1) инкубация в первичных кроличьих антителах mGluR1 (1:1000, Sigma, USA) или GluR5 (1:2000, UpState, USA) или PLC $\beta$ 1 (1:200, Santa-Cruz, USA) с использованием смеси TBS/Tween-20/сухое молоко 5% (TBST/M5%). Применяли контроль с  $\beta$ -актином (1:100, Sigma); 2) инкубация в TBST/M2% с поликлональным вторичным антителом, конъюгированным с щелочной фосфатазой (1:5000, Sigma, USA); 3) Визуализация реакции с использованием щелочного фосфатазного субстрат-набора III (kit III, Vector Lab. Inc., USA). Мембраны сканировали с использованием ImageScanner III (GE Healthcare BioSciences, Sweden). Для определения

иммунореактивности PLC $\beta$ 1 в безъядерной фракции гомогенаты центрифугировали с последующим отделением супернатанта.

***Иммуноцитохимия.*** Образцы ткани мозга от животных контрольной и УГГ групп фиксировали в 4% параформальдегиде, приготовленном на 0,1М фосфатном буфере (РН 7.4), в течение 24 часов и подвергали гистологической обработке по стандартному протоколу. Далее изготавливали серии чередующихся парафиновых фронтальных срезов мозга толщиной 7 мкм (-2.80 мм от линии bregma) и переносили их на предметные стекла. Основные этапы метода: 1) инкубация с поликлональными кроличьими антителами к mGluR1 или mGluR5 (1:100, AbCam, UK); 2) инкубация с вторичными биотинилированными антителами (1:200); 3) инкубация с комплексом авидина с биотинилированной пероксидазой (1:100, ABC, Vector Laboratories, USA); 4) визуализация реакции с помощью диаминобензидина. Препараты анализировали под световым микроскопом Jenaval (Carl Zeiss, Germany) при 25х увеличении, и фотографировали цифровой камерой Baumer CX05c (Baumer Optronic, Germany).

#### **Математическая обработка данных.**

Все данные представлены в виде среднего  $\pm$  ошибка среднего и обработаны с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с применением Dunnett-теста. Достоверность различий определяли с вероятностью ошибки  $p < 0,02$  для Ca<sup>2+</sup> ответов и  $p < 0,05$  для данных иммуноблоттинга и иммуноцитохимии.

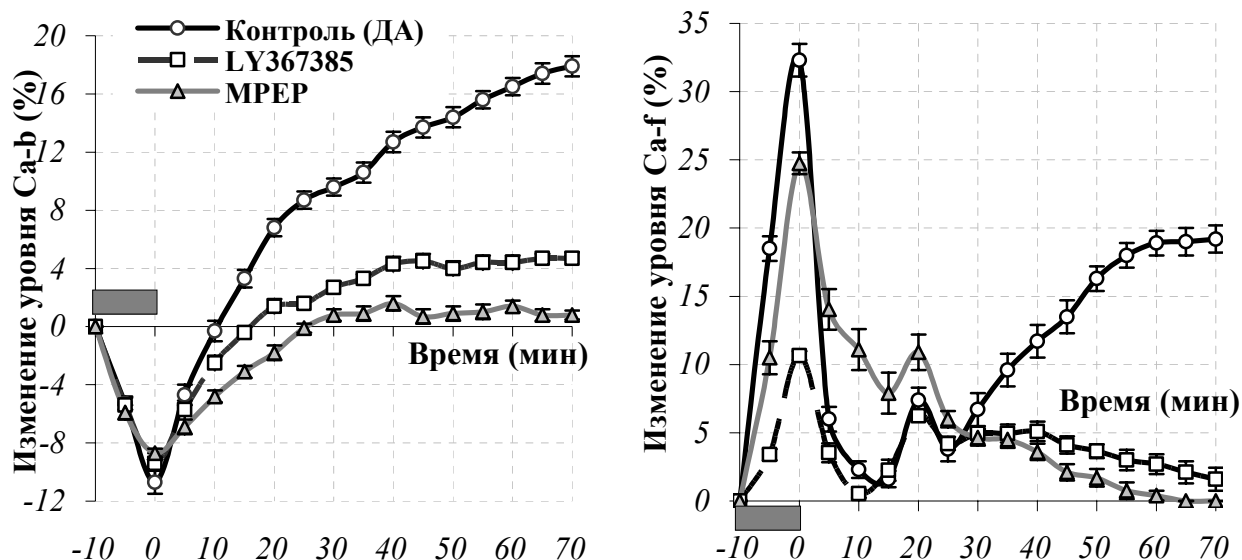
Данные, полученные методом иммуноблоттинга, обработаны в программе ImageJ MacBiophotonic и представлены в процентах к контрольному уровню. Для проверки достоверности результатов проводился дополнительный обсчет данных с нормировкой по уровню иммунореактивности  $\beta$ -актина в пробе, где в качестве понижающего «удельного» веса нормировки был выбран коэффициент 2. Денситометрию и математическую обработку иммуноцитохимических микроизображений проводили с помощью программ PhotoM 1.21 (A. Chernigovskii) и ImageJ MacBiophotonic (National Institutes of Health, USA) с учетом специально-разработанной системы референсов.

## ***РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ***

### **ImGluRs в быстрых патологических и адаптивных ответах**

**ImGluRs в феномене кальциевой перегрузки.** Срезам пириформной коры предъявляли долговременную (10 мин) аноксию (ДА), вызывающую, как ранее установлено (Semenov et al., 2000), значительное повышение уровня внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> (феномен кальциевой перегрузки - КП). На фоне аппликации антагонистов mGluR1 или mGluR5, произведенной

за 40 минут до ДА, было отмечено достоверное подавление феномена КП как по свободному ( $n=4$ ), так и по связанному  $\text{Ca}^{2+}$  ( $n=7$ ). При этом динамика Ca-f показала, что аноксическая фаза КП значительно сильнее подавлялась в случае блокады mGluR1, чем при блокаде mGluR5, что может говорить об их различном участии в путях потенциации  $\text{Ca}^{2+}$  входа и высвобождения (рис.1).

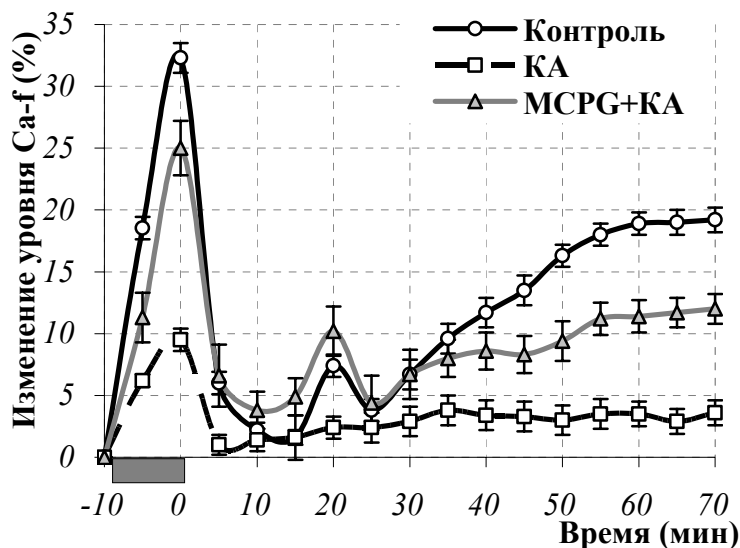


**Рис. 1** Влияние антагонистов mGluR1 (LY367385) и mGluR5 (MPEP) ( $n=4-7$ ) на изменения уровня Ca-b (слева) и Ca-f (справа), индуцируемые 10-мин. аноксией и последующей реоксигенацией срезов коры. Прямоугольниками отмечен период аноксического воздействия.  $n=4-7$ .

Приведенный результат указывает на участие обоих подтипов ImGluR в формировании срочного патологического ответа на тяжелую аноксию *in vitro*, однако на основании данных о действии антагонистов (Lea et al., 2005, 2006) предполагается меньшее прямое участие mGluR5 в феномене КП. Таким образом, подтверждается обсуждавшаяся в литературе (Meli et al., 2002; Moroni et al., 2002) возможность использования антагониста mGluR1 в качестве нейропротектора при гипоксических/ишемических состояниях. При этом в виду не прямого, но модуляционного эффекта mGluRs на состояние iGluRs, есть основание ожидать отсутствия известных нейродегенеративных последствий прямого антагонизма iGluRs (Buchan et al., 1991; Rothman and Olney, 1995). Обнаруженные нами депрессивные эффекты антагонизма ImGluRs на postanоксическую КП, подобны ранее полученным на этой модели эффектам прекодиционирования *in vitro* с использованием 2-мин. аноксии за 70 мин. до ДА (Самойлов и др., 2000).

**ImGluRs в быстрых механизмах толерантности.** Для проверки гипотезы о том, что ImGluRs вовлечены в формирование не только патологических процессов, вызываемых ДА, но и быстрых механизмов толерантности, индуцируемых прекодиционированием, на

срезах коры применяли неселективный антагонист ImGluRs MCPG (n=6), который апплицировали непосредственно перед прекондиционирующей (2 мин) аноксией. В результате, КП, обычно не развивавшаяся у прекондиционированных срезов, вновь проявлялась (рис. 2).



**Рис. 2** Динамика Ca-f ответов контрольных (контроль) и прекондиционированных краткосрочной аноксией (КА) срезов коры на долговременную аноксию (10 мин). Влияние MCPG, апплицированного во время КА на эффект прекондиционирования (MCPG+KA). Прямоугольником отмечен период аноксического воздействия. n=6.

Таким образом, вызванный антагонистом эффект «декондиционирования», указывает на то, что ImGluR вовлечены в индукцию быстрых нейропротективных механизмов гипоксического прекондиционирования, препятствующего развитию эксайтотоксичности, вызываемой тяжелой аноксией. Сходный эффект блокады быстрой толерантности был ранее показан на такой же модели при использовании антагонистов NMDARs (Semenov et al., 2002). Возможно, сам феномен прекондиционирующего воздействия подразумевает умеренную активацию всей системы глутаматергической трансдукции и требует синергетической активности рецепторов, как это в частности продемонстрировано в механизме двухрецепторной активации сигнального комплекса NMDAR-PSD95-Homer1b/c-mGluR5, необходимой для последующей экспрессии c-fos (Yang 2004).

### GluRs в долговременных процессах, индуцируемых ГГ.

**GluR/Ca<sup>2+</sup> сигнализации при формировании долговременных патологических и адаптивных процессов индуцированных ГГ in vivo.** В экспериментах с предъявлением крысам ГГ in vivo, тяжелой (ТГГ) или умеренной (УГГ), выявлено, что через 24 часа после ТГГ (n=32) или УГГ (n=40) существенно изменяются в сравнении с контролем (n=38) Ca-b ответы как на неселективную стимуляцию глутаматных рецепторов в срезах коры с помощью L-Glu (n=6-9), так и на применение селективных агонистов NMDA- (n=7-9), AMPA- (n=7-8) и ImGlu- (n=7-8) рецепторов. В частности: 1) Отмечено уменьшение свойственной контрольным срезам десенситизации на повторную аппликацию AMPA и L-Glu с более заметным эффектом в ТГГ группе. В этой группе, кроме того, обнаружено

снижение первого ответа на AMPA. 2) Показано снижение обоих ответов на NMDA после ТГГ, но их увеличение после УГГ. 3) Реакция на DHPG в срезах ТГГ группы, по сравнению с контролем, была усилена в 3-4 раза по абсолютной величине, как для первого, так и второго Ca-b ответов, но при этом инвертирована по направлению. В то же время в УГГ группе реакция сохраняла свою направленность, но так же была усилена в 3-5 раз.

Сравнительный анализ динамики Ca-b и Ca-f через 24 часа после УГГ позволяет считать, что вход  $Ca^{2+}$  в клетку, опосредованный NMDA стимуляцией, полностью компенсируется его связыванием, что проявляется усилением Ca-b, но не Ca-f ответов. При аппликации AMPA, очевидно, такой компенсации не происходит, т.к. увеличивались оба  $Ca^{2+}$  пула. С другой стороны, DHPG в контрольной и УГГ группах вызывал снижение уровня Ca-b отражающее его высвобождение из внутриклеточных депо, что сопровождалось закономерным временным увеличением Ca-f.

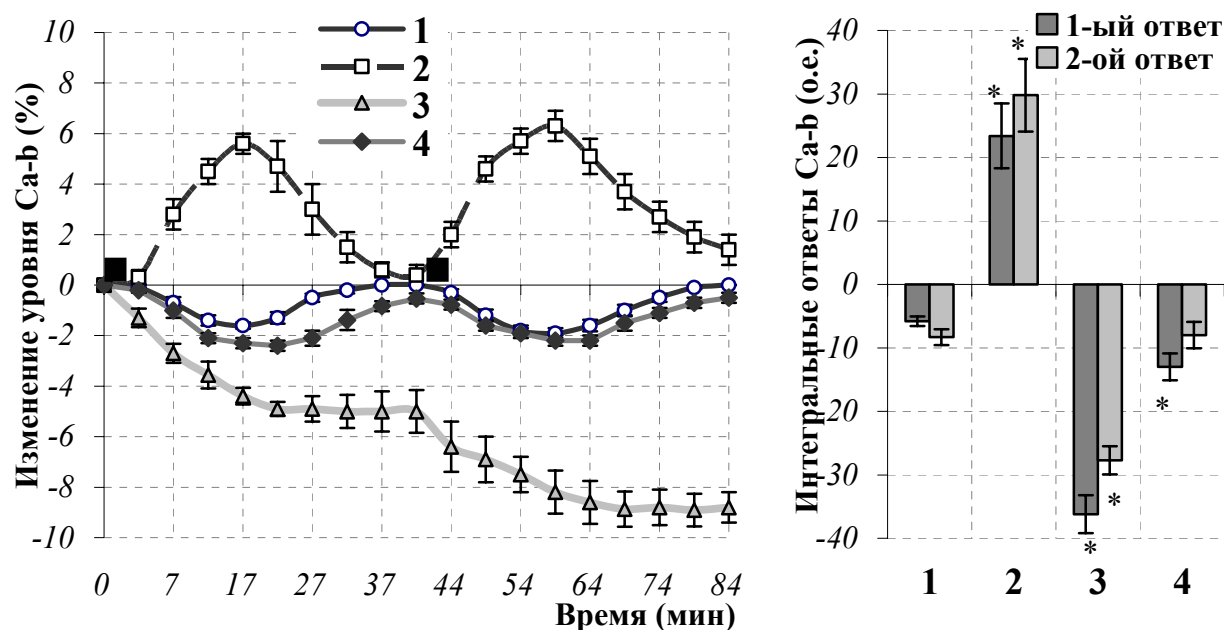
Срезы прекондиционированных животных, подвергнутых ТГГ (группа УГГ+ТГГ, n=16), демонстрируют практически нормальные ответы на стимуляцию как iGluRs так и ImGluRs, хотя ответ на L-глутамат по-прежнему превышал контрольные значения. Очевидно, реакция на неселективный агонист не является простой суммой ответов на селективную стимуляцию рецепторов, а представляет процесс, включающий взаимодействие нескольких коактивированных глутаматергических (и не только) сигнальных систем.

Количественные изменения, происходящие в  $Ca^{2+}$  ответах на агонисты в следствие УГГ, ТГГ или УГГ+ТГГ, приведены в интегральной форме в таблице 1. (**табл. 1**). Для более полной характеристики модификаций ImGluRs/ $Ca^{2+}$  сигнализации на рис. 3 отдельно приведены Ca-b ответы на аппликацию DHPG в динамической и интегральной форме для срезов всех экспериментальных групп (**Рис.3**).

В отношении ImGluRs представляется правомочным предположение о том, что УГГ и ТГГ по-разному модулируют паттерн реакций их сигнальных систем: в первом случае - в направлении преобладающего в норме IP3 зависимого высвобождения внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , вероятно, с его адаптивной направленностью на усиление транскрипционной активности, а во втором - в направлении потенциации iGluRs и входа экстраклеточного  $Ca^{2+}$  с последующим захватом его митохондриями. Используя литературные данные о прямой соэкспрессии IP3R с mGluR5 и реципрокной - с mGluR1 (Fotuhi et al., 1993), а также о вовлечении именно mGluR5 в ряд адаптивных внутриклеточных каскадов (Mao and Wang, 2002, 2003; Mao et al., 2005, 2008; Yang and Mao, 2004), предполагаем, что в УГГ и ТГГ индуцированных состояниях участвуют преимущественно 5-ый и 1-ый подтипы, соответственно.

Агонист	№ ответа	Контроль		УГГ		ТГГ	УГГ+ТГГ
		Ca-b	Ca-f	Ca-b	Ca-f	Ca-b	Ca-b
L-Glu	1-й	35.8±1.1	19.0±0.9	52.4±1.7 (*)	26.3±2.2 (*)	49.3±3.9 (*)	43.7±3.5 (*)
	2-й	11.3±0.7	5.6±0.2	17.0±1.5 (*)	14.5±1.9 (*)	33.4±4.1 (*)	32.2±2.9 (*)
NMDA	1-й	37.0±2.5	20.1±1.3	49.8±1.8 (*)	20.1±2.5	33.1±2.8	36.6±2.8
	2-й	26.1±1.8	18.7±0.9	42.0±2.0 (*)	18.2±1.1	10.8±3.7 (*)	22.0±3.8
AMPA	1-й	32.0±2.7	19.0±1.6	28.4±0.9	20.0±2.1	22.7±2.4 (*)	29.3±2.7
	2-й	5.9±0.8	6.0±1.2	20.0±1.6 (*)	17.4±1.8 (*)	19.0±2.7 (*)	5.4±2.0
<b>DHPG</b>	<b>1-й</b>	<b>-5.8±0.7</b>	<b>8.1±0.6</b>	<b>-36.2±3.0 (*)</b>	<b>44.4±1.4 (*)</b>	<b>23.4±5.1 (*)</b>	<b>-13.0±2.1 (*)</b>
	<b>2-й</b>	<b>-8.3±1.2</b>	<b>2.2±0.7</b>	<b>-27.7±2.2 (*)</b>	<b>11.8±2.0 (*)</b>	<b>29.8±5.7 (*)</b>	<b>-8.0±2.1</b>

**Табл. 1.** Значения интегральных  $Ca^{2+}$  ответов на первую и повторную аппликации агонистов глутаматных рецепторов для четырех групп животных: контрольных (контроль), перенесших умеренную или тяжелую гипобарическую гипоксию (УГГ и ТГГ соответственно), и перенесших комбинированное воздействие (УГГ+ТГГ). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. (\*) – достоверные отличия от соответствующих контрольных значений ( $p < 0,02$ ),  $n=6-9$ .



**Рис. 3** Динамика (слева) и интегральное представление (справа) ответов  $Ca^{2+}$  на первую (0-2 мин) и повторную (42-44 мин) аппликации DHPG на срезы коры мозга контрольных животных (1), животных перенесших ТГГ (2), УГГ (3) и УГГ+ТГГ (4). Прямоугольниками отмечены периоды аппликаций DHPG. (\*) – достоверные отличия от соответствующих контрольных значений ( $p < 0,02$ ).  $n=7-8$

**ImGluRs в индукции долговременной толерантности.** Использовали селективные антагонисты mGluR1 (EMQMCM) и mGluR5 (MPEP), вводимые крысам в периоды сеансов

УГГ. Анализировали динамику Ca-f ответов на ДА в срезах 5 групп прекондиционированных животных (n=5 в каждой). Тестовое применение ДА через 24 часа после последней прекондиционирующей сессии выявило, что во всех группах животных, после фармакологического воздействия, долговременная толерантность, выражавшаяся обычно в подавлении КП, формировалась так же, как и в группе, подвергнутой УГГ без антагонистов. Эти результаты указывают на то, что ни mGluR1, ни mGluR5 по отдельности, вероятно, не участвуют в индукции механизмов долговременной толерантности в используемой модели. Хотя можно предположить (и следует проверить), что одновременная блокада обоих подтипов окажется более эффективной в элиминации эффектов прекондиционирования.

Ранее нами на этой же модели был получен аналогичный «отрицательный» результат при использовании антагониста NMDARs – мемонтин (данные не опубликованы). На основании полученных данных можно отметить, что мнения исследователей о вовлечения или не вовлечения глутаматных рецепторов в механизмы *индукции* долговременной толерантности разделяются в зависимости от используемой модели прекондиционирования. Если первые использовали ишемические модели (Kato et al., 1992; Raval et al., 2003; Werner et al., 2007), то вторые – гипоксические (Gage and Stanton, 1996; Gidday et al., 1999).

**mGluRs в экспрессии долговременной толерантности.** Для выявления роли mGluR1 и mGluR5 в процессах *экспрессии* долговременной толерантности оценивали изменение количества белков этих рецепторов у крыс к 24 часам после УГГ в пириформной коре и гиппокампе.

**Иммуноблоттинг.** Анализ гомогенатов мозга показал, что по сравнению с контролем (n=6) в коре прекондиционированных животных (n=6) уровень белка mGluR5 заметно не изменился, а mGluR1 - был снижен на 11%; при этом в гиппокампе уровень mGluR5 был достоверно увеличен на 10%, а mGluR1 имел недостоверную тенденцию к снижению (рис.4).

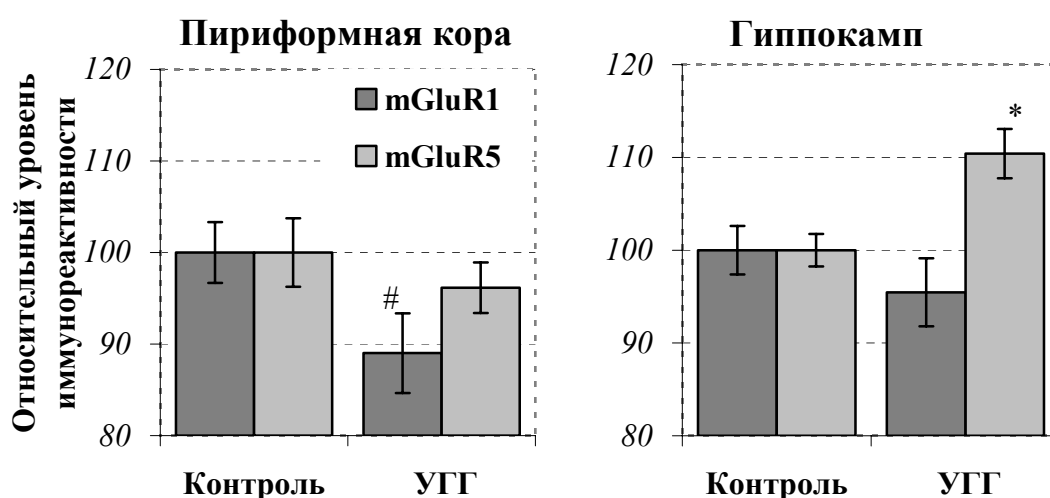
Надо указать на количественное преобладания 5-ого подтипа в гиппокампе и, возможно, меньшую чувствительность метода к общему снижению 1-ого (Ferraguti and Shigemoto, 2006).

Метод обсчета с нормировкой по  $\beta$ -актину в коре подчеркнул снижение mGluR5 и выявил достоверность снижения mGluR1; при этом увеличение mGluR5 в гиппокампе было определено как 15%.

Эти данные указывают на преобладание экспрессии mGluR5 над mGluR1 в обоих мозговых образованиях прекондиционированных животных: в коре это менее выражено на

фоне общего снижения иммунореактивности ImGluRs, а в гиппокампе проявляется в форме повышения уровня mGluR5.

Изменения в количественном соотношении двух подтипов ImGluRs в пользу mGluR5 коррелируют с нашим допущением об усилении IP3-опосредованного сигнала по отношению к потенциации входа экстраклеточного Ca<sup>2+</sup>. Однако возможны и различия в преобладающем механизме ImGluRs-регуляции в гиппокампе и пириформной коре. Обращаясь к данным об усилении, но не инверсии Ca<sup>2+</sup> ответов на DHPG (как после ТГГ) мы предполагаем комплексный механизм, включающий помимо изменений в количестве ImGluRs, модификацию их локализации и структуры сигнальных путей (Mikoshiba, 2007; Devogelaere et al., 2008; Kammermeier, 2008).



**Рис. 4** Относительный уровень иммунореактивности белков mGluR1 и mGluR5 в пириформной коре (слева) и гиппокампе (справа) мозга контрольных и прекодиционированных (УГГ) животных. Гистограммы и доверительные интервалы построены по данным без нормировки по β-актину. (\*) – достоверные отличия от соответствующих контрольных значений (p<0,05). Дополнительно: # - отмечен столбец, в котором появилась достоверность при нормировке. n=6-7.

**Иммуноцитохимия.** Иммуноцитохимически анализировалось (n=6-7 для каждой группы) распределение иммунореактивных микроучастков, содержащих подтипы ImGluRs между слоями пириформной коры и субклеточными доменами ее второго слоя. Отмечено некоторое «смещение» иммунореактивности mGluR1 от 2-го к 3-му слою. Вместе с тем значительное усиление иммунореактивности обоих подтипов проявилось в околядерной области клеток второго слоя коры (**табл. 2**). Хотя в топографических атласах такая локализация рецепторов как правило не отображается, недавние работы указывают на присутствие обоих подтипов ImGluRs на ядерной мембране нейронов стриатума и коры (O'Malley 2003, Jong 2005, 2007), где они могут регулировать G белок/PLC/IP3 связанную Ca<sup>2+</sup> сигнализацию (Kumar 2008).



Белок, группа область	mGluR1		mGluR5	
	Контроль	УГГ	Контроль	УГГ
<b>1</b>	106,5±1,9	106,5±1,9	107,4±2,5	106,8±3,6
<b>2</b>	101,0±0,7	96,4±0,9 (*)	99,0±1,2	98,5±0,7
<b>3</b>	92,5±1,2	97,1±1,7 (*)	93,6±1,6	94,7±3,2
<b>Н (2)</b>	73,5±3,1	<b>111,4±6,0 (*)</b>	81,8±3,2	<b>135,8±10,3 (*)</b>
<b>П (2)</b>	109,7±1,6	115,1±3,3	115,0±3,5	124,4±8,1

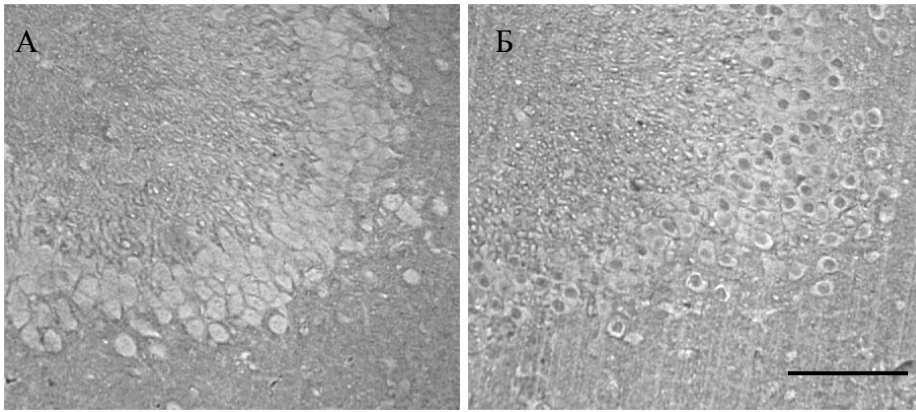
**Таб. 2** Уровни иммунореактивностей mGluR1 и mGluR5 в пириформной коре мозга контрольных (Контроль) и прекондиционированных (УГГ) крыс. 1, 2, 3 – нейропилы 1-ого, 2-ого, 3-его слоев коры соответственно; Н(2) – нуклеолеммная область клеток; П(2) – область плазмолеммы клеток и межклеточных областей второго слоя. (\*) – достоверные отличия от соответствующих контрольных значений ( $p < 0,05$ ).  $n=6$ .

Дополнительный анализ изображений показал, что общая иммунореактивность коры УГГ животных не менялась относительно соответствующих значений в контроле, что с учетом увеличения составляющей нуклеолеммной иммунореактивности может означать фоновое снижение иммунореактивности в других корковых областях. Можно предположить, что данные иммуноблоттинга точнее отражают изменения общего числа рецепторов (снижение), в то время как иммуноцитохимия демонстрирует напавленность их локализации.

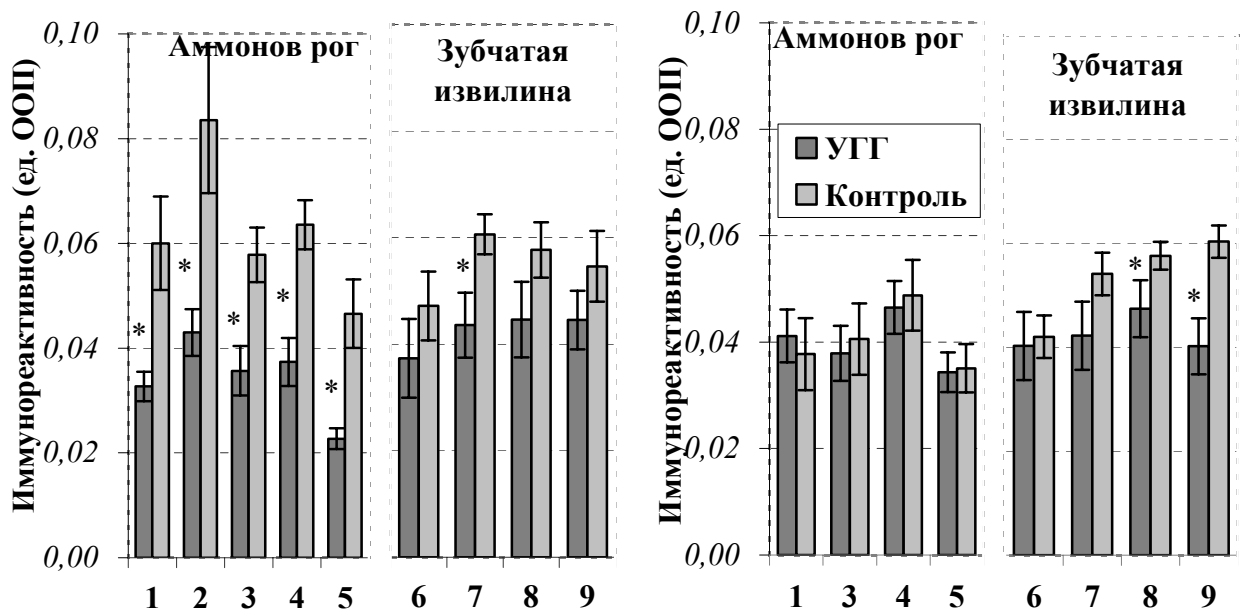
По-видимому, в патологических или адаптационных механизмах местоположение ImGluRs может меняться не только с дендритного/аксонального на соматическое, как это сообщалось ранее (Roche et al., 1999; Ango et al., 2000; Kammermeier, 2006, 2007; Das and Banker 2006), но и с плазмолеммного на нуклеолеммное. При этом инициируется экспрессия новых субъединиц рецепторов либо механизмов их транспорта и релокализации.

На гиппокампе нами получены аналогичные результаты, но с более выраженной разницей между подтипами рецепторов. Отчетливая ядерная локализация рецепторов у прекондиционированных животных ( $n=6$ ) зафиксирована только для mGluR5 подтипа (**рис.5**), причем подобная реактивность проявилась и в пирамидальных клеточных слоях CA1, CA3, CA4, и в гранулярных клетках зубчатой извилины.

Вместе с тем в дендритных/аксональных областях гиппокампа отмечено заметное снижение экспрессии ImGluRs у прекондиционированных животных, причем различное в разных областях для подтипов mGluR1 и mGluR5. Сильное снижение иммунореактивности mGluR1 отмечено в областях CA1 и CA3, особенно ярко выраженное в слое интернейронов so/sa и в ориентальном слое CA3. В отличие от mGluR1, экспрессия mGluR5 была снижена значительно меньше и не в области Амонового рога, а в зубчатой извилине и CA4. (**рис.6**).



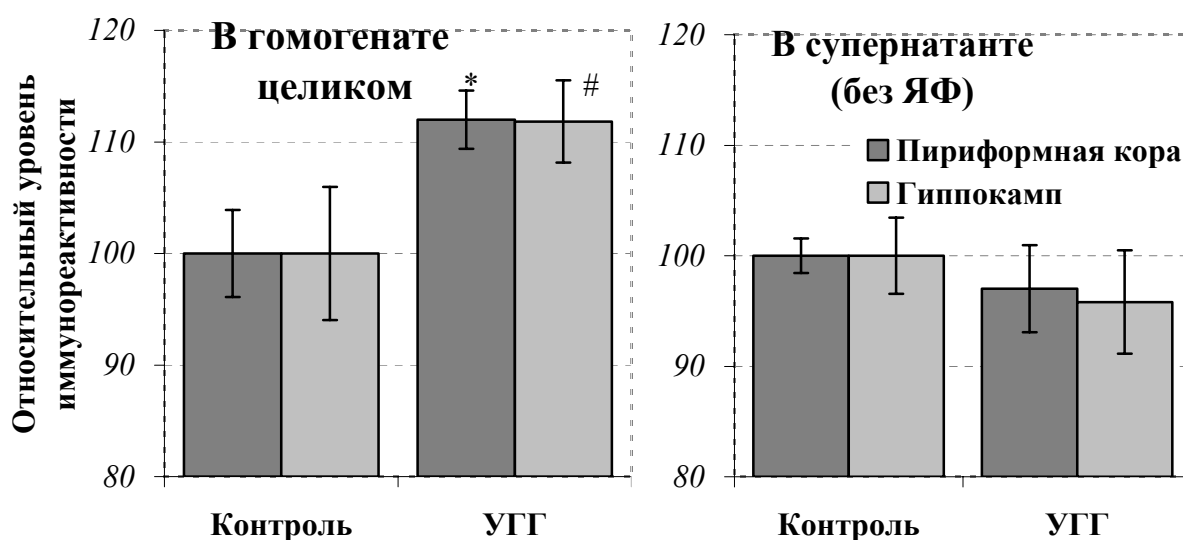
**Рис. 5**  
 Микрофотографии области СА3 гиппокампа контрольных (А) и прекондиционированных УГГ (Б) крыс. Иммунореактивность mGluR5. Масштаб: 100 мкм.



**Рис.6** Иммунореактивность mGluR1 (слева) и mGluR5 (справа) в различных областях гиппокампа (логарифмы относительной оптической плотности). 1) CA1-so (ориентальный слой), 2) CA1-so/sa (слой olveus/alveus), 3) CA1-sr (радиальный слой), 4) slm (губчатомолекулярный слой), 5) CA3-so (дендритный слой), 6) DG-hilus (полиморфный слой), 7) CA4-dendr (дендритный слой), 8) DG-mo (молекулярный слой), 9) CA4-MS (плазмалемма и межклеточные области). (\*) – достоверные отличия от соответствующих контрольных значений ( $p < 0,05$ ).  $n=6$ .

Снижение mGluR1 экспрессии в дендритных областях Амонова рога и одновременное увеличение mGluR5 в телах клеток этой же области, видимо оказывает нейропротективный эффект разными путями. Один из них, вероятно, - снижение mGluR1 опосредованной даун-регуляции ГАВА-ергических претерминалей (Marino et al., 2001), второй - усиление mGluR5 опосредованной сигнализации через PI3-K/Akt и  $Ca^{2+}$ /CaMK пути (Maiese and Chong 2005), связанные с фосфорилированием транскрипционных факторов, таких как CREB и nF-κB (Jong et al., 2005; O’Riordan et al., 2006).

**Влияние УГГ на экспрессию белков PLCβ1.** Возможный кандидат на модуляцию  $Ca^{2+}$ -гомеостаза со стороны ImGluR - фосфолипаза C (PLC), как ключевой энзим ImGluRs-сигнальных путей. Методом иммуоблоттинга мы проанализировали изменение уровня PLCβ1 у прекондиционированных животных (n=6) по сравнению с контролем (n=7) в целом гиппокампе и пириформной коре и отдельно в ядерной фракции этих областей мозга (рис.7). Показано, что суммарный уровень PLCβ1 достоверно увеличился у прекондиционированных животных как в гиппокампе (достоверность при нормировке по β-актину), так и в коре, в то время как в супернатанте, лишенном ядерной составляющей, уровень заметно не изменился. Следовательно, PLCβ1 была экспрессирована и локализована именно в ядерной фракции. В свете наших данных, указывающих на ядерную локализацию ImGluRs после УГГ, усиление PLCβ1-пути так же объясняет усиление  $Ca^{2+}$  ответов на стимуляцию рецепторов и еще раз выявляет нейропротективную функцию ImGluRs, выполняемую в реализации программы долговременной толерантности.



**Рис. 7** Относительный уровень иммуореактивности PLC β1 в полном гомогенате (слева) и PLC β1 в супернатанте с удаленной ядерной фракцией (справа) в пириформной коре и гиппокампе у контрольных и прекондиционированных (УГГ) животных. Гистограммы и доверительные интервалы построены по данным без нормировки по β-актину. (\*) – достоверные отличия от соответствующих контрольных значений (p<0,05). Дополнительно: # - отмечен столбец, в котором появилась достоверность при нормировке. n=6-7.

## **ВЫВОДЫ**

1. Гипобарическая гипоксия повреждающей и preconditionирующей модальности различным образом сказывается на отсроченных изменениях состояния глутаматергической системы трансдукции в целом, и на активности отдельных типов глутаматных рецепторов (NMDARs, AMPARs, ImGluRs), в частности.

2. Стимуляция ImGluRs через 24 часа после ТГГ *in vivo* вызывает в коре мозга 4-кратно усиленное по амплитуде и инвертированное по направленности изменение уровня связанного  $Ca^{2+}$ , в то время как после preconditionирующей гипоксии  $Ca^{2+}$  ответ был также усилен, но не инвертирован. Это дает основание говорить, что патологическое состояние сопровождается ImGluRs-опосредованной потенциацией входа экстраклеточного  $Ca^{2+}$  с последующим митохондриальным его захватом, а адаптивное состояние характеризуется усилением ImGluRs-опосредованным высвобождением  $Ca^{2+}$  и возможным усилением  $Ca^{2+}$  зависимой транскрипционной активности.

3. Предполагается преимущественно патогенная направленность активности mGluR1 и протективная - mGluR5, о чем свидетельствует то, что 1) mGluR1 в большей степени вовлечены в формирование патологической кальциевой перегрузки создаваемой аноксией *in vitro*, чем mGluR5 и 2) у preconditionированных животных (УГГ) *in vivo* обнаружено преобладание экспрессии mGluR5 над mGluR1 в обоих мозговых образованиях: в коре на фоне общего снижения иммунореактивности ImGluRs, а в гиппокампе в форме повышения уровня mGluR5.

4. ImGluRs вовлечены в индукцию быстрых, но не медленных механизмов гипоксической толерантности мозга, формируемых в моделях аноксии *in vitro* и УГГ *in vivo*, соответственно, о чем свидетельствуют результаты экспериментов с использованием антагонистов рецепторов.

5. ImGluRs участвуют в реализации программы долговременной толерантности. Лежащий в основе механизм включает модификацию их  $Ca^{2+}$  опосредованных сигнальных путей, изменение рецепторной экспрессии и локализации на клеточном и субклеточном уровнях, и, очевидно, потенциацию ядерно-цитозольного обмена  $Ca^{2+}$ .

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Беляков А.В. Прижизненно-флуориметрическое исследование обмена  $Ca^{2+}$  в срезах мозга при гипоксических воздействиях // XXXIII Неделя науки СПбГПУ: Материалы всероссийской межвузовской научно-технической конференции студентов и аспирантов. – Санкт-Петербург, 2005. – С. 104-105.

2. Беляков А.В., Семенов Д.Г. Вклад metabotropicных глутаматных рецепторов (mGluR) в  $Ca^{2+}$  перегрузку нейронов, вызываемую аноксией in vitro // Вестник молодых ученых. Тезисы докладов всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина». – Санкт-Петербург, 2005. – С. 13.
3. Семенов Д.Г., Беляков А.В. Участие metabotropicных глутаматных рецепторов 1 и 5 подтипов в развитии postanoxicной кальциевой перегрузки в срезах коры мозга // Тезисы международного симпозиума "Механизмы адаптивного поведения". – Санкт-Петербург, 2005. – С. 77-78.
4. Беляков А.В., Семенов Д.Г. Участие metabotropicных глутаматных рецепторов 1 и 5 подтипов в развитии NMDA-опосредованной эксайтотоксичности, вызываемой аноксией in vitro в срезах коры мозга крысы // XXXIV Неделя науки СПбГУ: Материалы всероссийской межвузовской научно-технической конференции студентов и аспирантов. – Санкт-Петербург, 2006. – С.105-106.
5. Семенов Д.Г., Беляков А.В. Нейрохимический аспект адаптивного эффекта пониженного атмосферного давления // Материалы международной конференции «Медико-биологические аспекты действия физических факторов». – Минск, 2006. –С. 268-271.
6. Semenov D., Belyakov A., Samoilov M., Lazarewicz J. Hypoxic preconditioning enhances glutamate receptor-mediated calcium transients in rat brain slices // Acta Neurobiologiae Experimentalis: Abstracts of 8th International Congress of Polish Neuroscience Society. – Krakow, 2007. V. 67 – P. 337.
7. Беляков А.В. Модернизация фотометрии переживающих срезов мозга // Тезисы межинститутской конференции молодых ученых «Механизмы регуляции и взаимодействия физиологических систем организма человека и животных в процессах приспособления к условиям окружающей среды». – Санкт-Петербург, 2007. – С. 16.
8. Семенов Д.Г., Самойлов М.О., Беляков А.В. Роль глутаматергической сигнальной трансдукции в механизмах гипоксической толерантности мозга // Тезисы XX Съезда физиологического общества им. И.П.Павлова. – Москва, 2007. – С. 85.
9. Семенов Д.Г., Самойлов М.О., Лазаревич Е.В., Беляков А.В. Специфика вовлечения различных глутаматных рецепторов в патологические и адаптивные постгипоксические состояния мозга // Тезисы конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга». – Санкт-Петербург, 2008. – С. 122.

10. Беляков А.В., Семенов Д.Г. Использование VIM-микроскопии в флуоресцентном мониторинге динамики связанного кальция в переживающих срезах мозга // Материалы симпозиума «Гипоксическое, ишемическое preconditionирование мозга». – Санкт-Петербург, 2008. – С. 115-119.
11. Семенов Д.Г., Беляков А.В. Активация глутаматергической сигнальной трансдукции, вызванная гипоксическим preconditionированием – компонент гипоксической толерантности мозга // Материалы симпозиума «Гипоксическое, ишемическое preconditionирование мозга». – Санкт-Петербург, 2008. С. – 61-66.
12. Семенов Д.Г., Беляков А.В., Самойлов М.О. Умеренная гипобарическая гипоксия модифицирует  $Ca^{2+}$ -опосредованную глутаматергическую трансдукцию в коре мозга крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 2. – С. 144-147.
13. Belyakov A.V., Semenov D.G., Tjulkoва E.I., Gluschenko T.S., Salinska E., Samoiloв M.O., Lazarewicz J.W. Involvement of group I metabotropic glutamate receptors in forming hypoxic brain tolerance induced in rats by hypobaric preconditioning // Acta Neurobiologiae Experimentalis: Abstracts of 9th International Congress of Polish Neuroscience Society. – Warsaw, 2009. V. 69, № 3 – P. 303.
14. Беляков А.В., Семенов Д.Г. Многопараметрическое измерение кальциевой динамики в срезах мозга при изучении гипоксических состояний // Сборник тезисов 13-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века». – Пущино, 2009. – С. 185.
15. Семенов Д.Г., Беляков А.В., Самойлов М.О. Сравнение  $Ca^{2+}$  ответов на стимуляцию глутаматных рецепторов коры мозга крыс после гипобарической гипоксии различной тяжести // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2009. – Т. 95, № 9. – С. 71-77.
16. Беляков А.В., Семенов Д.Г., Глущенко Т.С., Самойлов М.О. Участие метаботропных глутаматных рецепторов в индукции гипоксической толерантности мозга // Сборник статей международной конференции «Закономерности развития патологических состояний и их коррекция». – Минск, 2009. – С. 20-23.
17. Belyakov A.V., Semenov D.G., Dudkin K.N. Multiparametric research of intracellular regulation in hippocampal slices of brain during hypoxic states // Abstracts of International Conference «Modern methods of microscopy in biology and medicine». – Saint-Petersburg, 2009. – P. 4-5.