

*На правах рукописи*

**Иванов Андрей Дмитриевич**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ НЕЙРОТРОФИНОВ ПРИ  
УГНЕТЕНИИ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ В ГИППОКАМПЕ БЕТА-  
АМИЛОИДНЫМ ПЕПТИДОМ**

Специальность 03.03.01 – «Физиология»

Специальность 03.01.03 – «Молекулярная биология»

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

**Москва 2015**

Работа выполнена в лаборатории нейрофизиологии обучения и в лаборатории молекулярной нейробиологии Института Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН.

**Научные руководители:**

кандидат биологических наук

**Владимир Александрович Маркевич**

кандидат биологических наук

**Сергей Владимирович Саложин**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, в.н.с., НЦН РАМН

**Солнцева Елена Ивановна**

доктор биологических наук, зав. лаб., ИТЭБ РАН

**Кичигина Валентина Федоровна**

**Ведущая организация:** кафедра ВНД биологического факультета МГУ им. Ломоносова.

Защита состоится 25 марта 2015 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.044.01 при Институте Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул. Бутлерова 5А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН.

Автореферат разослан \_\_ января 2015 года.

Ученый секретарь диссертационного совета, д.б.н.  Иерусалимский В.Н.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Важнейшим свойством ЦНС является способность к постоянным пластическим изменениям, что обеспечивает способность организма приспосабливаться к непрерывно изменяющимся в широких пределах условиям среды. Несмотря на огромный прогресс в понимании механизмов пластичности, до сих пор остается ряд вопросов, касающихся регуляторных и модуляторных механизмов, обеспечивающих пластические перестройки в мозге. Одной из интенсивно изучаемых проблем является исследование роли нейрональных трофических факторов, или нейротрофинов.

Нейротрофины являются группой близкородственных полипептидов, контролирующей дифференцировку, выживание, функционирование, пластичность и гибель нейронов, как в центральной, так и в периферической нервной системе (Гомазков, 2011; Volosin et al., 2006; Conner et al., 2009). К настоящему моменту у млекопитающих обнаружено четыре основных нейротрофических фактора – фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF), нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), нейротрофин-3 (NT-3) и нейротрофин-4 (NT-4). Наибольшее распространение в зрелом мозге имеют NGF и BDNF, в то время как концентрация NT-3 в ЦНС максимальна в ходе эмбрионального развития (Skaper, 2008). Следует отметить, что помимо трофических факторов семейства NGF, существуют и несколько других семейств, однако они гораздо более специфичны и менее широко представлены в ЦНС.

Несмотря на значительное сходство структуры, различные нейротрофины выполняют в ЦНС различные функции (Lu et al., 2005; Reichardt, 2006; Skaper, 2008). Течение целого ряда нейродегенеративных заболеваний, в т.ч. болезни Альцгеймера, сопровождается снижением синтеза и нарушением процессинга нейротрофических факторов (Bruno et al., 2009; Allard et al., 2012). Существует множество работ, описывающих нейропротекторное действие нейротрофинов, преимущественно, NGF (Cooper et al., 2001; Blesh et al., 2005) и BDNF (Vemelmans et al., 2006; Husson et al., 2005). В последние годы сформулирована и частично подтверждена комплексная гипотеза BDNF-зависимой синаптической пластичности, посвященная роли этого нейротрофина в реализации процессов долговременной пластичности и консолидации (Gomez-Palacio-Schjetnan, Escobar, 2013). К сожалению, большинство этих работ выполнено на клеточных культурах, на периферической нервной системе, или на специфических моделях трансгенных животных. Эксперименты на целых животных, а также на переживающих срезах мозга, способные дать наиболее интересные результаты были затруднены вследствие тяжелых побочных эффектов, таких как развитие хронических болей при внутрижелудочковом введении NGF.

Новые возможности в этой области появились благодаря молекулярно-биологическим методам, таким как метод вирусной трансдукции (Саложин, Большаков, 2008; Степаничев, 2011; Cattaneo et al., 2008). Использование вирусной трансдукции позволяет обеспечить устойчивую локальную сверхэкспрессию нейротрофинов после однократной инъекции и с минимальным сопутствующим нейровоспалением.

Эффекты и механизмы воздействия нейротрофинов на зрелые нейроны ЦНС в нормальных и патологических условиях являются в данный момент актуальной научной проблемой, над которой работают ведущие коллективы исследователей во всем мире (Ferreira et al., 2014; Wang et al., 2014). Сочетание традиционных электрофизиологических и новейших молекулярно-биологических методов в рамках комплексных экспериментов позволяет надеяться на ее успешное разрешение.

### **Цель работы и основные задачи исследования.**

Основной целью работы было изучение влияния хронического увеличения концентрации фактора роста нервов и нейротрофического фактора мозга в зубчатой фасции гиппокампа на пластичность нейронов в нормальных условиях и при моделировании нейропатологии альцгеймеровского типа.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Обеспечить долговременное увеличение концентрации исследуемых нейротрофинов в гиппокампе крыс методом лентивирусной трансдукции.
2. Экспериментально подобрать оптимальную концентрацию токсического фрагмента бета-амилоидного пептида для моделирования патологических условий *in vitro*.
3. Исследовать влияние сверхэкспрессии NGF и BDNF на параметры длительной посттетанической потенциации в нормальных и патологических условиях *in vitro*.
4. Выявить механизмы реализации обнаруженных эффектов нейротрофинов, используя ингибиторы киназных каскадов рецепторов группы Trk.

### **Научная новизна**

На переживающих срезах мозга крыс впервые продемонстрировано различие функций родственных нейротрофинов NGF и BDNF. Подтверждена гипотеза о защитном действии фактора роста нервов на нейроны зубчатой фасции гиппокампа в патологических условиях. Впервые исследована роль киназных каскадов рецептора TrkA в реализации зарегистрированного протекторного эффекта увлечения уровня NGF вследствие сверхэкспрессии. Экспериментально показано, что нейротрофический фактор мозга, высоко гомологичный по аминокислотной последовательности фактору роста нервов, в отличие от

последнего не обладает выраженным нейропротекторным потенциалом в рамках использованной модели нарушения синаптической пластичности при нейропатологии альцгеймеровского типа.

### **Теоретическая ценность и практическая значимость.**

Нейротрофины семейства NGF давно рассматриваются в качестве перспективных терапевтических агентов, которые могут быть использованы для лечения различных нейропатологий, в т.ч. болезней Альцгеймера и Паркинсона, рассеянного склероза и последствий травм. Результаты данной работы подтверждают нейропротекторный потенциал фактора роста нервов в рамках адекватной альцгеймеро-подобной модели нарушения синаптической пластичности нейронов гиппокампа. Вместе с тем, полученные результаты позволяют считать маловероятным успешное применение нейротрофического фактора мозга, по крайней мере, для лечения болезни Альцгеймера.

Использованные в работе методические подходы к локальному хроническому увеличению концентрации соответствующих нейротрофинов в специфических структурах ЦНС представляют несомненный практический интерес, так как могут в будущем быть применены в клинической практике.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Двукратный избыток фактора роста нервов защищает нейроны зубчатой фасции крыс Вистар P20-P25 от патогенного действия бета-амилоидного пептида (25-35). Обнаруженный нейропротекторный эффект реализуется через активацию киназного каскада фосфатидилинозитол-3-киназы.
2. Увеличение концентрации нейротрофического фактора мозга в зубчатой фасции гиппокампа не изменяет нормальную динамику долговременной потенциации *in vitro* и не оказывает заметного нейропротекторного эффекта.

### **Апробация материалов диссертации**

Основные результаты работы были доложены на Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток» (Звенигород, 2011), 8-м и 9-м Европейских Форумах по нейронаукам (Барселона, 2012; Милан, 2014), Летней международной школе European Synapse Summer School (Бордо, 2013), Конференции «Доклинические исследования: современные методы и возможности» (Москва, 2014), на школах-конференциях молодых ученых ИВНД и НФ РАН (Москва, 2011, 2012, 2013) и апробированы на межлабораторной конференции ИВНД и НФ РАН (Москва, 2014).

## **Структура диссертации**

Диссертационная работа представлена на 82 страницах машинописного текста и состоит из следующих частей: введение, обзор литературы, методы исследования, результаты и их обсуждение (4 главы), заключение, выводы, список литературы (142 источника). Материал проиллюстрирован 11 рисунками.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Создание генно-инженерных конструкций для обеспечения оверэкспрессии NGF и BDNF в гиппокампе.**

Для обеспечения стабильного долговременного увеличения концентраций исследуемых нейротрофинов в гиппокампе ювенильных крыс Вистар была использована технология лентивирусной трансдукции. Стандартными молекулярно-биологическими методами были получены генно-инженерные конструкции для сборки лентивирусов, суспензии которых были затем стереотаксически инъецированы в зубчатые фасции животных. В работе были использованы 3 системы, основанные соответственно на конструкциях рCMV-NGF, рCMV-BDNF и рCMV (контроль). Все конструкции также содержали ген зеленого флуоресцентного белка GFP для облегчения визуализации области заражения.

### **Стереотаксическая инъекция лентивирусных суспензий в зубчатые фасции гиппокампов ювенильных самцов крыс Вистар *in vivo*.**

Всего в работе было использовано 60 самцов крыс линии Вистар P20-P25 (50-70 g) из питомника «Столбовая» РАН (Московская область). Для анестезии использовался 8% раствор хлоралгидрата внутривентриально. Инъекции осуществляли в зубчатую фасцию гиппокампа (скорость введения 0,5 мл/мин, объем суспензии – 2 мл) по координатам AP – 2,5; ML –1,5; DV –3,5. После операции животных содержали в виварии в течение недели.

### **Приготовление переживающих срезов мозга.**

Через неделю после инъекции вирусной суспензии, животные были декапитированы с помощью гильотины. Переживающие 500 мкм фронтальные срезы мозга изготавливались стандартным способом на вибротоме.

### **Инкубация срезов соответствующих групп в растворе бета-амилоида (25-35) и/или в растворах ингибиторов киназных каскадов рецептора бета-амилоида TrkA.**

Для моделирования острых нарушений синаптической пластичности срезы перемещали на 1 час в оксигенируемый раствор  $\beta$ -амилоидного пептида (A $\beta$  25-35), либо контрольного  $\beta$ -амилоидного пептида с обратной аминокислотной последовательностью (A $\beta$  35-32). В ходе экспериментов были опробованы концентрации  $\beta$ -амилоида 20, 50 и 100 нМ.

Для исследования роли киназных каскадов рецепторов Trk в реализации протекторного эффекта NGF, срезы инкубировали в течение часа в растворах специфических ингибиторов: 20  $\mu$ М растворе LY294002 (ингибитора PI3K), 20  $\mu$ М растворе U0126 (ингибитора MAPK) и 20  $\mu$ М U-73122 (ингибитора PLC). Инкубацию производили как вместе, так и отдельно от инкубации в A $\beta$ .

### **Исследование изменений динамики и мощности долговременной посттетанической потенциации вследствие оверэкспрессии NGF и BDNF в нормальных и патологических условиях.**

Срезы перемещали в экспериментальные камеры установки Scientifica Slicemaster, после чего в среднюю часть верхнего рога гранулярного слоя зубчатой извилины вводили регистрирующий электрод с сопротивлением 5-10 М $\Omega$ , а в медиальный продольный пучок – стимулирующий биполярный электрод.

Для каждого среза производили получасовую запись фокальных вызванных постсинаптических потенциалов (ВПСП). При обработке результатов, средняя амплитуда фокальных ВПСП до тетанизации принималась за 100%, и с ней сравнивали ВПСП после тетанизации. Далее для индукции долговременной потенциации срезы подвергали высокочастотной тетанизации (четыре пачки по 100 стимулов частотой 100 Гц с интервалом 20 секунд между пачками). Регистрацию ВПСП после тетанизации производили еще 2 часа.

### **Количественная оценка эффективности вирусной трансдукции клеток гиппокампа с помощью иммуноферментного анализа концентраций NGF и BDNF.**

Часть инъекцированных животных была использована в качестве материала для оценки эффективности лентивирусной трансдукции методом иммуноферментного анализа. Для измерения концентраций NGF и BDNF в гомогенате гиппокампов использовали наборы CYT304 ChemiKine NGF Sandwich ELISA и CYT306 ChemiKine BDNF Sandwich ELISA (Millipore). Анализы производились в соответствии с протоколом, представленным производителем наборов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

**Локальная лентивирусная трансдукция привела к двукратному увеличению концентрации фактора роста нервов и нейротрофического фактора мозга в гиппокампе крыс.**

Для обеспечения стабильного долговременного увеличения концентраций исследуемых нейротрофинов в гиппокампе ювенильных крыс Вистар была использована технология лентивирусной трансдукции. Стандартными молекулярно-биологическими методами были получены генно-инженерные конструкции для сборки лентивирусов, суспензии которых были затем стереотаксически инъецированы в зубчатые фасции животных. В работе были использованы 3 системы, основанные соответственно на конструкциях pCMV-NGF, pCMV-BDNF и pCMV (контроль). Все конструкции также содержали ген зеленого флуоресцентного белка GFP для облегчения визуализации области заражения.

Через неделю животные были гильотинированы, а их гиппокампы были изъяты и подвергнуты биохимическому исследованию. Морфологическое обследование фиксированных срезов мозга выявило наличие зоны сплошного вирусного заражения в зубчатой фасции ипсилатерального полушария.

Концентрации исследуемых нейротрофических факторов были исследованы в гомогенате гиппокампов животных методом иммуно-ферментного анализа.

Инъекция контрольного вируса pCMV не приводила к каким-либо изменениям уровней нейротрофинов. После инъекции pCMV-NGF и pCMV-BDNF, концентрации соответственно фактора роста нервов и нейротрофического фактора мозга увеличились примерно вдвое по сравнению с контролем (рис. 1 и 2).

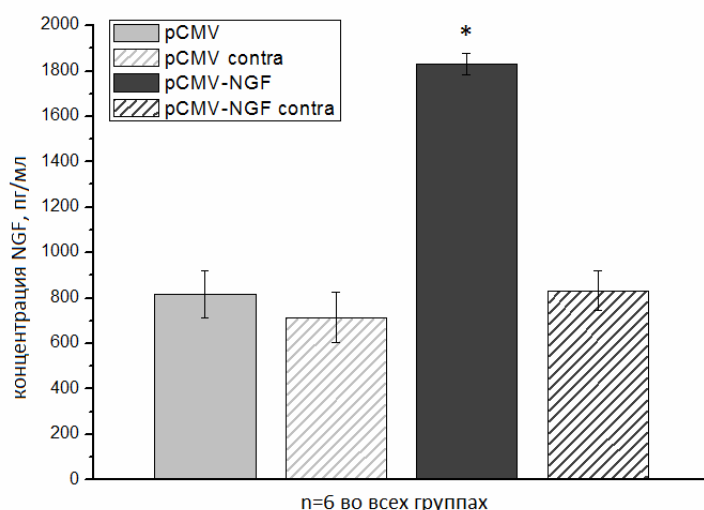


Рис. 1. Увеличение концентрации NGF после вирусной трансдукции. Темно-серым – группа, трансдуцированная вирусом pCMV-NGF, светло-серым – группа,



трансдуцированная контрольным вирусом pCMV. Штриховка – образцы из контралатеральных гиппокампов соответствующих животных.

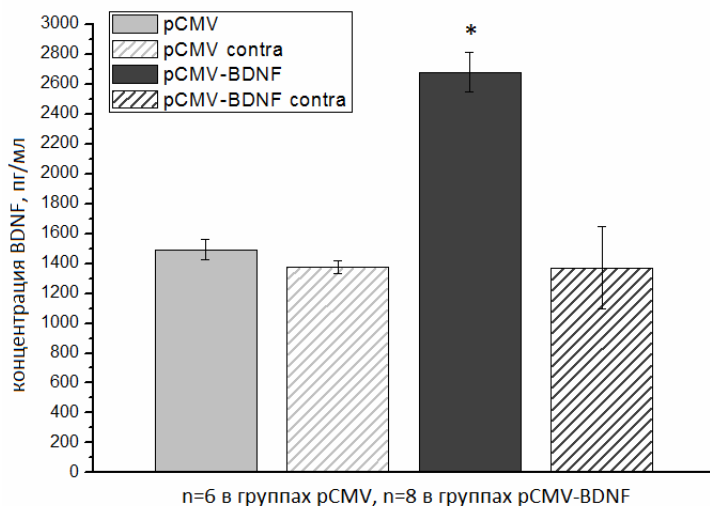


Рис. 2. Увеличение концентрации BDNF после вирусной трансдукции. Темно-серым – группа, трансдуцированная вирусом pCMV-BDNF, светло-серым – группа, трансдуцированная контрольным вирусом pCMV. Штриховка – образцы из контралатеральных гиппокампов соответствующих животных.

### **Избыток NGF и BDNF не влияет на динамику долговременной потенциации в зубчатой фасции *in vitro* в нормальных условиях.**

В ходе электрофизиологических экспериментов на переживающих срезах мозга была исследована мощность и динамика вызываемой высокочастотной тетанизацией долговременной потенциации в синапсе зубчатая фасция – перфорантный путь. Группа чистого контроля и группа, трансдуцированная контрольным вирусом pCMV продемонстрировали статистически неразличимые результаты. После тетанизации средняя амплитуда фокальных ВПСП составила в этих группах  $200,7 \pm 10,8\%$  (n=8) и  $196,8 \pm 12,3\%$  (n=6) от средней амплитуды ВПСП до тетанизации (рис. 3).

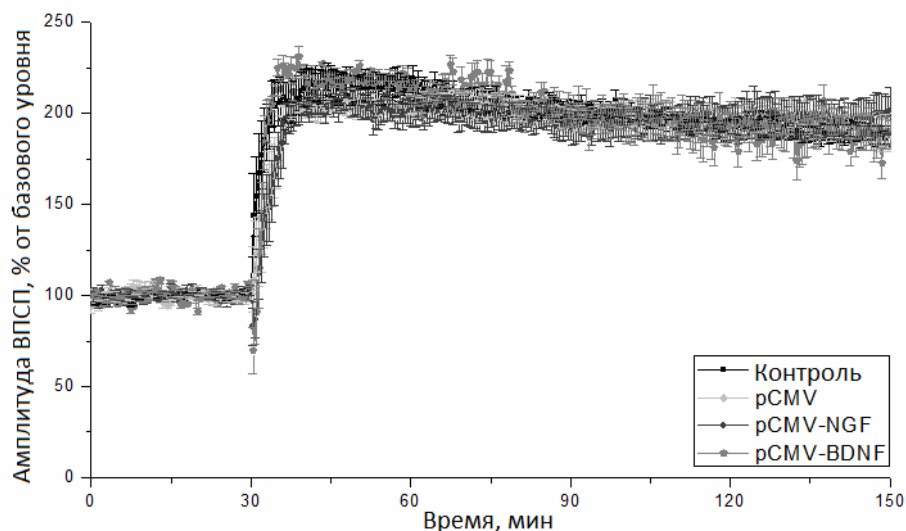


Рис 3. Динамика развития долговременной потенциации в нормальных условиях. Черным – интактный контроль, светло-серым – вирусный контроль pCMV, темно-серым – группа с оверэкспрессией NGF, серым – группа с оверэкспрессией BDNF. Значения здесь и далее представлены в виде процентов от средней амплитуды ВПСП до тетанизации, разброс – ошибка среднего.

Срезы из обеих групп с оверэкспрессией нейротрофинов продемонстрировали в нормальных условиях потенциацию, не отличающуюся от потенциации контрольных групп (рис. 3). В группе pCMV-NGF средняя амплитуда ВПСП после тетанизации составила  $195,4 \pm 14,7\%$  ( $n=6$ ), а в группе pCMV-BDNF –  $201,3 \pm 18,3\%$  ( $n=5$ ). Однофакторный дисперсионный анализ не выявил значимых различий между всеми четырьмя группами:  $F(3,1200)=0,90$   $p=0,44$  (ANOVA).

#### **Часовая инкубация срезов мозга в 50 нМ растворе бета-амилоидного пептида (A $\beta$ ) препятствует индукции долговременной потенциации.**

Для моделирования патологических условий в данной работе был использован  $\beta$ -амилоидный пептид, нарушение метаболизма которого считается одним из центральных элементов развития нейродегенерации при болезни Альцгеймера. Хорошо известна способность растворимого A $\beta$  угнетать синаптическую пластичность в гиппокампе крыс *in vivo*. Рабочая концентрация A $\beta$  была установлена опытным путем (рис. 4).

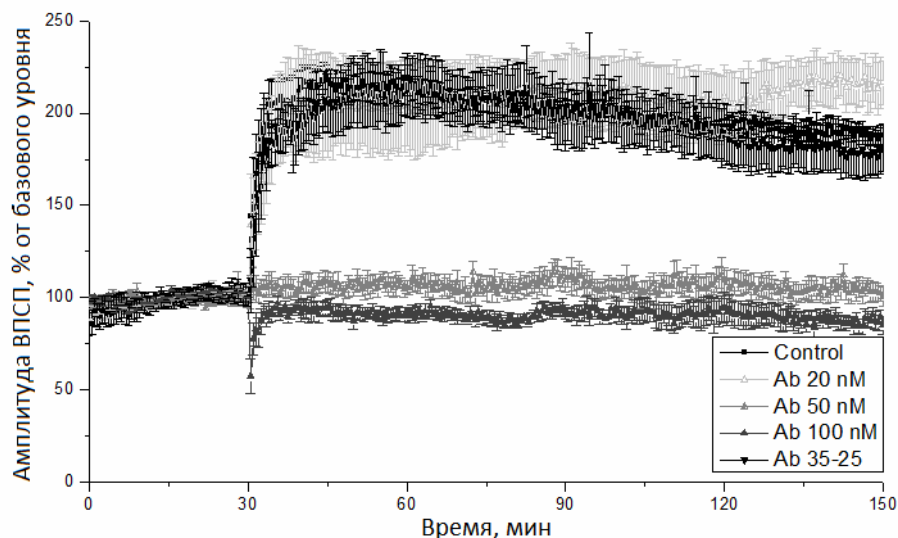


Рис. 4. Дозо-зависимое угнетение долговременной потенциации в зубчатой фасции  $\beta$ -амилоидом. Черным – интактный контроль и контрольный  $A\beta$  35-25, светло-серым – инкубация срезов в 20 нМ, серым – в 50 нМ, темно-серым – в 100 нМ растворе  $A\beta$ .

Концентрация  $A\beta$  20 нМ оказалась недостаточной для угнетения долговременной потенциации. Средняя амплитуда ВПСИ после тетанизации составила в этой группе  $207,1 \pm 10,5\%$  ( $n=4$ ), тогда как в группе чистого контроля она равнялась  $200,7 \pm 10,8\%$  ( $n=8$ ), а в группе контрольного  $A\beta$  35-25 с обратной аминокислотной последовательностью –  $196,0 \pm 14,3\%$  ( $n=5$ ).

Инкубация срезов как в 50 нМ, так и в 100 нМ растворе  $A\beta$ /ACSF приводила к полной блокаде долговременной потенциации. Средняя амплитуда фокальных ВПСИ в группе срезов, инкубированных в 50 нМ растворе  $A\beta$ , составила  $106,1 \pm 2,7\%$  ( $n=5$ ), а в группе срезов, инкубированных в 100 нМ растворе –  $90,2 \pm 3,4\%$  ( $n=5$ ). Показатели обеих групп достоверно отличались от результатов как группы чистого контроля ( $p < 0,0001$ ), так и 20 нМ  $A\beta$  ( $p < 0,0001$ ), и  $A\beta$  35-25 ( $p < 0,0001$ ). В дальнейших экспериментах была использована концентрация раствора  $A\beta$ /ACSF 50 нМ – минимальная достаточная для предотвращения индукции LTP.

#### **Различия в нейротрофакторном эффекте NGF и BDNF.**

Защитное действие нейротрофинов, прежде всего фактора роста нервов, многократно описано в литературе (Blesh et al., 2005; Tuszynski et al., 2007; Skaper, 2008; Ubhi et al., 2013). Вместе с тем, до сих пор неясно, обладают ли таким свойством все нейротрофины семейства NGF в равной степени, и проявляется ли этот эффект на более сложных моделях, чем клеточные культуры.

В данном эксперименте инкубации в 50 нМ растворе  $A\beta$  были подвергнуты срезы мозга животных, получивших за неделю до этого инъекции вирусных суспензий,

вызывающих увеличение концентрации NGF или BDNF. В качестве контроля выступали срезы мозга интактных животных, и животных, которым был инъецирован контрольный вирус pCMV.

Как и ожидалось, в обеих контрольных группах воздействие A $\beta$  полностью предотвратило развитие долговременной потенциации (рис. 5). Средняя амплитуда ВПСП после тетанизации составила в группе A $\beta$   $106,1 \pm 2,7\%$  (n=5), а в группе pCMV+A $\beta$  –  $104,4 \pm 4,6\%$  (n=6).

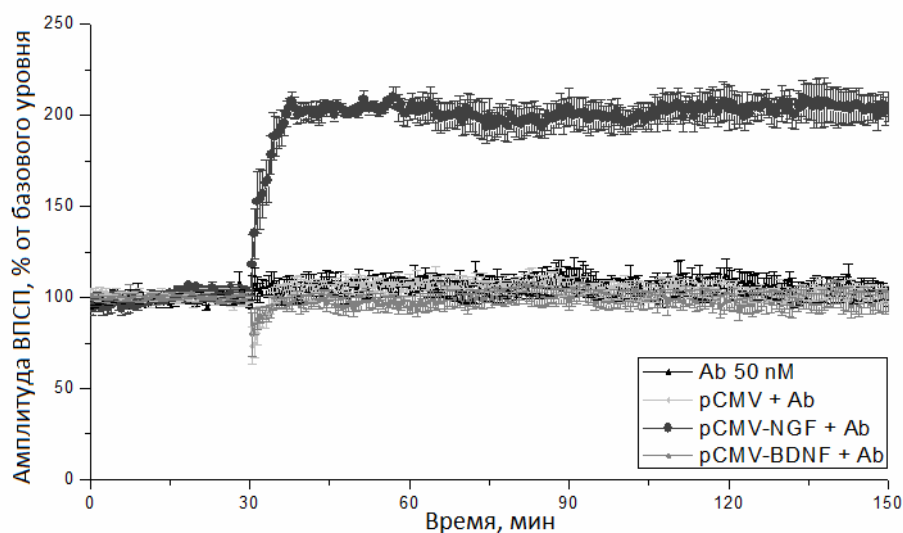


Рис 5. Динамика развития долговременной потенциации после инкубации срезов в растворе A $\beta$ . Черным – контроль, светло-серым – pCMV, темно-серым – группа с оверэкспрессией NGF, серым – группа с оверэкспрессией BDNF.

Результаты групп NGF и BDNF отличались. Группа с оверэкспрессией фактора роста нервов продемонстрировала нормальную мощность и динамику развития LTP ( $200,3 \pm 10,1\%$  n=6), достоверно отличающуюся от показателей групп чистого контроля ( $p < 0,0001$ ) и контроля pCMV ( $p < 0,0001$ ).

Группа с оверэкспрессией нейротрофического фактора мозга, напротив, показала результат, близкий к показателям контрольных групп:  $98,3 \pm 2,9\%$  (n=5). Очевидно наличие значимых различий между результатами групп BDNF и NGF ( $p < 0,0001$ ).

Полученные в ходе эксперимента данные заставляют отвергнуть основанное на высокой структурной гомологичности NGF и BDNF допущение о сходстве выполняемых ими функций. В рамках господствующей в настоящий момент синтетической гипотезы BDNF-зависимой синаптической консолидации, трофическая поддержка без сомнения критически важна для обеспечения синаптической передачи, однако до сих пор не опубликованы прямые доказательства способности BDNF оказывать прямое

нейропротекторное действие на нейроны, за исключением редукционных моделей на базе клеточных культур (Gomez-Palacio-Schjetnan, Escobar, 2013; Park, Poo, 2013).

Нейропротекторные свойства NGF описаны в литературе гораздо обширнее, хотя чаще всего также на простых клеточных моделях. Трофическая поддержка, обеспечиваемая фактором роста нервов, критически важна для выживания нейронов как такового (Allen, Dawbarn, 2006; Capsoni, Cattaneo, 2006; Skaper, 2008). Менее ясна роль NGF в поддержании нормального функционального состояния нейронов и оптимального уровня синаптической пластичности. Результаты данной работы позволяют утверждать, что избыток NGF способен предотвратить нарушение пластичности нейронов гиппокампа, вызванное патогенным действием растворимого  $\beta$ -амилоидного пептида. К сходным выводам могут косвенно привести и некоторые недавно опубликованные работы. В 2012 году Тиан с соавторами продемонстрировал, что интраназальное введение фактора роста нервов улучшает результаты крыс, перенесших травматическое повреждение мозга, в пространственных поведенческих тестах и одновременно снижает уровни APP and A $\beta$  (1-42) в их мозге (Tian et al., 2012).

Вероятнее всего, обнаруженные различия между протекторными возможностями NGF и BDNF связаны с различием характеристик рецепторов TrkA и TrkB. В недавней статье Джеронимо-Сантоса с коллегами показано, что обработка первичных культур нейронов неокортекса A $\beta$  (25-35) ведет к нарушению структуры рецепторов TrkB и снижению BDNF-зависимого сигналинга (Jeronimo-Santos et al., 2014). Кроме того, в той же работе упоминается способность A $\beta$  предотвращать BDNF-LTP в синапсах поля CA1 гиппокампа. В сочетании с результатами настоящей работы, вышеизложенное заставляет предположить, что нейротрофический фактор мозга не может обладать нейропротекторным эффектом, по крайней мере, в случае патологических процессов, связанных с нарушением метаболизма  $\beta$ -амилоидного пептида, из-за неустойчивости к последнему его рецепторов TrkB.

### **Реализация нейропротекторного эффекта фактора роста нервов зависит от активности каскада фосфатидилинозитол-3-киназы.**

Обнаруженный защитный эффект NGF может быть связан с увеличением активности какого-либо из трех каскадов рецептора TrkA: каскада MAPK, каскада PI3K и каскада PLC- $\gamma$ 1. Все они играют важную роль в процессах индукции, консолидации и поддержания долговременной потенциации и, следовательно, могут отвечать за реализацию нейропротекторного потенциала фактора роста нервов. Для выявления значимости вклада каждого из каскадов в развитие итогового защитного эффекта были

произведены электрофизиологические эксперименты с использованием селективных ингибиторов активности соответствующих киназ.

Однозначный вывод по итогам экспериментов возможно сделать лишь о критической важности каскада PI3K, подавление которого специфическим ингибитором LY294002 приводило к неспособности срезов с увеличенным уровнем NGF противостоять патогенному действию  $\beta$ -амилоида (рис. 6).

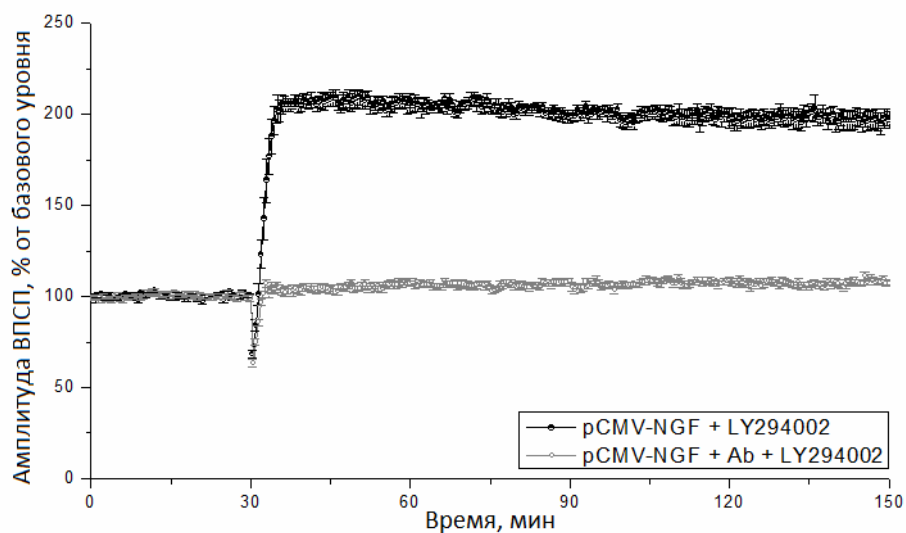


Рис. 6. Динамика развития долговременной потенциации в условиях подавления активности каскада PI3K. Черным — срезы группы с оверэкспрессией NGF, инкубированные в растворе LY294002; серым — срезы группы с оверэкспрессией NGF, инкубированные в растворах LY294002 и  $\text{A}\beta$ .

Важно отметить, что в общепризнанной схеме активации рецептора TrkA именно через каскад PI3K реализуется защита нейронов от гибели в патологических условиях. Результаты данной работы вполне согласуются с этой концепцией, хотя использованная модель патологии ведет не к гибели нейронов, а к выведению их из рабочего функционального состояния.

Зависимость протекторного действия NGF от двух других каскадов рецептора TrkA не была подтверждена экспериментально. Ингибирование активности MAPK ожидаемо приводило к полному угнетению долговременной потенциации во всех срезах, независимо от концентрации в них фактора роста нервов. Подавление сигналинга каскада PLC, напротив, не оказало никакого заметного влияния на развитие потенциации как в группе срезов с оверэкспрессией NGF, так и в группе срезов с оверэкспрессией NGF, инкубированных в растворе бета-амилоида. Таким образом, хотя дальнейшие эксперименты могут выявить какую-либо роль каскадов MAPK и PLC в защитном эффекте NGF, эта роль явно менее значительна, чем роль каскада PI3K.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данной работы позволяют прояснить вопрос о специфичности действия родственных нейротрофинов NGF и BDNF на нейроны гиппокампа. В рамках использованной в работе модели быстрого угнетения синаптической пластичности растворимым фрагментом бета-амилоидного пептида (25-35), хроническое увеличение концентрации фактора роста нервов успешно защищало нейроны зубчатой фасции от патогенного воздействия и способствовало поддержанию их оптимального функционального состояния *in vitro*. В то же время, в аналогичных условиях, сравнимое хроническое увеличение концентрации нейротрофического фактора мозга не оказывало какого-либо заметного протекторного действия и оказалось неспособным поддержать нормальную динамику долговременной потенциации в синапсе зубчатая фасция-перфорантный путь.

Дальнейшие эксперименты, основанные на поочередном блокировании активности киназных каскадов рецептора NGF TrkA, выявили критическую важность каскада фосфатидилинозитол-3-киназы для реализации обнаруженного защитного действия фактора роста нервов.

В соответствии с классической схемой обеспечения нейронов трофической поддержкой, хроническое увеличение концентрации нейротрофинов само по себе не вызвало каких-либо заметных изменений синаптической пластичности в нормальных условиях. Широко известный феномен модуляции пластичности нейротрофическим фактором мозга не мог быть зарегистрирован в ходе экспериментов, так как связан с быстрыми изменениями активности BDNF-зависимого сигналинга. Вопрос о пластических свойствах нейротрофинов, таким образом, требует дальнейших исследований. Вместе с тем, полученные данные об отсутствии влияния оверэкспрессии NGF на динамику LTP в нормальных условиях, вкупе с исследованным нейропротекторным эффектом подтверждают перспективность использования фактора роста нервов в качестве возможного терапевтического агента.

## ВЫВОДЫ

1. В результате локальной лентивирусной трансдукции было достигнуто двукратное увеличение концентраций NGF и BDNF в зубчатой фасции гиппокампа экспериментальных животных.
2. В отсутствие воздействия патогена увеличение концентраций исследованных нейротрофинов не оказывает заметного влияния на динамику долговременной потенциации в синапсе перфорантный путь – зубчатая фасция *in vitro*.

3. Часовая инкубация переживающих срезов мозга крыс в 50 нМ растворе Аβ приводит к полной блокаде индукции долговременной потенциации.
4. Увеличение концентрации фактора роста нервов в два раза достаточно для защиты нейронов зубчатой фасции от нарушения пластичности вызванного 50 нМ Аβ.
5. Увеличение концентрации нейротрофического фактора мозга в два раза не оказывает протекторного эффекта при инкубации срезов в 50 нМ растворе Аβ.
6. Для реализации обнаруженного защитного эффекта NGF критически важна активность PI3K-зависимого сигнального каскада.

### СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ

*Иванов А.Д.* Роль NGF и BDNF в регуляции деятельности зрелого мозга // Журн. высш. нерв. деят. 2014. 64(2): 137-146.

*Тухбатова Г.Р., Кулешова Е.П., Иванов А.Д., Степаничев М.Ю., Саложин С.В.* Оптимизация метода получения лентивирусных частиц для трансдукции нейронов in vivo // Нейрохимия. 2011. 28(4): 333-339.

*Ivanov A.D., Tukhbatova G.R., Salozhin S.V., Markevich V.A.* NGF but not BDNF overexpression protects hippocampal LTP from  $\beta$ -amyloid-induced impairment // Neuroscience. 2015. [doi:10.1016/j.neuroscience.2014.12.063](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.063).

*Иванов А.Д.* Прямое доказательство защитного действия оверэкспрессии фактора роста нервов (NGF) в амилоидной модели болезни Альцгеймера // Тезисы доклада на XVII научной школе-конференции молодых ученых, Москва, ИВНДиНФ РАН, 21-23 октября 2013.

*Иванов А.Д., Тухбатова Г.Р.* NGF, в отличие от BDNF, защищает пластичность нейронов гиппокампа от негативного действия  $\beta$ -амилоида // Тезисы доклада на конференции «Доклинические исследования: современные методы и возможности», Москва, 2014.

*Иванов А.Д., Тухбатова Г.Р., Узаков Ш.С., Кулешова Е.П.* Функциональные изменения в мозге крыс при локальной лентивирусной трансдукции фактора роста нервов // Тезисы доклада на XV научной школе-конференции молодых ученых, Москва, ИВНДиНФ РАН, октябрь 2011.

*Иванов А.Д., Узаков Ш.С.* Влияние долговременного увеличения концентрации фактора роста нервов на функциональные свойства нейронов гиппокампа // Тезисы доклада на XVI научной школе-конференции молодых ученых, Москва, ИВНДиНФ РАН, 23-24 октября 2012.



*Ivanov A.D.* Protective impact of lentivirally-delivered neurotrophins on hippocampal LTP decrease caused by beta-amyloid // European Synapse Summer School (abstract), France, Bordeaux, University Bordeaux 2, 9-27 September 2013.

*Ivanov A.D., Tukhatova G.R., Markevich V.A.* Difference in NGF and BDNF overexpression effect on hippocampal LTP under  $\beta$ -amyloid induced impairment // 9th FENS forum (abstract), Milan, Italy, July 2014.

*Ivanov A.D., Uzakov Sh.S., Tukhatova G.R., Kuleshova E.P., Stepanichev M.Yu., Markevich V.A., Gulaeva N.V., Salozhin S.V.* Lentivirally-derived NGF protects hippocampal *in vivo* LTP from  $\beta$ -amyloid induced impairment // 8th FENS forum (abstract), Barcelona, Spain, July 2012.