

На правах рукописи

САХАРНОВА ТАТЬЯНА АЛЕКСАНДРОВНА

**НЕЙРОТРОПНОЕ И АНТИГИПОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ
НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ГОЛОВНОГО МОЗГА (BDNF)
*IN VIVO И IN VITRO***

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

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

Санкт-Петербург - 2014

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Мухина Ирина Васильевна
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Рыбникова Елена Александровна
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории нейроэндокринологии
ФГБУН Институт физиологии им.
И.П. Павлова РАН
Зайцев Алексей Васильевич
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией
физиологии межнейронного
взаимодействия ФГБУН Институт
эволюционной физиологии и
биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита состоится «__» _____ 2015 года в «__» часов на заседании диссертационного совета Д002.020.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН" по адресу: 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова д.6).

Автореферат разослан «__» _____ 2014 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Ордян Н. Э.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Изучение механизмов регуляции биологических процессов в норме и при воздействии стресс-факторов (гипоксия, ишемия и др.) является одной из значимых современных задач как биологии, так и медицины. Особое внимание исследователей направлено на поиск веществ, способных защитить клетки головного мозга от повреждающего действия стрессогенных факторов, в том числе гипоксии. Среди химических веществ, способных контролировать уровень метаболизма клетки в условиях сниженного уровня содержания кислорода, выделяют нейротрофический фактор головного мозга (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) (Larsen E.C. et al., 2007, Dirnagl U. et al., 2009). BDNF обеспечивает рост и развитие головного мозга в эмбриогенезе, а также образование и функционирование нейронных сетей в раннем постнатальном периоде (Martin J.L. et al., 2011). Недавними исследованиями показана возможность модулирования нейротрофическим фактором синаптической передачи в гиппокампе и некоторых отделах коры зрелого головного мозга (Rose C.R. et al., 2004, Edelman et al., 2014, Leal G. et al., 2014).

Как в норме, так и в условиях ишемии/гипоксии действие BDNF опосредовано взаимодействием с тирозинкиназным рецептором В (TrkB) и запуском основных сигнальных метаболических каскадов (Sun X. et al., 2008, Maddahi A. et al., 2010), важным компонентом которых является цАМФ-зависимый транскрипционный фактор (CREB). Показано, что CREB способствует выживанию нейронов в центральной нервной системе путем активации антиапоптотической экспрессии генов на ранних стадиях постнатального развития (Choi J.S. et al., 2003, Arthur J.S.C. et al., 2004). Однако экспериментальные данные по объяснению механизмов разностороннего действия BDNF противоречивы и являются предметом дискуссии в научном мире (Markham A. et al., 2012, Chen A. et al., 2013).

Не менее важным аспектом при изучении антигипоксических свойств цитопротекторов является разработка адекватных и легко воспроизводимых моделей гипоксии. Особый интерес представляет исследование действия гипоксии на сетевом уровне организации нейронов, возможный при помощи мультиэлектродной системы регистрации внеклеточных потенциалов действия (MEA). Длительное культивирование клеток различных структур головного мозга на мультиэлектродных матрицах *in vitro* дает уникальную возможность не только исследовать изменения морфофункциональных свойств нейронов в хроническом эксперименте, но и моделировать различные патологические состояния ЦНС (Potter S.M., DeMarse T.B., 2001, Madhavan R. et al., 2006, Stegenga J. et al., 2008, Pan L. et al., 2009, Pimashkin A.S. et al., 2011). По мере изучения механизмов действия BDNF на нейросетевом уровне появится возможность разработки новых лекарственных средств и соответствующих способов коррекции ишемических процессов в нервной ткани при нейродеструктивных заболеваниях.

Цель исследования:

Изучение нейротропного действия нейротрофического фактора головного мозга на спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей клеток гиппокампа в зависимости от стадии их развития *in vitro*, а также исследование антигипоксических свойств BDNF при моделировании гипоксической гипоксии *in vitro* и *in vivo*. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить нейротропное действие BDNF на спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей в культуре диссоциированных клеток гиппокампа на 7, 14 и 21 день их развития *in vitro* (DIV);

2. Исследовать ранние и отдаленные эффекты антигипоксического действия BDNF на активность нейронной сети культур клеток гиппокампа при моделировании острой нормобарической гипоксии *in vitro*;

3. Изучить эффект BDNF на выживаемость, двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность, сохранение и воспроизведение следов долговременной памяти у экспериментальных животных в раннем и отдаленном периодах после воздействия острой гипобарической гипоксии *in vivo*.

Научная новизна

В диссертации впервые проведено комплексное исследование влияния нейротрофического фактора BDNF на спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей культур диссоциированных клеток гиппокампа на разных этапах развития *in vitro*. Выявлен дозозависимый нейротропный эффект BDNF на биоэлектрические показатели функционального состояния нейронных сетей первичной культуры гиппокампа в зависимости от стадии их развития *in vitro*, заключающийся в увеличении длительности сетевой пачечной активности при отсутствии изменений в количестве спайков и повышении синхронизации активности нейронов в составе сети при формировании спонтанной сетевой пачки. Нейротропный эффект имел транзиторный характер, наступал с задержкой в 10-15 мин и длился не менее 2-х часов.

На модели острой гипоксии *in vitro* впервые выявлено антигипоксическое действие BDNF, наиболее выраженное при аппликации нейротрофического фактора в концентрации 1 нг/мл за 20 мин до острой нормобарической гипоксии. Установлено, что превентивное применение BDNF препятствует повреждениям и гибели нейронов в культурах диссоциированных клеток гиппокампа в отдаленном постгипоксическом периоде, что способствует нормализации спонтанной биоэлектрической активности нейронов в составе сети после гипоксии/реоксигенации.

Антигипоксическое действие BDNF, выявленное на клеточном уровне *in vitro*, подтверждено при моделировании острой гипобарической гипоксии *in vivo*. Впервые показано, что превентивное интраназальное введение BDNF, 4 мкг/кг и 40 мкг/кг способствует выживаемости животных на «высоте», увеличению устойчивости животных к гипоксии, а также сохранению следов долговременной пространственной памяти в постгипоксическом периоде.

Практическая и теоретическая значимость работы

Полученные в работе данные о действии нейротрофического фактора BDNF на структурно-функциональное состояние нейронных сетей гиппокампа в процессе синаптогенеза расширяют теоретические представления о роли BDNF в функционировании мозга в постнатальном периоде. Выявлены антигипоксические свойства нейротрофического фактора в условиях острой гипоксии как *in vitro*, так и *in vivo*. Раскрытие механизмов нейропротекторного действия BDNF может способствовать разработке новых терапевтических подходов к коррекции ишемических процессов в нервной ткани при нейрососудистых заболеваниях.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Нейротрофический фактор головного мозга дозозависимо модулирует спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей культур диссоциированных клеток гиппокампа в зависимости от стадии их развития *in vitro*.

2. Нейротрофический фактор головного мозга является компонентом эндогенной антигипоксической системы защиты клеток мозга в постнатальном периоде, способствует повышению выживаемости нейронов и сохранению функциональности нейронных сетей как в условиях гипоксии/реоксигенации, так и в отдаленном постгипоксическом периоде.

3. Превентивное интраназальное введение нейротрофического фактора головного мозга увеличивает устойчивость животных к условиям острой гипобарической гипоксии, а также способствует сохранению долговременной пространственной памяти после гипоксии/реоксигенации.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на X сессии молодых ученых и студентов «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Н.Новгород, 2011), Седьмом международном междисциплинарном конгрессе "Нейронаука для медицины и психологии" (Судак, 2011), Всероссийской молодежной конференции – школы «Нейробиология интегративных функций мозга» (Санкт-Петербург, 2011), Восьмом международном форуме по нейронауке FENS 2012 (Испания, Барселона, 2012), IV Съезде биофизиков России (Н.Новгород, 2012), IV Международном симпозиуме Topical Problems of Biophotonics - 2013 (Н.Новгород, 2013), XXII Съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Волгоград, 2013), Восьмом международном симпозиуме по нейропротекции и нейровосстановлению (Германия, Магдебург, 2014), Международной научной школе «Горизонты современной нейронауки» (Н.Новгород, 2014), Международном конгрессе по нейронаукам (Красноярск, 2014), Девятом международном форуме по нейронауке FENS 2014 (Италия, Милан, 2014), Десятом международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2014), Симпозиуме «Новейшие методы клеточных технологий в медицине» (Новосибирск, 2014).

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в получении исходных данных и проведении экспериментов, лично проводил обработку и анализ экспериментальных данных. Интерпретация экспериментальных данных выполнена лично автором, подготовка основных публикаций по результатам работы проводилась при его непосредственном участии.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 27 работ, 8 из которых – статьи в рецензируемых журналах, 19 – тезисы докладов. Автор является руководителем гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований №14-04-31601_мол-а (2014-2015г.г.).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа в объеме 140 страниц состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 29 отечественных и 163 зарубежных источника. Работа иллюстрирована 4 таблицами и 28 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Культивирование диссоциированных клеток гиппокампа. Материалом для исследований *in vitro* послужили культуры диссоциированных клеток гиппокампа, полученные от 18 дневных мышинных эмбрионов линии C57BL/6 (вид *Mus musculus*). Диссоциирование клеток достигалось путем обработки ткани гиппокампа 0,25% трипсином (Gibco 25200-056). Клетки ресуспендировали в нейробазальной среде Neurobasal™ (Invitrogen 21103-049) в комплексе с биоактивной добавкой B27 (Invitrogen 17504-044), глутамином (Invitrogen 25030-024), эмбриональной телячьей сывороткой (ПанЭко K055) и культивировали, согласно ранее разработанному протоколу (Мухина И.В. с соавт., 2009), в течение 40 дней *in vitro* (DIV) на мультиэлектродных матрицах систем MEA60 (Multichannel Systems, Германия) и MED64 (AlfaMed Science, Япония). Для оценки жизнеспособности культур после моделирования нормобарической гипоксии посадка клеток проводилась на 48 покровных стеклах размером 18x18 мм (табл.1). Исходная плотность культур составляла 9000 кл/мм². Жизнеспособность первичных культур гиппокампа поддерживалась в условиях CO₂-инкубатора при температуре 35,5°C и газовой смеси, содержащей 5% CO₂.

Регистрация и анализ спонтанной биоэлектрической активности первичных культур гиппокампа осуществлялась с помощью мультиэлектродных систем MED64 и MEA60. Для получения и анализа данных использовался набор программного обеспечения Conductor™ (Alpha Med Science, Япония) и MC Rack™ (Multichannel Systems, Германия), а также разработанный в программной среде Matlab™ оригинальный пакет алгоритмов Meaman. Исследовались основные характеристики спонтанной биоэлектрической активности нейронной сети: количество малых сетевых пачек в записи; количество спайков в пачке; длительность малой пачки импульсов, с. Критерием малой сетевой пачки являлось наличие спайков минимум на 4-х различных электродах матрицы с межспайковым интервалом не более 100 мс.

Моделирование нормобарической гипоксии *in vitro* проводилось на 33 DIV путем замены нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода в течение 10 минут. Вытеснение кислорода осуществлялось в герметичной камере, воздух в которой был замещен на инертный газ - аргон. Содержание кислорода в среде культивирования снижалось с 3,26 мл/л (нормоксия) до 0,37 мл/л (гипоксическая среда). В опытной группе за 20 минут до гипоксии в культуральную среду добавляли BDNF (1нг/мл).

Таблица 1. Распределение экспериментальных групп по сериям *in vitro*

Серия	Название группы	Период исследования	Количество диссоциированных культур
Влияние BDNF на спонтанную биоэлектрическую активность культур диссоциированных клеток гиппокампа	Контроль (Alb+PBS)	7,14, 21 DIV	27
	BDNF, 0,1 нг/мл		27
	BDNF, 1 нг/мл		27
	BDNF, 10 нг/мл		12
Антигипоксические свойства BDNF при моделировании острой нормобарической гипоксии	Нормоксия	33 - 40 DIV	28
	Гипоксия контроль (без BDNF)		28
	Гипоксия + BDNF, 1 нг/мл		28

Оценка выживаемости клеток после воздействия нормобарической гипоксии *in vitro* осуществлялась в период нормоксии (33 DIV), на 3 (36 DIV) и 7 (40 DIV) сутки постгипоксического периода. Для изучения показателя жизнеспособности проводилась окраска диссоциированных культур пропидий иодидом (Sigma 81845-25MG) и бис-бензими́дом (Sigma 14530-100MG) с целью обнаружения ядер погибших клеток и общего количества клеток в диссоциированной культуре соответственно. Визуализация окрашивания проводилась с помощью инвертированного микроскопа Leica DMIL HC (Leica, Германия). Число живых клеток рассчитывалось как процентное соотношение между бис-бензими́д позитивными клетками и пропидий иодид позитивными клетками.

Моделирование острой гипобарической гипоксии (ОГБГ) *in vivo*. В опытах *in vivo* использовались половозрелые самцы мышей линии C57BL/6 массой 18-20 грамм в количестве 58 особей. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в Приказе Минздрава России № 708н от 23.08.10 «Об утверждении Правил лабораторной практики» и были согласованы с этическим комитетом при ГБОУ ВПО НижГМА Минздравсоцразвития России. Все животные были разделены на 5 групп (табл. 2).

Для моделирования острой гипобарической гипоксии использовалась вакуумная проточная барокамера при внешней температуре воздуха 20—22°C. Особи помещались в условия, соответствующие подъему на высоту 10000—10500 м (170-185 мм рт. ст.) со скоростью подъема 183 м/с (Методические рекомендации, под ред. Лукьяновой Л.Д., 1990). Регистрировались следующие показатели: время жизни на «высоте» (Тж, мин); время потери позы (Тпп, мин); время восстановления позы (Твп, мин). Также в каждой группе животных проводилась оценка устойчивости особей к воздействию острой гипоксии. Оценка эффективности антигипоксических свойств нейротрофического фактора (коэффициент защиты, Кз) проводилась по формуле:

$Kз = (a/b+1)/(v/d+1)$, где:

«а» и «б» - число выживших животных в опыте и контроле;

«в» и «д» - общее число животных в группах.

Таблица 2. Распределение экспериментальных групп в исследованиях *in vivo*

Серия	Название группы	Тест «Открытое поле»	Тест «Водный лабиринт Морриса»	ОГБГ	Количество животных
Антигипоксические свойства BDNF при моделировании острой гипобарической гипоксии (ОГБГ)	Интактные	+	-	-	14
	Контроль (NaCl 0,9% раствор)	+	+	+	14
	Группа сравнения (Реамберин, 150 мг/кг)	+	+	+	10
	BDNF, 4 мкг/кг	+	+	+	10
	BDNF, 40 мкг/кг	+	+	+	10

Статистическая обработка результатов. Полученные результаты *in vivo* и *in vitro* обрабатывались статистически с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel и SigmaPlot 11.0. Данные представлены в форме «среднее значение ± стандартная ошибка среднего». Проверка гипотезы о нормальном распределении проводилась с применением критерия Пирсона. Достоверность статистических различий выборок, имеющих нормальное распределение проверялась с помощью t-теста Стьюдента. Различия между выборками, имеющим распределение, отличающееся от нормального, оценивались с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (Гланц С., 1999). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

3.1. Влияние нейротрофического фактора головного мозга на спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей культур диссоциированных клеток гиппокампа на разных этапах развития *in vitro*

На 14 день развития *in vitro* при добавлении в среду культивирования нейротрофического фактора BDNF (0,1 нг/мл, 1 нг/мл, 10 нг/мл) происходили изменения спонтанной биоэлектрической активности культур диссоциированных клеток гиппокампа (рис. 1).

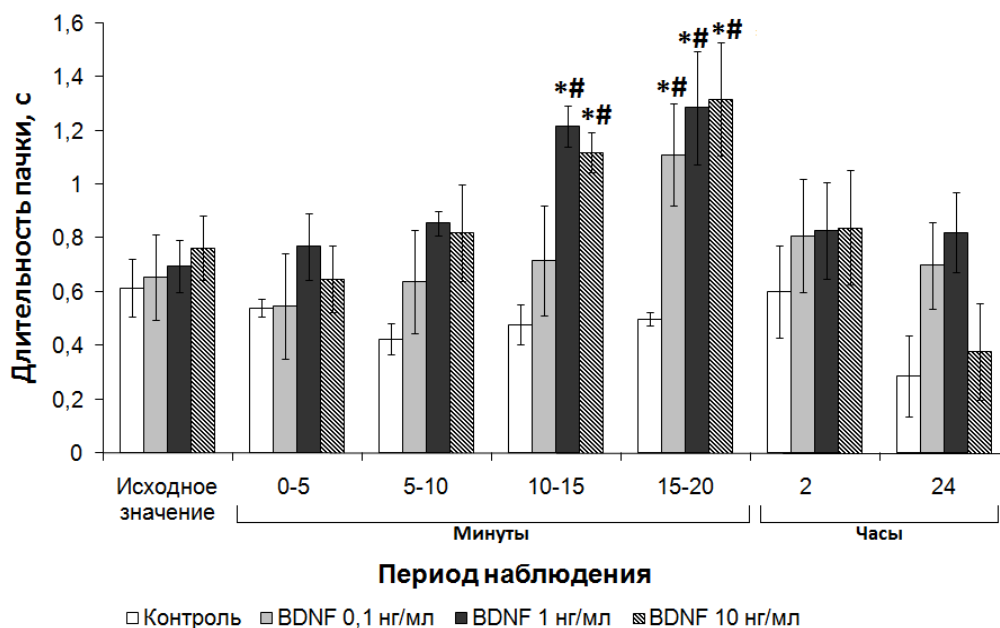


Рисунок 1. Влияние нейротрофического фактора BDNF на длительность малой сетевой пачки импульсов на 14 DIV. * - достоверность различий с исходным уровнем; # - достоверность различий с контрольной группой, $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

На временном промежутке 15-20 минут после добавления BDNF, 0,1 нг/мл длительность малой сетевой пачки достоверно ($p < 0,05$) увеличилась по сравнению с контрольной группой и в среднем на 70% относительно исходного уровня активности. Эффект BDNF, 1 нг/мл развивался быстрее и обладал большей продолжительностью действия. На временном промежутке 10-15 минут длительность малой пачки достигла достоверных различий ($p < 0,05$) относительно исходной активности и активности контрольных культур, а на 20 минуте достоверно ($p < 0,05$) превысила исходные значения на 83%. К 15 минуте регистрации после добавления в среду культивирования BDNF, 10 нг/мл также обнаружено достоверное ($p < 0,05$) увеличение длительности малой сетевой пачки как относительно исходных, так и контрольных значений, а к 20 минуте данный показатель превысил ($p < 0,05$) первоначальные значения на 73%.

Нейротропный эффект BDNF длился кратковременно, и через 2 часа после добавления нейротрофина в различных концентрациях активность нейронных сетей возвращалась к исходному уровню, статистически достоверных различий не было обнаружено.

Аппликация BDNF (0,1 нг/мл, 1 нг/мл, 10 нг/мл) вызывала функциональные изменения внутренней структуры нейронной сети, определяемой по времени возникновения первых спайков с различных электродов при формировании спонтанной сетевой пачки - «паттерна активации» (рис. 2).

Добавление в среду культивирования нейротрофического фактора, вероятно, повышало эффективность синаптической передачи, что приводило к увеличению количества нейронов в составе сети, время активации которых было не более 50 мс. Подобная синхронизация нейронов в сети наблюдалась через 24 часа после аппликации нейротрофина.

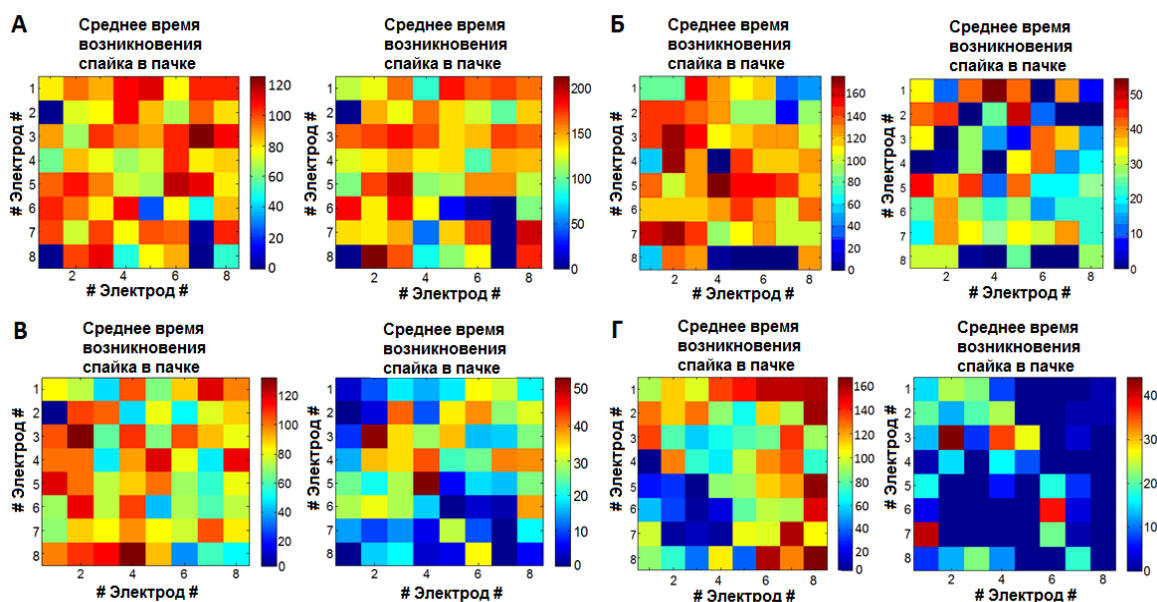


Рисунок 2. Паттерны активации спонтанной биоэлектрической активности культур диссоциированных клеток гиппокампа (DIV 14). Слева – активность культур до аппликации, справа – через 24 часа после аппликации BDNF.

А – контрольная культура; Б – BDNF, 0,1 нг/мл; В – BDNF, 1 нг/мл; Г - BDNF, 10 нг/мл. Цветовая диаграмма – время появления спайков в малой сетевой пачке, регистрируемых с 64 электродов, мс

При исследовании спонтанной биоэлектрической активности диссоциированных культур на 21 DIV наиболее значимые изменения отмечены в группе «BDNF, 1 нг/мл» (рис. 3). С 20 минуты регистрации наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) увеличение длительности малой сетевой пачки относительно исходной активности и активности контрольных культур. Через 2 часа после аппликации BDNF, 1 нг/мл длительность пачки увеличилась на 62% по сравнению с исходным уровнем и на 36,8% с контрольным значением ($p < 0,05$). Спустя сутки после аппликации BDNF, 1 нг/мл длительность пачки возвращалась к исходным значениям, однако функциональные характеристики сетевой пачки импульсов изменялись в сторону увеличения общей синхронизации работы нейронов, наблюдаемой по формированию структуры паттерна активации.

Следует отметить, что аппликация нейротрофического фактора BDNF (0,1 нг/мл, 1 нг/мл) на ранних этапах развития сети с участием химических синапсов (Широкова с соавт., 2013) (7 DIV) существенно не влияла на спонтанную биоэлектрическую активность культур диссоциированных клеток гиппокампа. Предполагается, что для проявления нейротропного действия BDNF на уровне нейронной сети требуется наличие химических синапсов.

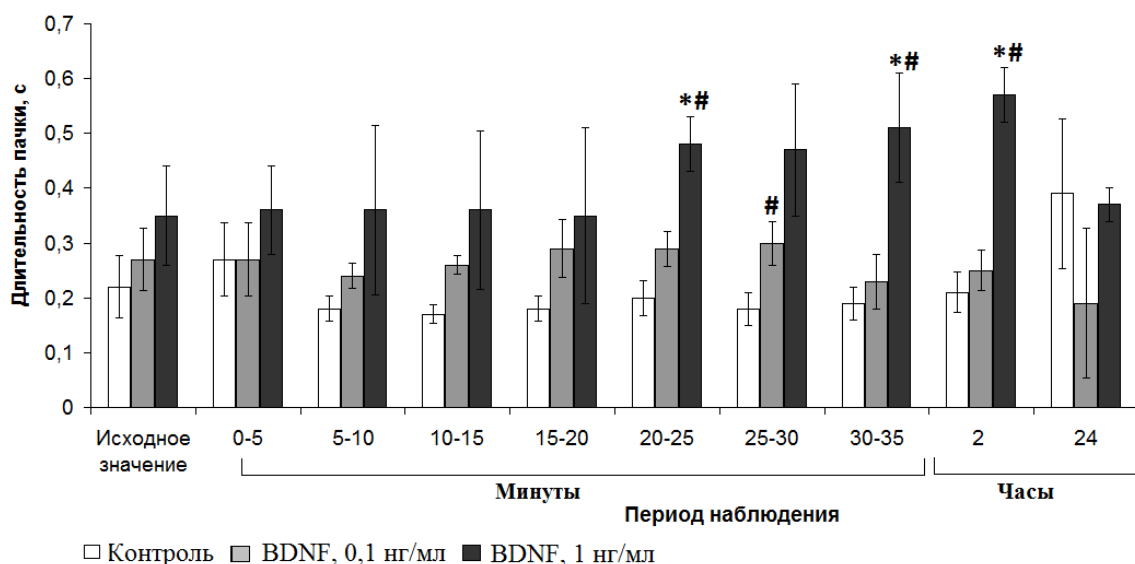


Рисунок 3. Влияние нейротрофического фактора BDNF на показатель длительности малой сетевой пачки импульсов (DIV 21). * - достоверность различий с исходным уровнем; # - достоверность различий с контрольной группой, $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

3.2. Антигипоксическое действие нейротрофического фактора головного мозга в условиях нормобарической гипоксии *in vitro*

Со второй минуты действия нормобарической гипоксии на первичные культуры гиппокампа в контрольной группе наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) снижение спонтанной биоэлектрической активности по показателям: количество малых сетевых пачек/мин, количество спайков/с (рис. 4). Начиная с третьей минуты, в контрольных культурах регистрировались в основном единичные внеклеточные потенциалы действия. Превентивная аппликация BDNF, 1 нг/мл за 20 мин до гипоксии способствовала поддержанию сетевой пачечной активности клеток во время гипоксии.

Реоксигенация вызывала усиление сетевой активности нейронов относительно исходного уровня в первые 2 часа после смены гипоксической среды на нормоксическую. Паттерн спонтанной биоэлектрической активности изменялся за счет увеличения количества малых сетевых пачек (до гипоксии $38,2 \pm 7,8$, после реоксигенации $101,7 \pm 23,6$) и незначительном увеличении среднего числа спайков в пачке (до гипоксии $251,8 \pm 102,1$, после реоксигенации $432,7 \pm 141,3$).

Через 2 часа после гипоксии происходило необратимое снижение спонтанной биоэлектрической активности (количество пачек $3,0 \pm 5,6$, среднее число спайков в пачке 508 ± 233). На первые сутки после гипоксии количество малых сетевых пачек в контрольных культурах снизилось относительно исходной активности в 4,9 раза ($p < 0,05$) (рис. 5).

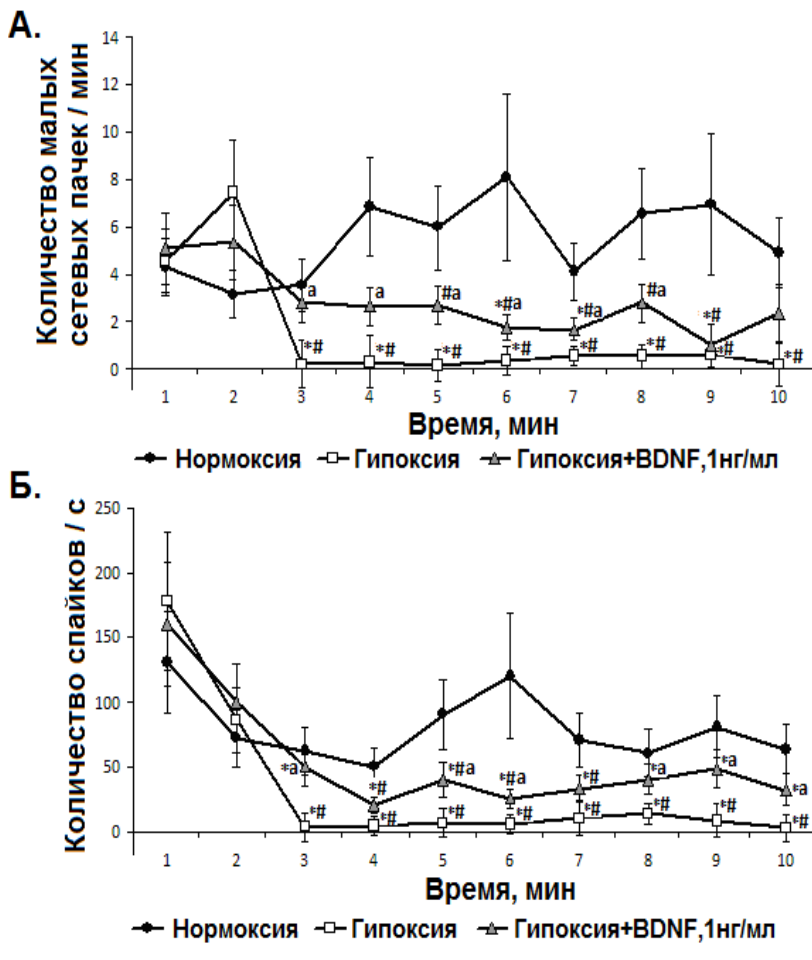


Рисунок 4. Динамика спонтанной биоэлектрической активности диссоциированных культур клеток гиппокампа (33 DIV) в течение 10-минутной нормобарической гипоксии (0,37 мл/л O_2 в культуральной среде). А - количество малых сетевых пачек; Б - количество спайков в секунду.
* - достоверность различий с исходным уровнем активности, # - достоверность различий с группой «Нормоксия», а - достоверность различий с группой «Гипоксия», $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

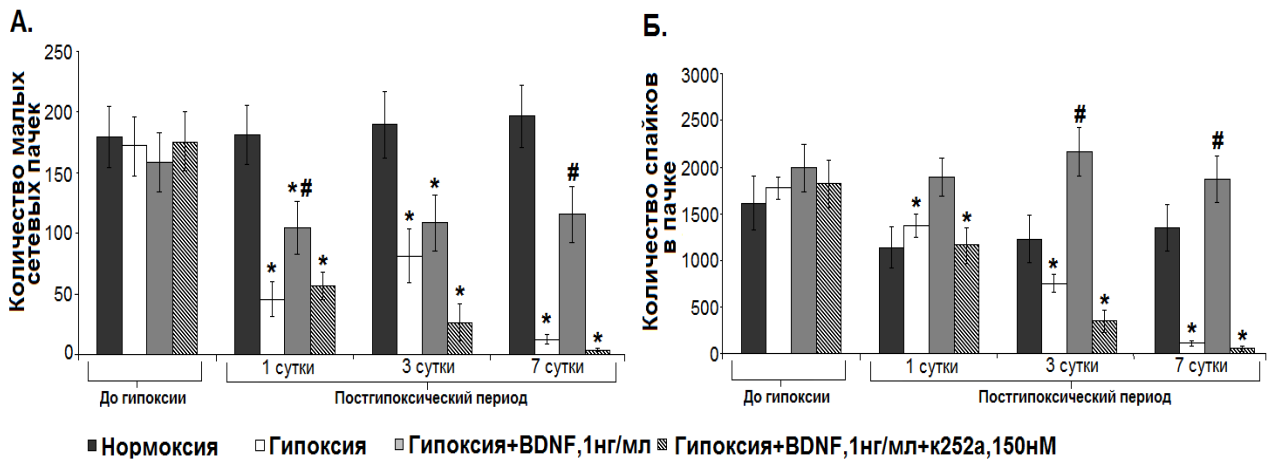


Рисунок 5. Спонтанная биоэлектрическая активность культур клеток диссоциированных гиппокампа на 1, 3 и 7 сутки постгипоксического периода. А – количество малых сетевых пачек; Б – среднее количество спайков в пачке. * - достоверность различий с исходным уровнем, # - достоверность различий с группой "Гипоксия", $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Снижение спонтанной биоэлектрической активности в группе «BDNF, 1 нг/мл» произошло лишь в 1,5 раза ($p < 0,05$). На 7 сутки после моделирования нормобарической гипоксии в контрольной группе зарегистрированы единичные малые сетевые пачки, что может быть вызвано редукцией синаптических контактов

или гибелью функционально активных нейронов. Превентивное добавление BDNF, 1 нг/мл нивелирует негативные последствия кислородного голодания, сохраняя сетевую пачечную активность культур клеток гиппокампа на определенном функциональном уровне с дальнейшим восстановлением в постгипоксическом периоде.

Кратковременное действие нормобарической гипоксии привело к функциональным перестройкам сетевой пачки импульсов, выражающихся в изменении паттерна активации (рис. 6). Так же, как и в случае аппликации BDNF в культуры с нормоксическими условиями культивирования, добавление нейротрофического фактора в культуры с острой гипоксией вызывало уменьшение времени активации нейронов в составе сетевой пачки, что обусловило развитие более синхронизированного начала пачечной активности сети в целом.

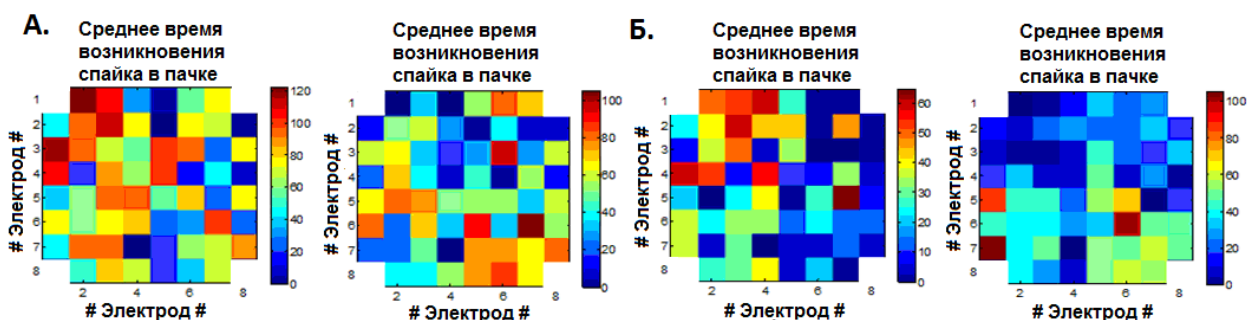


Рисунок 6. Паттерн активации спонтанной биоэлектрической активности нейронов культуры до гипоксии и через 24 часа после реоксигенации: А - контрольная группа; Б - аппликация BDNF (1нг/мл). Цветовая диаграмма – время появления спайков, регистрируемых с электродов (мс), в малой сетевой пачке

Исследование жизнеспособности клеток выявило, что кратковременная нормобарическая гипоксия приводила к гибели основной части клеток в течение первых трех суток постгипоксического периода. Через 24 часа после острого 10-минутного эпизода гипоксии появлялись первые морфологические изменения в виде некротизированных и апоптотических клеточных элементов (рис. 7). Количество мертвых клеток в контрольных культурах за первые трое суток достоверно ($p < 0,05$) увеличилось в четыре раза по сравнению с нормоксическими условиями и составило 43% от общего числа клеток. Превентивная аппликация BDNF, 1 нг/мл способствовала снижению числа некротических повреждений по сравнению с контрольной серией.

Через 7 суток после нормобарической гипоксии количество мертвых клеток составляло всего 20% от общего числа клеток в культуре, что достоверно в 2,4 раза ниже, чем в контрольной серии ($p < 0,05$).

Применение блокатора тирозинкиназных рецепторов B k252a (150 нМ) полностью нивелирует положительные эффекты BDNF (1 нг/мл) при действии гипоксии. Исследование жизнеспособности клеток в культуре диссоциированных клеток гиппокампа также показало, что применение антагониста рецептора TrkB достоверно ($p < 0,05$) увеличивало количество погибших клеток после воздействия гипоксии.

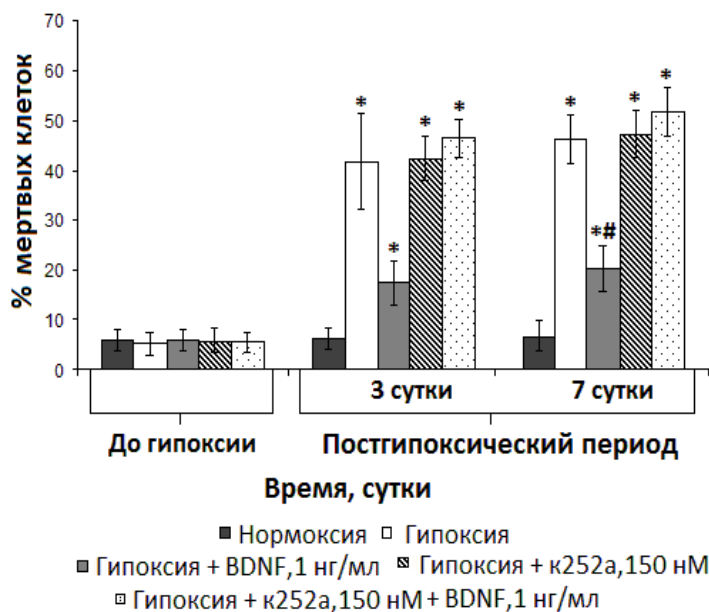


Рисунок 7. Процент мертвых (пропидиум иодид положительных) клеток в диссоциированных культурах гиппокампа до гипоксии, на 3 и 7 сутки постгипоксического периода.
* - достоверность различий с группой "Нормоксия";
- достоверность различий с группой "Гипоксия", $p < 0,05$ (критерий Стьюдента)

3.3. Антигипоксическое действие нейротрофического фактора головного мозга в условиях острой гипобарической гипоксии *in vivo*

Исследование параметров срочной адаптации мышей к высотной гипоксии выявило наличие антигипоксических свойств у BDNF, вводимого интраназально в дозах 4 и 40 мкг/кг. Тж, отражающее устойчивость организма к дефициту кислорода, в контрольной группе, в среднем составило $6,18 \pm 0,76$ минут. Применение BDNF достоверно ($p < 0,05$) увеличивало время жизни «на высоте» в сравнении с контрольной группой. В группе, получавшей BDNF в дозе 4 мкг/кг, Тж в среднем составило $9,4 \pm 0,4$ минут, а в группе «BDNF, 40 мкг/кг» - $8,60 \pm 0,49$ минут.

По степени устойчивости к гипоксии выделяли три группы животных: низкоустойчивые особи (НУ) (Тж менее 3 мин), среднеустойчивые (СУ) (Тж от 3 до 9 мин) и высокоустойчивые (ВУ) (Тж более 9 мин без видимых проявлений гипоксического повреждения). Показано, что применение как антигипоксанта Реамберина, так и нейротрофического фактора увеличивало долю среднеустойчивых и высокоустойчивых животных, при отсутствии в данных группах низкоустойчивых особей (рис. 8). При исследовании времени потери и восстановления позы – показателей, характеризующих общее состояние животного, обнаружено сокращение времени восстановления позы в группе с применением BDNF в дозе 4 мкг/кг: у 62,5% животных в этой группе время восстановления позы составляло менее 45 с, что почти в 10 раз меньше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$).

Интегральный показатель эффективности антигипоксического действия веществ - коэффициент защиты (Кз) опытной группы «BDNF (4 мкг/кг)» не отличался от значений группы «Реамберин» и составлял 1,3. Кз особей с применением BDNF (40 мкг/кг) превышал в 1,23 раза показатель группы сравнения и составил 1,6.

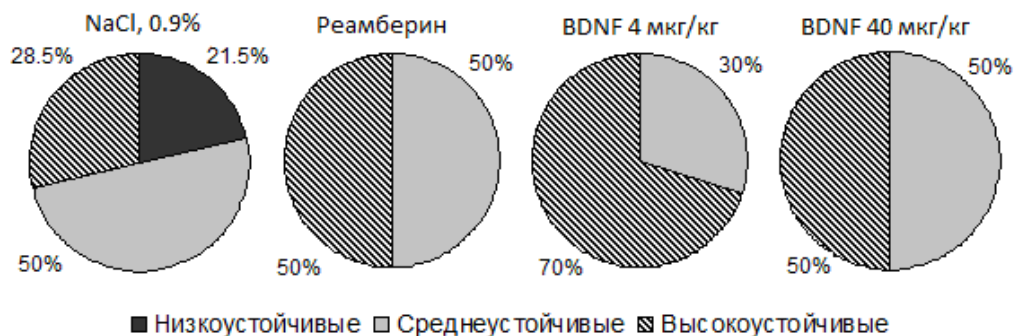


Рисунок 8. Степень устойчивости животных в разных группах к воздействию острой гипобарической гипоксии. Данные представлены в % от общего числа мышей в группе

В результате оценки параметров поведенческой активности мышей в тесте «открытое поле» установлено, что во всех группах происходило снижение ориентировочно-исследовательской активности и защитно-оборонительных поведенческих реакций. Снижение двигательной активности отражало кратковременное развитие пассивно-оборонительной тактики поведения мышей в ответ на стрессорное воздействие «водного лабиринта». В отдаленном периоде наблюдения в интактной группе происходило постепенное восстановление ориентировочно-исследовательской активности к исходным показателям. В опытных группах BDNF (4 мкг/кг, 40 мкг/кг) наблюдалась выраженная тенденция к восстановлению горизонтальной и вертикальной двигательной активности в отдаленном постгипоксическом периоде.

Дополнительно для оценки антигипоксического действия BDNF исследовали сохранность мнестических функций ЦНС в постгипоксическом периоде путем тестирования животных в «водном лабиринте Морриса». Состояние памяти мышей оценивалось через 1 сутки после ОГБГ с использованием отсроченного коэффициента сохранения долговременной памяти (оКс) (D'Hooge R. and De Deyn P.P., 2001) (табл. 4).

Таблица 4. Значения отсроченного коэффициента сохранения долговременной памяти у мышей после воздействия острой гипобарической гипоксии, %

Группа животных	оКс, %
Интактные	29,8 ± 2,6
Контроль (NaCl, 0,9%)	24,5 ± 3,9
Группа сравнения (Реамберин, 150 мг/кг)	25,6 ± 3,1
BDNF, 4 мкг/кг	30,6±3,9
BDNF, 40 мкг/кг	35,5±4,1*#

* – статистически значимые различия с группой сравнения, # - статистически значимые различия с контрольной группой, $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Выявлено, что воздействие острой гипобарической гипоксии приводило к нарушению процессов воспроизведения долговременной локомоторной памяти у мышей. Применение антигипоксанта Реамберина, несмотря на выраженный защитный эффект, проявляющийся в повышении резистентности к гипоксии, не

оказывало действия на улучшение сохранения следов долговременной памяти в постгипоксическом периоде. Доля времени пребывания в секторе, где ранее находилась платформа, оказалась на нижней границе установленной нормы посещаемости ($25,6 \pm 3,1$ с). В группах с применением BDNF показатели оКс либо не отличались от значений интактных животных (как в случае с BDNF 4 мкг/кг), либо превышали их (BDNF 40 мкг/кг). Таким образом, можно предположить, что нейротрофический фактор головного мозга обладает не только антигипоксическими свойствами, но и ноотропным действием.

Для более детального исследования процессов воспроизведения следов долговременной памяти с помощью пакета программ Matlab было выделено 3 основных стратегии поиска платформы: 1) прямое достижение цели – направленное передвижение к месту расположения платформы (время трека 3-10 сек); 2) активный поиск – с учетом предыдущего опыта (10-20 сек); 3) хаотический поиск – отсутствие выраженной стратегии достижения цели (более 20 сек). Также встречались особи, которые не нашли бы платформу за все время пребывания в водном лабиринте (рис. 9). В результате оценки графиков посещений секторов бассейна было показано, что в группе, не подвергшейся ОГБГ, не встречалось животных с неудачным поиском цели. Основной процент особей непосредственно двигались к месту, где ранее располагалась платформа (55,5%) или, опираясь на предыдущий опыт обучения, активно искали ее, осуществляя характерные циркуляторные и радиальные движения (27,7%). 16,7% животных выбирали хаотическую тактику достижения цели.

По сравнению с интактными животными в опытных группах после воздействия ОГБГ стратегия поиска платформы существенно изменялась. У контрольных особей обнаружено наибольшее количество мышей с отрицательным результатом поиска платформы (23,26%). Равное число контрольных животных применяли прямую и хаотическую стратегию поиска цели (23,07%).

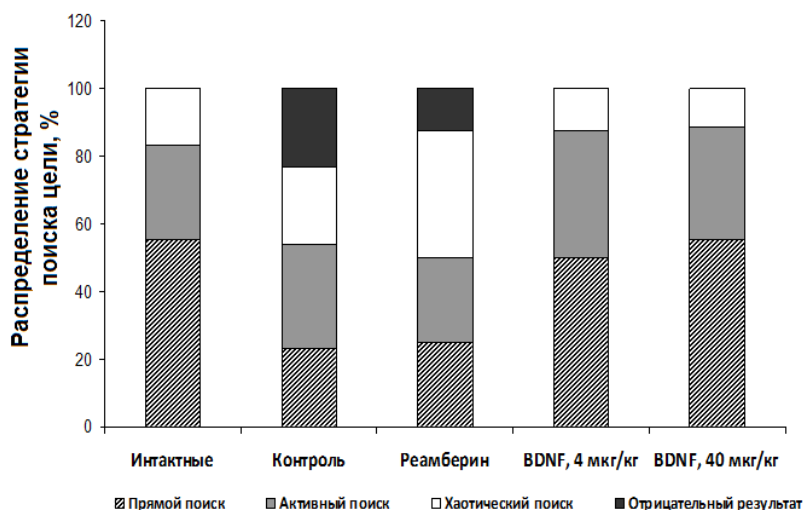


Рисунок 9. Распределение стратегий поиска цели в группах животных при отсроченном тестировании в водном лабиринте Морриса после воздействия ОГБГ, %

Доля особей, активно искавших платформу, составило 30,7%. Наибольшее количество животных с применением Реамберина осуществляли хаотический поиск цели (37,7%) (рис. 9). В группе сравнения обнаружены особи с отрицательной попыткой обнаружения платформы (12,5%). Равная доля животных выбирала прямой и активный поиск цели (25%).

Интраназальное применение нейротрофического фактора BDNF (4 мкг/кг, 40 мкг/кг) перед ОГБГ способствовало сохранению стратегии поиска платформы в

лабиринте. В данных опытных группах прямой поиск цели выбрали 55,5% животных (BDNF, 40 мкг/кг) и 50% особей, получивших 4 мкг/кг BDNF. Доля мышей, избравших тактику активного поиска платформы, оказалась даже выше, чем в интактной группе и составила 33,3% (для группы BDNF, 40 мкг/кг) и 37,5% (для группы BDNF, 4 мкг/кг).

Заключение

В результате проведенных исследований было показано, что нейротрофический фактор головного мозга модулирует спонтанную биоэлектрическую активность культур диссоциированных клеток гиппокампа. Наблюдаемый эффект выражался в увеличении длительности малой сетевой пачки импульсов, сокращении времени появления первых спайков в пачке и изменении структуры как паттерна активации пачки, так и всей пачки импульсов, являющейся функциональной характеристикой нейронной сети. Проявление наблюдаемых изменений зависело от концентрации добавляемого нейротрофина и от стадии развития диссоциированных культур *in vitro*. Характерным проявлением нейротропного действия BDNF явилось повышение эффективности синаптической передачи в зрелой нейронной сети и усиление синхронизации нейронов при их включении в сетевую активность. Предполагается, что полученный нейротропный эффект BDNF связан с метаболическими процессами, опосредованными запуском сигнальных каскадов при взаимодействии BDNF с рецептором TrkB (Caldeira M.V. et al., 2007, Porcher C. et al., 2011). Для реализации данных реакций необходимо наличие сформированных зрелых синаптических контактов в нейронной сети.

Превентивное применение BDNF (1 нг/мл) предупреждало резкое снижение активности нейронов при гипоксии *in vitro*, сохраняя сетевую пачечную активность культур диссоциированных клеток гиппокампа на минимальном функциональном уровне во время гипоксии с дальнейшим быстрым восстановлением в реоксигенационном периоде без последующей массивной гибели нейронов. Антигипоксическое защитное действие BDNF зависело от активности тирозинкиназных рецепторов B.

Антигипоксические свойства BDNF были подтверждены в экспериментах *in vivo*. Было установлено, что превентивное применение нейротрофического фактора в дозах 4 мкг/кг и 40 мкг/кг повышало устойчивость особей к условиям гипоксии наравне с эффектом известного препарата антигипоксического действия Реамберина. Предполагается, что BDNF обладает не только антигипоксическим, но и ноотропным эффектом, проявляющимся в сохранении стратегии поиска платформы с наименьшими затратами времени для достижения цели. Механизм возможного ноотропного действия остается открытым и требует дальнейшего изучения.

Таким образом, нейротрофический фактор головного мозга обладает выраженными антигипоксическим и, возможно, ноотропным свойствами вследствие повышения эффективности синаптической передачи импульсов по нейронным сетям, опосредованной взаимодействием с TrkB рецептором. Предполагается, что в дальнейшем применение BDNF в качестве лекарственного средства может свести к минимуму возможность развития побочных эффектов при действии гипоксии и обеспечить восстановление нейронных сетей в постгипоксическом периоде.

Выводы:

1. BDNF (0,1 нг/мл, 1нг/мл и 10 нг/мл) обладает дозозависимым нейротропным действием на спонтанную биоэлектрическую активность только зрелых нейронных сетей культур диссоциированных клеток гиппокампа, начиная с 14 дня развития *in vitro*;

2. Нейротропное действие BDNF проявляется в увеличении длительности сетевой пачечной активности при отсутствии изменений в количестве спайков и уменьшении времени появления первых спайков нейронов при формировании спонтанной сетевой пачки. Нейротропный эффект BDNF наступает с задержкой в 10-15 мин, имеет транзиторный характер длительностью не менее 10 мин на 14-й день развития *in vitro* и не менее 2-х часов на 21-й день развития *in vitro*;

3. BDNF обладает антигипоксическими свойствами при моделировании острой гипоксии *in vitro*, наиболее выраженными при аппликации нейротрофического фактора в концентрации 1 нг/мл за 20 мин до острой нормобарической гипоксии, и проявляющимися в сохранении спонтанной сетевой активности нейронов во время острой гипоксии;

4. Превентивное применение BDNF в концентрации 1 нг/мл предупреждает снижение спайковой активности диссоциированных нейронов гиппокампа в составе сети *in vitro* в отдаленном постгипоксическом периоде за счет уменьшения постгипоксической гибели нейронов, поддерживает синхронизацию активности нейронов в составе сети при формировании спонтанной сетевой пачки;

5. Антигипоксическое действие BDNF реализуется через тирозинкиназные рецепторы В типа (TrkB);

6. Антигипоксическое действие BDNF, выявленное на клеточном уровне *in vitro*, подтверждено при моделировании острой гипобарической гипоксии *in vivo*. Превентивное интраназальное введение BDNF, 4 мкг/кг и 40 мкг/кг способствует повышению устойчивости животных к гипоксии на 40%, а также сохранению следов долговременной пространственной памяти, двигательной и исследовательской активности в постгипоксическом периоде.

Список работ, опубликованных по теме диссертации**Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ**

1. Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Коротченко С.А., Балашова А.Н., Мухина И.В. Влияние BDNF на функционирование нейронной сети первичной культуры гиппокампа в условиях глюкозной депривации // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. - 2011. - Т. 2. - № 2. - С. 237-242.

2. Сахарнова Т.А., Ведунова М.В., Мухина И.В. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) и его роль в функционировании центральной нервной системы // Нейрохимия. - 2012. - Т. 24. - № 4. - С. 269-277.

3. Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Миронов А.А., Сахарнова Т.А., Пимашкин А.С., Бобров М.Ю., Хаспеков Л.Г., Мухина И.В. Нейропротекторное действие каннабиноида N-арахидоноилдофамина при моделировании острой гипобарической гипоксии мозга // Неврологический вестник им. Бехтерева. - 2012. - № 1. - С. 14-19.

4. Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Митрошина Е.В., Мухина И.В. Антигипоксические свойства нейротрофического фактора головного мозга при

моделировании гипоксии в диссоциированных культурах гиппокампа // Современные технологии в медицине. - 2012. - №4. - С. 17-23.

5. Ведунова М.В., Митрошина Е.В., **Сахарнова Т.А.**, Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Хаспеков Л.Г., Мухина И.В. Влияние N-арахидоноилдофамина на функционирование нейронной сети первичной культуры гиппокампа при моделировании гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2013. - Т. 156. - №10. - С. 447-451.

6. Ведунова М.В., **Сахарнова Т.А.**, Митрошина Е.В., Мухина И.В. Изучение роли тирозинкиназного рецептора (TrkB) в реализации нейропротективного и антигипоксического действия нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) при моделировании нормобарической гипоксии *in vitro* // Биомедицинская радиоэлектроника. - 2014. - №4. - С. 13-14.

7. **Сахарнова Т.А.**, Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Мухина И.В. Антигипоксическое и нейропротекторное действие нейротрофических факторов BDNF и GDNF в условиях острой гипобарической гипоксии *in vivo* // Биомедицинская радиоэлектроника. - 2014. - №4. - С. 71-72.

8. Ведунова М.В., **Сахарнова Т.А.**, Митрошина Е.В., Шишкина Т.В., Астраханова Т.А., Мухина И.В. Антигипоксические и нейропротективные свойства нейротрофических факторов BDNF и GDNF при гипоксии *in vitro* и *in vivo* // Журнал Современные технологии в медицине. - 2014. - №4. - С. 38-47.

Публикации в научных журналах, сборниках научных статей, материалах конференций

1. Ведунова М.В., Мухина И.В., Коротченко С.А., **Сахарнова Т.А.**, Исакова А.О., Митрошина Е.В. Роль энергетических субстратов в формировании и развитии нейрон-глиальных сетей // XXI Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. Тезисы докладов. - Москва-Калуга. - 2010. - С. 110-111.

2. **Сахарнова Т.А.**, Ведунова М.В., Коротченко С.А., Мухина И.В. Влияние нейротрофического фактора BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) на спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей диссоциированной культуры гиппокампа // Медицинский альманах. Спецвыпуск. Сборник материалов X-ой научной сессии молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем в медицине». - Нижний Новгород. - 2011. - С. 112-113.

3. **Сахарнова Т.А.**, Ведунова М.В., Коротченко С.А., Мухина И.В. Изучение влияния BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) на спонтанную биоэлектрическую активность первичных диссоциированных культур гиппокампа на разных этапах развития *in vitro* // Медицинский академический журнал. Материалы Всероссийской молодежной конференции - школы «Нейробиология интегративных функций мозга». - Санкт-Петербург. - 2011. - Т. 11. - С. 49.

4. **Sakharnova T.A.**, Vedunova M.V., Mukhina I.V. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as modulator of neural network activity in the developing hippocampal dissociated cultures // 8th FENS Forum 2012. - Barcelona, Spain. - 2012. - V. 6. Abstract Number: A-471-0031-03155.

5. Vedunova M.V., **Sakharnova T.A.**, Mukhina I.V. BDNF effect on the primary hippocampal culture neuron network in the glucose deprivation and hypoxia // 8th FENS Forum 2012. - Barcelona, Spain. - 2012. - V. 6. Abstract Number: A-471-0088-03072.

6. **Сахарнова Т.А.**, Ведунова М.В., Мухина И.В. Влияние BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor) на спонтанную биоэлектрическую активность первичных диссоциированных культур гиппокампа при моделировании гипоксии *in vitro* // Материалы IV Съезда биофизиков России. - Нижний Новгород. - 2012. - С. 128.

7. Vedunova M., **Sakharnova T.**, Mukhina I. BDNF effect on the primary hippocampal culture neuron network in the glucose deprivation // Brain Injury. - 2012. - V. 26 (4-5). - P. 540. International Brain Injury Association's Ninth World Congress on Brain Injury, Edinburgh, Scotland, 2012. - Meeting Abstract: 0460.

8. Mukhina I., Mitroshina E., Vedunova M., Zakharov Yu., Bobrov M., **Sakharnova T.**, Khaspekov L. Modeling and pharmacological modulation of neuronal network activity injury on a microelectrode array // Brain Injury. - 2012. - V.26 (4-5). - P. 477-478. International Brain Injury Association's Ninth World Congress on Brain Injury, Edinburgh, Scotland, 2012. - Meeting Abstract: 0895.

9. Mukhina I.V., Vedunova M.V., Mitroshina E.V., **Sakharnova T.A.**, Kalintseva Ya.I., Zakharov Yu.N., Pimashkin A.S., Kazantsev V.B. Microelectrode arrays and Ca^{2+} imaging in combination with *in vitro* model of stroke as a tool to investigate pathological changes in network activity // Материалы международного симпозиума "Topical Problems of Biophotonics — 2013". - Нижний Новгород. -2013. - С. 245-247.

10. **Sakharnova T.A.**, Vedunova M.V., Mukhina I.V. The effect of the Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and k252a on the spontaneous neural network activity of primary dissociated hippocampal cultures during hypoxia *in vitro* // Материалы международного симпозиума "Topical Problems of Biophotonics — 2013". - Нижний Новгород. - 2013. - С. 249-251.

11. **Сахарнова Т.А.**, Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Мухина И.В. Нейропротекторное действие нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) при моделировании острой гипобарической гипоксии *in vivo* // Материалы XXII Съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова. - Волгоград. - 2013. - С. 467-468.

12. **Sakharnova T.A.**, Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Mukhina I.V. Changes of BDNF-mediated signaling mechanisms during normobaric hypoxia *in vitro* // International Scientific School «Frontiers in modern neuroscience». - Nizhny Novgorod. - 2014. - P. 32-33.

13. **Sakharnova T.A.**, Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Mukhina I.V. TrkB signaling mechanism as a basis for implementation of antihypoxic and neuroprotective action of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) during normobaric hypoxia *in vitro* // Материалы Международного конгресса по нейронаукам. - Красноярск. - 2014. - С. 83.

14. **Sakharnova T.A.**, Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Mukhina I.V. Realisation of neuroprotective and antihypoxic properties of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through TrkB signaling mechanisms during acute normobaric hypoxia *in vitro* // 8th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair. - Magdeburg. - 2014. - Abstract number: 192.

15. **Сахарнова Т.А.**, Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Мухина И.В. Антигипоксическое и нейропротекторное действие нейротрофических факторов BDNF и GDNF в условиях острой гипобарической гипоксии *in vivo* // Материалы Десятого международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». - Судак. - 2014. - С. 288-289.

16. Ведунова М.В., **Сахарнова Т.А.**, Митрошина Е.В., Мухина И.В. Изучение роли тирозинкиназного рецептора (TrkB) в реализации нейропротективного и антигипоксического действия нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) при моделировании нормобарической гипоксии *in vitro* // Материалы Десятого международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». - Судак. - 2014. - С. 99.

17. Vedunova M.V., **Sakharnova T.A.**, Mitroshina E.V., Shishkina T.V., Mukhina I.V. Neurotrophic factors (BDNF, GDNF) modify the functional neural activity and synthesis of the protein p50 during hypoxia *in vitro* // 9th FENS Forum of Neuroscience. - Milan, Italy. - 2014. - Abstract number: FENS-2921.

18. Ведунова М.В., **Сахарнова Т.А.**, Митрошина Е.В., Мухина И.В. Использование методов прижизненной детекции мРНК для изучения молекулярных механизмов нейропротективного действия нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) *in vitro* // Материалы Первого всероссийского симпозиума «Новейшие методы клеточных технологий в медицине». - Новосибирск. - 2014. - С. 52.

19. **Сахарнова Т.А.**, Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Шишкина Т.В., Мухина И.В. Антигипоксические свойства нейротрофических факторов (BDNF, GDNF) при моделировании острой гипоксии *in vivo* и *in vitro* // Материалы Первого всероссийского симпозиума «Новейшие методы клеточных технологий в медицине». - Новосибирск. - 2014. - С. 79.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВУ - высокоустойчивые особи к воздействию острой гипобарической гипоксии

Кз - коэффициент защиты

НУ - низкоустойчивые особи к воздействию острой гипобарической гипоксии

ОГБГ – острая гипобарическая гипоксия

оКс - отсроченный коэффициент сохранения долговременной памяти

СУ - среднеустойчивые особи к воздействию острой гипобарической гипоксии

Тж - время жизни на «высоте»

Тпп - время потери позы

Твп - время восстановления позы

ЦНС – центральная нервная система

Alb - альбумин

BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) - нейротрофический фактор головного мозга

DIV – день развития *in vitro*

MEA (Multielectrode array) - мультиэлектродная система регистрации внеклеточных потенциалов действия

PBS – полифосфатный буфер

TrkB - тирозинкиназный рецептор B