

**Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Науки
Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН**

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»

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

кандидат биологических наук

Владимир Александрович Маркевич

кандидат биологических наук

Сергей Владимирович Саложин

Москва 2015

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	1
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	Error! Bookmark not defined.
1.1. Синтез, процессинг и транспорт нейротрофинов.	Error! Bookmark not defined.
1.2. Рецепторы нейротрофинов.	Error! Bookmark not defined.
1.3. Фактор роста нервов (NGF).	Error! Bookmark not defined.
1.4. Нейротрофический фактор мозга (BDNF).	17
1.5. Моделирование патологических условий с помощью бета-амилоида.....	21
1.6. Заключение	Error! Bookmark not defined.
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	24
2.1. Создание генно-инженерной конструкции для обеспечения сверхэкспрессии NGF и BDNF в гиппокампе.....	24
2.1.1. Получение генов NGF и BDNF методом полимеразной цепной реакции ...	24
2.1.2. Клонирование ПЦР-продуктов в «служебный» p-GEM-T вектор.....	25
2.1.3. Подготовка генов NGF и BDNF к клонированию в рабочий вектор.....	25
2.1.4. Подготовка рабочего вектора к клонированию.	26
2.1.5. Лигирование генов NGF и BDNF в вектор pCMV.	27
2.1.6. Трансформация компетентных клеток и выделение плазмидных ДНК.....	27
2.1.7. Рестрикционный анализ.	28
2.1.8. Сборка вирусных систем для обеспечения сверхэкспрессии NGF и BDNF..	29
2.2. Исследование влияния сверхэкспрессии NGF и BDNF на параметры LTP в гиппокампе крыс в нормальных и патологических условиях.....	29
2.2.1. Содержание животных.....	30
2.2.2. Инъекция лентивирусных суспензий в зубчатые фасции гиппокампов экспериментальных животных.....	30
2.2.3. Приготовление переживающих срезов мозга.....	30
2.2.4. Инкубация срезов в растворе β -амилоидного пептида.	31
2.2.5. Перемещение срезов в экспериментальную камеру и установка электродов.	31
2.2.6. Поиск оптимального сигнала и подбор рабочей интенсивности стимула. ..	32
2.2.7. Регистрация ВПСП.....	33
2.2.8. Парная стимуляция	33
2.2.9. Тетанизация.	34
2.2.10. Инкубация срезов в растворах ингибиторов киназных каскадов.....	34
2.2.11. Обработка результатов.....	34

2.3. Оценка эффективности лентивирусной трансдукции.....	35
2.3.1. Визуализация трансдуцированных клеток.....	35
2.3.2. Количественная оценка изменения концентраций NGF и BDNF в гиппокампе экспериментальных животных вследствие лентивирусной трансдукции.....	36
2.4. Заключение.....	37

ГЛАВА 3. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕНТИВИРУСНОЙ

ТРАНСДУКЦИИ..... 38

3.1. Локализация трансдуцированных клеток.....	38
3.2. Увеличение концентрации NGF и BDNF вследствие вирусной трансдукции.....	39
3.3. Заключение.....	43

ГЛАВА 4. ДОЛГОВРЕМЕННАЯ ПОТЕНЦИАЦИЯ НА ФОНЕ

ОВЕРЭКСПРЕССИИ НЕЙРОТРОФИНОВ В НОРМАЛЬНЫХ

УСЛОВИЯХ..... 44

4.1. Контрольные группы.....	44
4.2. Группы с оверэкспрессией нейротрофинов.....	46
4.3. Парное отношение и пресинаптический компонент пластичности.....	48
4.4. Заключение.....	49

ГЛАВА 5. ДОЛГОВРЕМЕННАЯ ПОТЕНЦИАЦИЯ НА ФОНЕ

ОВЕРЭКСПРЕССИИ НЕЙРОТРОФИНОВ В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ

УСЛОВИЯХ.....Error! Bookmark not defined.

5.1. Подавление посттетанической потенциации бета-амилоидным пептидом.**Error! Bookmark not defined.**

5.2. Различия в нейропротекторном эффекте NGF и BDNF.....	53
5.3. Заключение.....	56

ГЛАВА 6. ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ

НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ.

.....Error! Bookmark not defined.

6.1. Каскад фосфатидилинозитол-3-киназы.....	58
6.2. Каскад активируемой митогенами протеин-киназы. Error! Bookmark not defined.	
6.3. Каскад фосфолипазы-С.....	62
6.3. Заключение.....	64

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 65

ВЫВОДЫ..... 66

БЛАГОДАРНОСТИ 67

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 68

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

A β – бета-амилоидный пептид

ВПСП – возбуждающий постсинаптический потенциал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

ПНС – периферическая нервная система

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЦНС – центральная нервная система

ACSF – artificial cerebrospinal fluid, искусственная цереброспинальная жидкость

Akt (PKB) – протеин киназа B

AMPA-рецептор – ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовую кислоту

Arc – регулируемый активностью ассоциированный с цитоскелетом белок

BDNF – brain-derived neurotrophic factor; нейротрофический фактор мозга

CA1 – cornu ammonis 1; поле CA1 гиппокампа

CaMKII – Ca²⁺/кальмодулин-зависимая киназа II

CIAP – calf intestine alkaline phosphatase; щелочная фосфатаза кишечника теленка

CMV – цитомегаловирус

CREB – cAMP response element-binding protein; белок связывания регуляторного элемента цАМФ

DG – зубчатая фасция гиппокампа

GFP – green fluorescent protein; зеленый флуоресцентный белок

IP3 – инозитол-трифосфат

IRES — internal ribosome entry site; внутренний участок посадки рибосомы

JNK – C-Jun N-terminal kinase; C-Jun-N-концевая киназа

LTP – long-term potentiation; долговременная потенция (E-LTP – ранняя фаза, L-LTP – поздняя фаза)

LY294002 — специфический ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы

MAPK – mitogen-activated protein kinase; активируемая митогеном протеин-киназа

MPP – медиальный перфорантный пучок

NF κ B – neuronal factor κ B, ядерный фактор каппа В

NGF – nerve growth factor; фактор роста нервов

NMDAR – ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат

NT-3 – neurotrophin-3; нейротрофин-3

NT-4 – neurotrophin-4; нейротрофин-4

p75^{NTR} – рецептор нейротрофинов p75

PBS – фосфатно-солевой буфер

PI3K – фосфатидилинозитол-3 киназа

PLC- γ 1 – фосфолипаза C- γ 1

PKC – протеин киназа C

proBDNF – незрелый нейротрофический фактор мозга

proNGF – незрелый фактор роста нервов

Ras – rat sarcoma A; белок саркомы крыс A

RhoA – Ras homolog gene A; гомолог белка саркомы крыс A

Trk A (B, C) – рецепторная тирозин-киназа A (B, C)

U0126 – специфический ингибитор активируемой митогенами протеинкиназы

U-73122 – специфический ингибитор фосфолипазы C- γ 1

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Важнейшим свойством ЦНС, лежащем в основе ее функционирования, является способность к постоянным пластическим изменениям, обеспечивающая способность организма приспосабливаться к непрерывно изменяющимся в широких пределах условиям среды. Несмотря на огромный прогресс в понимании механизмов пластичности, достигнутый к настоящему моменту, 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; Thal, 1996; Schinder, Poo, 2000; Huang, Reichardt, 2001; Volosin et al., 2006; Mocchetti, Brown, 2008; 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). Хорошо известно, что течение целого ряда нейродегенеративных заболеваний, в т.ч. болезни Альцгеймера, сопровождается снижением синтеза и нарушением процессинга нейротрофических факторов (Hock et al, 2000; Schaub et al., 2002; Bruno et al., 2009; Allard et al., 2012). Существует множество работ, описывающих нейропротекторное действие нейротрофинов, преимущественно, NGF (Williams et al., 1986; Koliatsos, 1990; Charles et al., 1996; Ruberti et al., 2000; Cooper et al., 2001; Blesh et al., 2005) и BDNF (Bemelmans et al., 2006; Husson et al., 2005; Namiki et al., 2000; Schäbitz et al., 2000). 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 все мире (Biane et al., 2014; Ferreira et al., 2014; Kim 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 оверэкспрессии 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 в следствие оверэкспрессии. 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 невропатологий, 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 работы

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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

Обзор литературы по проблеме базируется на статье автора «Роль NGF и BDNF в регуляции деятельности зрелого мозга» (Иванов, 2014).

Как уже было сказано выше, нейротрофины контролируют дифференцировку и жизнедеятельность нейронов центральной и периферической нервных систем.

1.1. Синтез, процессинг и транспорт нейротрофинов.

Нейротрофины синтезируются как нейронами, так и глиальными клетками в целом ряде структур ЦНС, прежде всего, в неокортексе и гиппокампе (Schindowski et al., 2008). Исходно синтезируются незрелые формы, называемые про-нейротрофинами. Далее, часть про-нейротрофинов расщепляется протеазами, как внутри клетки, так и вне ее. Выброс зрелых и незрелых нейротрофинов во внеклеточную среду может быть конститутивным (преимущественно у глиальных клеток) или регулируемым (у нейронов). Для различных популяций клеток характерна различная активность процессинга нейротрофинов и, соответственно, разное соотношение зрелых и про-нейротрофинов (Lu et al., 2005; Allen et al., 2011).

Классические эксперименты по аксотомии убедительно показывают, что нейротрофины чаще всего действуют не в месте синтеза, а в целевых компартментах, куда транспортируются ретроградным и антероградным аксонным током (Levi-Montalcini, 1998; Salehi et al., 2003; Lazo et al., 2010). В случае своевременного поступления, зрелые молекулы соответствующего нейротрофина запускают в нейроне-мишени биохимические каскады, способствующие выживанию нейрона и упрочнению синаптической связи. В противном случае запускается программируемая клеточная смерть по

апоптотическому механизму (Huang, Reichardt, 2001; Reichardt, 2006; Skaper, 2008).

1.2. Рецепторы нейротрофинов.

Все нейротрофины способны активировать 2 типа трансмембранных рецепторов: рецепторы семейства тропомиозин-киназ (TrkA, TrkB, TrkC) и $p75^{\text{NTR}}$ из семейства рецепторов фактора некроза опухоли (Гомазков, 2011; Wiesmann, de Vos, 2001; Huang, Reichardt, 2003; Counts, Mufson, 2005; Volosin et al., 2006).

Рецепторы семейства тропомиозин-киназ (Trk) обладают высоким сродством к зрелым нейротрофинам. NGF активирует TrkA, BDNF и NT-4 – TrkB, NT-3 – преимущественно TrkC. Рецепторы Trk запускают три метаболических каскада, обеспечивающих выживание нейронов и поддержание нормальной синаптической пластичности.

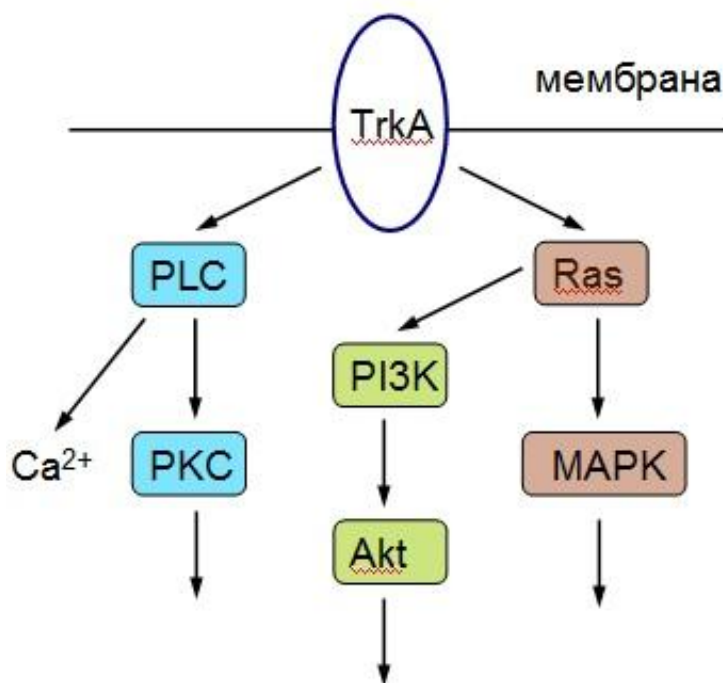


Рис. 1.1. Каскады, активируемые рецепторами семейства тропомиозин-киназ.

Каскад Ras/MAPK (белок саркомы крысы/активируемая митогенами протеинкиназа) контролирует дифференцировку нейронов и рост отростков через изменение интенсивности белкового синтеза и активности

транскрипционных факторов. Каскад MAPK критичен для индукции поздней фазы долговременной потенциации (English, Sweatt, 1997; Huang, Reichardt, 2001).

Каскад PI3K/Akt (фосфатидилинозитол-3-киназа/протеин-киназа В) обеспечивает рост и выживание клеток, изменяя интенсивность белкового синтеза и непосредственно блокируя белки апоптотического каскада, приводящего к гибели клетки (Vaillant et al., 1999; Segal, 2003; Skaper, 2008).

Каскад PLC- γ 1/PKC (фосфолипаза C- γ 1/протеин киназа C) модулирует синаптическую пластичность за счет мобилизации выхода Ca^{2+} из внутриклеточных резервуаров, фосфорилирования AMPA-рецепторов и потенциал-зависимых ионных каналов, а также изменения интенсивности синтеза белков, в т.ч. белков K-каналов. Этот каскад критически важен для индукции и для ранней фазы долговременной потенциации (Matsumoto et al., 2001; Lu et al., 2005).

Все три каскада тесно связаны между собой и могут усиливать друг друга (Impey et al., 1998; Minichiello et al., 2002).

Рецептор $p75^{NTR}$ (нейротрофический рецептор $p75$, он же LNGFR – низкоафинный рецептор NGF) относится к семейству рецепторов фактора некроза опухоли. Он обладает низким сродством к зрелым нейротрофинам, но очень высоким – к про-нейротрофинам. $p75^{NTR}$ также контролирует три метаболических каскада (Reichardt, 2006; Segal, 2003; Skaper, 2008).

Каскад NF- κ B (ядерный фактор каппа В) активирует транскрипцию ядерных генов, связанных с иммунным ответом и клеточным циклом, и оказывает положительное действие на нейроны.

Каскад C-jun-N-концевой киназы (JNK) запускает апоптоз, однако может быть заблокирован активными каскадами PI3K/Akt и/или MAPK рецепторов Trk (Lu et al., 2005).

Каскад RhoA (гомолог белка саркомы крысы А) приводит к нарушению синаптической передачи и уменьшению пластичности путем разрушения

цитоскелета, нарушения аксонного тока и повреждения шипикового аппарата.

Итоговый характер воздействия трофических факторов на нейроны определяет соотношение активностей двух типов рецепторов. Активация одних лишь $p75^{NTR}$ ведет к гибели нейрона путем апоптоза, но хотя бы минимальная коактивация $p75^{NTR}$ необходима для полной реализации положительного действия Trk-рецепторов (Segal, 2003; Skaper, 2008).

1.3. Фактор роста нервов (NGF).

Фактор роста нервов был открыт первым из всего семейства нейротрофинов Ритой Леви-Монтальчини и Стэнли Коэном в 1951 году (Levi-Montalcini, 1998).

Основной функцией NGF в здоровом взрослом мозге считается обеспечение выживания и нормального функционирования холинергических нейронов базальных ганглиев переднего мозга, регулирующих, в свою очередь активность гиппокама и неокортекса (Backman et al., 1996). Нейроны этой популяции несут большую часть всех рецепторов $p75^{NTR}$ и TrkA, а также небольшое количество TrkB и TrkC (Sobreviela et al., 1994; Allen et al., 2011), что делает их особенно чувствительными воздействию NGF. Вероятным механизмом обеспечения выживания нейронов является активация каскадов MAPK и PI3K рецептора TrkA (Nguyen et al., 2009).

Синтез proNGF в ЦНС происходит преимущественно в неокортексе и гиппокампе. В нормальных условиях небольшая часть proNGF подвергается внутриклеточному процессингу, секретуется конститутивно и ретроградно поступает в базальные ганглии и септум (Mowla et al., 1999; Schindowski et al., 2008). При усилении мозговой активности, под влиянием холинергической иннервации из базальных ганглиев, происходит масштабная секреция proNGF и его процессирование внеклеточными протеазами для обеспечения возросшей потребности нейронов в трофической поддержке (Cuellar et al., 2010). При патологических условиях, таких как

болезнь Альцгеймера, травма или старение, несмотря на усиление секреции proNGF, нарушается его процессинг и транспорт, о чем свидетельствует накопление proNGF в гиппокампе и неокортексе на фоне его недостатка в базальных ганглиях (Fahnenstock et al., 2001; Peng et al., 2004; Schindowski et al., 2008, Terry et al., 2011). Это усугубляет патологию за счет смещения баланса в сторону проапоптотического сигналинга proNGF через рецептор p75^{NTR} (Counts, Mufson, 2005; Volosin et al., 2006; Bruno et al., 2009).

Множество работ демонстрируют критическую важность NGF для нормальной мозговой деятельности и его вовлеченность в патогенез целого ряда заболеваний (Apfel, 2001; Counts, Mufson, 2005; Calissanto et al., 2010; Matrone et al., 2011). Исследования групп Шауба и Хокка продемонстрировали явное нарушение транспорта NGF у пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера: на начальной стадии заболевания концентрация NGF в сыворотке была существенно ниже нормы, а на поздних стадиях болезни уровень NGF, напротив, резко возрос в цереброспинальной жидкости (Hock et al., 2000; Schaub et al., 2002). Чрезвычайно интересна работа группы Алларда, в которой фармакологическое нарушение процессинга proNGF до NGF приводило к аккумуляции proNGF, дегградации холинергических нейронов и поведенческим нарушениям у крыс, что частично воспроизводило патогенез болезни Альцгеймера. И напротив, ингибирование металлопротеазы-9, обеспечивающей дегградацию зрелого NGF, способствовало росту плотности холинергических аксонных терминалей (Allard et al., 2012). Нормализация фенотипа холинергических нейронов в результате инъекций NGF была показана и в мышинной модели синдрома Дауна (Cooper et al., 2001).

Опыты на трансгенных животных, экспрессирующих антитела к зрелому NGF, а также на нокаутах по ферментам процессинга proNGF до NGF доказывают невозможность нормальной жизнедеятельности нейронов, лишенных трофической поддержки (Snider, 1994; Ruberti et al., 2000; Allen, Dawbarn, 2006; Capsoni, Cattaneo, 2006).

Введение NGF способно остановить вызванную хирургическим вмешательством или воздействием токсинов дегенерацию базальных ганглиев переднего мозга у крыс и обезьян (Williams et al., 1986; Koliatsos et al., 1990; Charles et al., 1996).

Долговременное увеличение концентрации NGF в интересующих структурах ЦНС возможно путем трансплантации геномодифицированных фибробластов или путем прямой трансдукции нейронов и глиальных клеток вирусными векторами. Большое количество работ *in vivo* и *in vitro* на разнообразных моделях нейропатологий, выполненных с использованием широкого спектра методов подтверждает гипотезу о мощных нейропротекторных характеристиках NGF (Rosenberg et al., 1988; Chen., Gage, 1995; Mandel et al., 1999; Ramirez et al., 2003; Tuszynski et al., 2005, 2007; Pezet et al., 2009). В числе последних можно упомянуть работу группы Уби, в которой улучшенный инъекциями церебролизина процессинг proNGF до NGF способствовал сохранению нормального фенотипа холинергических нейронов базальных ганглиев в трансгенной мышинной модели болезни Альцгеймера (Ubhi et al., 2013). Немного раньше группа Кемпа убедительно продемонстрировала, что для скорейшего восстановления повреждений периферических нервов достаточным является долговременное воздействие относительно небольших количеств NGF (Kemp et al., 2011).

Помимо нейронов ЦНС, NGF синтезируется астроцитами, эпителиальными клетками, фибробластами, лимфоцитами и макрофагами. Известно, что NGF играет определенную роль в процессах иммунного ответа и нейровоспаления, что вполне вписывается в представления о его ведущей нейропротекторной роли в ЦНС, однако требует дальнейших исследований (Otten et al., 1994; Patterson, Childs, 1994; Bonini et al., 2003; Skaper, 2001).

Убедительных данных о прямом влиянии NGF на синаптическую пластичность до сих пор не получено (Kang, Schuman, 1995). Одна из самых обширных работ на эту тему – работа группы Коннера 2009 года действительно демонстрирует нарушение пространственной памяти и

снижение мощности долговременной потенциации (LTP) у животных после блокады NGF антителами, и небольшое усиление LTP после интрасептальных инъекций NGF (Conner et al., 2009). При этом наблюдаемые эффекты являются следствием опосредованного действия NGF на нейроны септума и базальных ядер, в свою очередь модулирующих активность нейронов гиппокампа. Таким образом, и в данном случае, NGF обеспечивает прежде всего поддержание и упрочнение естественных внутримозговых связей и базовой трансмиссии, не оказывая, при этом, прямого пластического действия на нейроны.

Вышеупомянутые защитные свойства NGF несомненно представляют огромный интерес в терапевтическом контексте. Попытки использования NGF для замедления или прекращения развития разнообразных нейропатологий предпринимаются уже более 20 лет (Степаничев, 2011; Scott, Crutcher, 1994; Apfel, 2001; Cooper et al., 2001; Tuszynski et al., 2007; Aloe et al., 2012). Пока что эти попытки не слишком успешны, что, вероятнее всего, связано с несовершенством используемых методов доставки NGF к нейронам. Переход от простых инъекций к трансплантации геномодифицированных фибробластов ознаменовал крупный шаг вперед, однако наибольшего успеха можно ожидать от методик локальной вирусной трансдукции, позволяющих поднять концентрацию NGF в интересующих областях ЦНС при минимальных побочных эффектах (Саложин, Большаков, 2008; Тухбатова и др., 2011; Cattaneo et al., 2008).

1.4. Нейротрофических фактор мозга (BDNF).

Нейротрофический фактор мозга был вторым открытым нейротрофином семейства фактора роста нервов. Несмотря на его вовлеченность в процессы развития ЦНС и в обеспечение выживания нейронов (65), основной функцией BDNF во взрослом мозге является модуляция синаптической пластичности (Гомазков, 2011; Bramham, Mesaoudi, 2005; Allen, Dawbarn, 2006).

ProBDNF синтезируется в неокортексе, гиппокампе, амигдале, стриатуме, гипоталамусе, мосте и мозжечке (Lu et al., 2005; Schindowski et al., 2008). Лишь малая часть BDNF, вероятно, контролирующая выживание соответствующих популяций нейронов, секретруется конститутивно после внутриклеточного процессинга. Большая же часть proBDNF подвергается регулируемой секреции и внеклеточному процессингу (Mowla et al., 1999; Lee et al., 2001; Lou et al., 2005; Tomas, Davis, 2005; Allen, Dawbarn, 2006; Park, Poo, 2013).

Из мест синтеза BDNF ретроградно транспортируется практически по всей ЦНС, в т.ч. по внутрикортикальным, внутригиппокампальным, кортикоталамическим и кортикостриальным связям (Schindowski et al., 2008). Рецепторы TrkB, через которые реализуются положительные эффекты BDNF, встречаются практически во всем мозге (Gomez-Palacio-Schjetnan, Escobar, 2013). Особенно важно, что из всех нейротрофинов только пара BDNF/TrkB присутствует во всех областях гиппокампа и регулирует внутригиппокампальные связи, причем везикулы с BDNF обнаружены как в пресинаптических аксонных терминалях, так и в постсинаптических дендритных шипиках. Регуляторное действие BDNF направлено, прежде всего, на глутаматергические нейроны, хотя имеются данные и о его связи с дофаминергической, холинергической, норадренергической и серотонинергической системами (Naumenko et al., 2012). Наконец, только BDNF способен стимулировать собственную секрецию по механизму положительной обратной связи (Bramham, Mesaoudi, 2005).

Усиление интенсивности секреции BDNF при активации нейронов, в частности, при индукции долговременной потенциации, заставляет предположить его вовлеченность в регуляцию процессов синаптической пластичности (Bramham et al., 1996; Lessmann et al., 2003; Lu, 2003; Monteggia et al., 2004; Lu et al., 2008; Park, Poo, 2013).

У нокаутов по BDNF в гиппокампе нарушена как базовая нейротрансмиссия, так и ранняя фаза долговременной потенциации, причем

нарушения исчезали после аппликации экзогенного BDNF или его доставки методом вирусной трансфекции (Korte et al., 1996; Patterson et al., 1996).

В нормальных условиях действие BDNF можно разделить на 3 вида: быстрое пресинаптическое (*permissive*), быстрое постсинаптическое (*acute instructive*) и медленное постсинаптическое (*late instructive*) (Schinder, Poo, 2000; Bramham, Mesaoudi, 2005). Пресинаптическое действие BDNF обеспечивается его конститутивной секрецией, нивелирует синаптическую усталость и контролирует активность трафика везикул и синтеза белков экзоцитоза в пресинапсе, усиливая выброс медиатора и делая возможной потенциацию нейрона (Figurov et al., 1996; Pozzo-Miller et al., 1999; Xu et al., 2000; Matsumoto et al., 2001; Tartaglia et al., 2001). Важным следствием из установления характера пресинаптического действия BDNF является гипотеза о том, что индукция LTP зависит, в том числе, и от предшествовавшего сигналинга BDNF (Schinder, Poo, 2000). Быстрое постсинаптическое действие BDNF, обеспечиваемое регулируемой секрецией BDNF в ответ на стимуляцию нейронов, напрямую связано с увеличением внутриклеточной концентрации кальция, деполяризацией нейрона, активацией NMDAR и индукцией LTP (Kovalchuk et al., 2002; Minichiello et al., 2002; Blum, Konnerth, 2005). Рост концентрации кальция приводит к реципрокному увеличению секреции BDNF, необходимому для проявления медленного постсинаптического действия последнего, заключающегося в консолидации LTP за счет активации ранних генов и синтеза белка *de novo*.

Механизмы реализации вышеупомянутых вариантов действия BDNF явно различны, т.к., например, фармакологическая блокада BDNF-TrkB сигналинга препятствует генерации LTP, но не затрагивает синаптическую усталость (Kossel et al., 2001; Patterson et al., 2001). Участие BDNF в регуляции ранней (E-LTP) и поздней долговременной потенциации (L-LTP) также происходит различным образом. В экспериментах на нокаутах или с антителами к BDNF или TrkB, использование сильных паттернов высокочастотной стимуляции позволило инициировать E-LTP, однако

консолидации и перехода к L-LTP не происходило (Minichiello et al., 2002). Использование скавенджеров TrkB позволило Кангу с соавторами выявить критический для консолидации часовой интервал после тетануса, во время которого необходим нормальный сигналинг TrkB (Kang et al., 1997).

В 1995 году Канг и Шуман продемонстрировали, что длительная инкубация переживающих срезов гиппокампа крыс в растворе BDNF без тетанизации приводит к практически трехкратному усилению ВПСП в синапсах CA3-CA1 (Kang, Schuman, 1995). Данный эффект, названный BDNF-LTP, был обнаружен также в зубчатой извилине и в различных областях неокортекса (Huber et al., 1998; Jiang et al., 2001; Escobar et al., 2003; Bramham, Mesaoudi, 2005; Gomez-Palacio-Schjetnan, Escobar, 2013). Дальнейшие исследования показали, что для индукции BDNF-LTP в зубчатой извилине достаточно однократного 25-минутного введения 2 мкг BDNF, причем потенциация происходит даже на фоне блокады NMDA-рецепторов (Kang, Schuman, 1995; Messaoudi et al., 2002).

Интересно, что сразу после индукции E-LTP под действием высокочастотной стимуляции, возможна индукция BDNF-LTP, однако после консолидации потенциации и ее перехода в позднюю фазу, аппликация BDNF уже не вызывает BDNF-LTP (Messaoudi et al., 2002). Верно и обратное – после BDNF-LTP возможно добиться индукции E-LTP, но не перехода к L-LTP (Kang et al., 1997). Таким образом, BDNF-LTP развивается при участии тех же механизмов, что и поздняя фаза долговременной потенциации (Bramham, Mesaoudi, 2005). Индукция и последующая консолидация BDNF-LTP требует активации каскада MAPK рецептора TrkB, MAPK-зависимой активации CREB и синтеза белков, в т.ч. Arc (регулируемого активностью ассоциированного с цитоскелетом белка), *de novo*, однако для поддержания потенциации активность этого каскада уже не требуется (Ying et al., 2002; Cassamo et al., 2010; Lu et al., 2008, 2011). Для индукции и консолидации, но не для поддержания BDNF-LTP также критичен BDNF-зависимый синтез белка, прежде всего – в дендритах (Kang et al., 1996; Ouyang et al., 1999;

Kanhema et al., 2003). Имеются также данные о вовлеченности в процесс консолидации активации каскада PLC (Minichiello et al., 2002).

Вышеупомянутые сведения о влиянии BDNF на долговременную потенциацию были обобщены в рамках BDNF-гипотезы синаптической консолидации (Bramham, Mersaoui, 2005; Lu et al., 2008; Gomez-Palacio-Schjetnan, Escobar, 2013; Park, Poo, 2013). Согласно этой гипотезе, высокочастотная стимуляция синапса приводит в постсинапсе к активации NMDAR и выбросу BDNF, усиливающегося по принципу положительной обратной связи. Связываясь с TrkB рецепторами пресинапса, BDNF обеспечивает усиленный выброс медиатора и активацию CREB. В постсинапсе BDNF активирует каскад MAPK, что ведет к локальному синтезу белков, в т.ч. Arc, в дендритных шипиках. Увеличенный в течение критического периода синтез Arc вызывает консолидацию синапса.

Так как BDNF участвует и в индукции, и в поддержании LTP, должен существовать какой-либо триггерный механизм переключения между этими вариантами его действия. Этот вопрос частично прояснил в своей работе Айкарди с коллегами, показавший, что мощная высокочастотная стимуляция, вызывающая устойчивую L-LTP, провоцирует длительное (5-12 мин) усиление секреции BDNF, в то время как слабая стимуляция, достаточная только для запуска E-LTP, ведет лишь к кратковременному (>1 мин) усилению секреции BDNF (Aicardi et al., 2004). Таким образом, можно предположить, что в роли триггера выступает сама интенсивность и продолжительность регулируемого выброса BDNF, однако данная гипотеза требует дальнейшей проверки.

1.5. Моделирование патологических условий с помощью бета-амилоидного пептида.

Как уже было упомянуто выше, нарушение синтеза, процессинга и транспорта нейротрофинов имеет место при протекании целого ряда нейродегенеративных заболеваний. Исследование протекторных свойств

нейротрофинов требует выбора адекватной модели, воспроизводящей патологические процессы и нарушения синаптической пластичности нейронов.

Одним из важнейших заболеваний, сопровождающихся лишением нейронов необходимой трофической поддержки, является болезнь Альцгеймера. Характерными признаками болезни Альцгеймера являются значительная диффузная атрофия головного мозга, массовая утрата синапсов и воспалительная реакция глии, ведущие к прогрессирующим нарушениям когнитивных и высших психических функций.

Большинство специалистов считают одной из основ патогенеза болезни Альцгеймера нарушение метаболизма бета-амилоидного пептида (A β) (Castellani et al, 2008). Бета-амилоидный пептид является продуктом расщепления белка предшественника бета-амилоида (APP), закодированного в 21-ой хромосоме. В норме, APP синтезируется в относительно малых количествах, и расщепляется протеазами на непатогенные фрагменты, которые, по-видимому, выполняют сигнальную функцию (Гаврилова, 2007). Нарушение клеточного метаболизма может привести к избыточному образованию аномального A β длиной 42 аминокислоты, который агрегируется в нерастворимые сенильные бляшки. Сенильные бляшки из A β , иногда встречающиеся также в мозгу людей, страдающих рядом других нейродегенеративных заболеваний, считались токсичными практически с момента открытия болезни Альцгеймера. В настоящее время доказано, что корреляция между количеством бляшек и снижением когнитивных функций довольно слаба. Кроме того, введение нерастворимого бета-амилоида не всегда приводит к дегенерации (Castellani et al, 2008).

В связи с этим, актуальная версия амилоидной гипотезы предполагает токсичность не нерастворимых бляшек, а растворимого A β (Giacchino et al., 2000; Chapman et al., 2001; Wang et al., 2002; Rowan et al., 2003).

В связи с этим, актуальная версия амилоидной гипотезы предполагает, что за нарушение синаптической пластичности нейронов и угнетение

когнитивных функций ответственен именно токсичный растворимый Аβ, в то время как бляшки являются результатом попыток клетки инактивировать и инкапсулировать его.

Хорошо описанная способность растворимого Аβ подавлять развитие долговременной потенциации делает его наилучшим кандидатом для моделирования нейропатологий альцгеймеровского типа. На использовании Аβ или APP основано большинство современных моделей болезни Альцгеймера, как инъекционных, так и генно-инженерных (Dewatcher et al., 2002; Wang et al., 2002; Rowan et al., 2003). В зависимости от условий и времени воздействия, а также от используемой концентрации, Аβ может угнетать долговременную потенциацию *in vivo* и *in vitro* как полностью, так и частично (Chen et al., 2002; Gault, Holsher, 2008; Fa et al., 2010; Barbi et al., 2012; Kimura et al., 2012; Solntseva et al., 2014).

1.6. Заключение.

Изложенные выше данные позволяют составить гипотетическую схему согласованного действия NGF и BDNF – наиболее распространенных в мозге нейротрофинов – на нейроны здорового зрелого мозга. Оба нейротрофина обладают свойством плеiotропности, т.е. выполняют целый спектр функций, однако их основная роль в мозге различается. В рамках этой гипотезы NGF обеспечивает сохранение популяций нейронов и связей между ними в оптимальном функциональном состоянии и контролирует репаративные процессы, что заставляет рассматривать его в качестве перспективного терапевтического агента. Влияние NGF на синаптическую пластичность реализуется преимущественно через усиление внутримозговых связей и образование новых синапсов. BDNF меньше связан с обеспечением выживания нейронов, однако напрямую играет важнейшую роль в регуляции процессов долговременной потенциации и памяти. Регулируемая секреция BDNF является одним из граничных условий синаптической консолидации, а также основным способом снижения синаптической усталости.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

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

Для обеспечения долговременного устойчивого локального увеличения концентраций NGF и BDNF в гиппокампе экспериментальных животных были созданы генно-инженерные конструкции на базе лентивирусных векторов. Методика получения конструкций и сборки лентивирусов подробно описана в статье «Оптимизация метода получения лентивирусных частиц для трансдукции нейронов *in vivo*» (Тухбатова и др., 2011).

2.1.1. Получение генов NGF и BDNF человека методом полимеразной цепной реакции.

В качестве матрицы для синтеза генов NGF и BDNF были выбраны коммерческие IMAGE-клоны фирмы Open Biosystems. Специфическая амплификация требуемого фрагмента ДНК производилась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Реакцию проводили при следующих условиях: 5 – 10 нг ДНК, 1x буфер для Taq-полимеразы (10 mM Трис-НСl pH=8.8, 50 mM KCl, 0.08% Nonidet P40), 1 ед. Taq-полимеразы (Helicon, H-1902-1kU), 1.5 мМоль дНТФ, 10 пМоль каждого специфического праймера. Ход ПЦР: денатурация ДНК - 5 минут при 95 °С, далее – 25 циклов (30 секунд денатурации при 95 °С, 30 секунд при температуре отжига, специфичной для данной пары праймеров (60 °С), и 40 секунд достройки при 72 °С).

В качестве праймеров были выбраны

Ngf_Bam_for GATAGGATCCCATGCTGGACCCAAGCTCAG

Ngf_Bam_rev ACTTGGGATCCAGGTTGAGGTAGGGAGGG

Bdnf_Bam_for GATA GGATCC ATG ACC ATC CTT TTC CTT ACT A
Bdnf_Bam_rev ACTA GGATCC CTA TCT TCC CCT TTT AAT GGT C
(подчеркнуто – участок узнавания эндонуклеазой рестрикции BamHI).

2.1.2. Клонирование ПЦР-продуктов в «служебный» p-GEM-T вектор.

Свежесинтезированные ПЦР-продукты были очищены путем электрофореза в 1% агарозном геле с помощью набора для элюции ДНК из геля Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat. № A9282) согласно протоколам фирмы-производителя. Полученные фрагменты были лигированы в p-GEM-T вектор (Promega, Cat. № A3600) при следующих условиях: 1x SE буфер для ДНК лигазы T4 (50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM ATP; SibEnzyme), 50 нг вектора pGEM-T, 3 ед.а. T4 ДНК-лигазы (SibEnzyme, Cat. № E319). Инкубация в течение часа при комнатной температуре, затем – трансформация компетентных клеток E.coli (штамм Top10F⁺).

В результате трансформации компетентных клеток и выделения из них плазмидной ДНК (см. пункт 2.1.6.), были получены чистые «служебные» p-GEM-T векторы, содержащие фрагменты ДНК, кодирующие человеческие NGF и BDNF. Эти продукты могут храниться достаточно продолжительное время при -20 °С и использоваться по мере необходимости.

Полученные конструкторы были проверены секвенированием в фирме Синтол (Москва).

2.1.3. Подготовка генов NGF и BDNF к клонированию в рабочий вектор.

Полученные в предыдущем пункте продукты (p-GEM-T векторы со вставленными генами NGF и BDNF) были подвергнуты рестрикции для выделения собственно генов NGF и BDNF. Для этого, их инкубировали 90 минут при 37 °С с эндонуклеазой рестрикции BamHI (SibEnzyme, Cat. № E022) в 10x Buffer Tango (Fermentas, Cat. № BY5). Инкубация с рестриктазой

привела к «вырезанию» генов NGF и BDNF из p-GEM-T векторов по сайтам BamHI. Далее, необходимые фрагменты ДНК были очищены от p-GEM-T вектора путем электрофореза в 1% агарозном геле с помощью набора для элюции ДНК из геля Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Полученные фрагменты, соответствующие генам NGF и BDNF, далее были подвергнуты кинированию с помощью фермента T4-полинуклеотид киназы (T4 Polynucleotide Kinase, SibEnzyme, Cat. № E311) в 1x SE-буфере ДНК лигаза T4 (SibEnzyme) в течении 30-45 минут при 37 °C. После кинирования вновь была произведена очистка путем электрофореза в 1% агарозном геле с помощью набора для элюции ДНК из геля Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

2.1.4. Подготовка рабочего вектора к клонированию.

Исходный вектор pCSC с неспецифическим промотором CMV (далее – просто pCMV) был любезно предоставлен доктором Хеном из Института Вейцмана (Израиль). Важно отметить, что вектор pCMV содержал в себе ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), необходимого для выявления зараженных клеток методами флуоресцентной микроскопии.

Вектор pCMV также был подвергнут рестрикции с помощью эндонуклеазы BamHI (SibEnzyme, Cat. № E022) в 1x Buffer Tango (Fermentas, Cat. № BY5). Инкубация длилась 90 минут при 37 °C. Далее вектор был дефосфорилирован: в рестрикционную смесь была добавлена фосфатаза CIAP (SibEnzyme, Cat. № E328). После 30 минут инкубации при 37 °C, смесь была очищена с помощью фенола и хлороформа. К образцу добавлен один объем смеси фенол-хлороформ 1:1, смесь центрифугирована 3 минуты при 13000 оборотов/минуту, к верхней фракции добавлен один объем хлороформа, смесь снова отцентрифугирована 3 минуты при 13000 оборотов, вновь отобрана верхняя фракция. Полученная фракция была дополнительно очищена электрофорезом в 1% агарозном геле и, далее, с помощью набора

для элюции ДНК из геля Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat. № A9282) согласно протоколу фирмы-производителя.

2.1.5. Лигирование генов NGF и BDNF в вектор pCMV.

Полученные кинированные фрагменты ДНК, содержащие гены NGF и BDNF, имеющие «липкие» концы BamHI, были лигированы в дефосфорилированный вектор pCMV, также рестрицированный по сайтам BamHI. Экспериментально было подобрано оптимальное соотношение вектора и вставки - 10 пмоль вставки на каждый пмоль вектора. Для реакций использовали фермент T4-ДНК лигаза (SibEnzyme, Cat. № E319) в соответствующем буфере (SibEnzyme). Общий объем лигазной смеси составил в каждом случае 15 μ л. Реакции длились 8-10 часов при температуре +4 $^{\circ}$ C.

2.1.6. Трансформация компетентных клеток и выделение плазмидных ДНК.

Нижеперечисленные операции были проведены с конструкциями для оверэкспрессии NGF и BDNF аналогично, но по отдельности. Лигазная смесь, полученная в предыдущем пункте (15 μ л), была добавлена к суспензии компетентных клеток *E. coli* штамма Top10F' и помещена на холод (+4 $^{\circ}$ C) на 15 минут. Далее, клетки были подвергнуты тепловому шоку при 42 $^{\circ}$ C в течение 1 минуты, затем были вновь помещены на холод (+4 $^{\circ}$ C) на 1 минуту. После этого, к трансформированным клеткам была добавлена стандартная среда LB (на 100мл: 1г бакто-триптона, 0,5 г бакто-дрожжевого экстракта, 1г NaCl, 95,3г H₂O, 2г агара, 16,7 μ л 10N NaOH, 1мл 1M MgSO₄) в количестве 800 μ л. Со средой смесь инкубировали 40-60 минут при 37 $^{\circ}$ C, после чего центрифугировали в течение 10-12 секунд при 13000 оборотов/минуту. Супернатант отбрасывали, а осажденные при центрифугировании клетки ресуспендировали в оставшихся 80-100 μ л среды и аккуратно растирали по поверхности агара, содержащего среду LB и ампициллин, в чашке Петри.

Далее, чашки Петри с клетками были оставлены на ночь в термостате при 37 °С. Используемый нами вектор pCMV содержит ген устойчивости к ампициллину, что дало нам возможность создать условия, в которых способны развиваться только клетки, в которые попал вектор.

На следующий день выросшие бактериальные колонии были перенесены по одной в 1.5 – 2 мл среды LB, содержащей ампициллин, и оставлены на ночь при 37 °С и постоянном покачивании (220 оборотов в минуту) для роста. Затем клетки были осаждены центрифугированием в настольной центрифуге при 13000 оборотов/минуту в течение 30 секунд. Супернатант был слит, а осажденные при центрифугировании клетки были ресуспендированы в 100 μл буфера I (25 mM Трис-НСl, 10 mM ЭДТА, 50 mM глюкоза), после чего к ним было добавлено 200 μл лизирующего буфера II (1% SDS, 0.1 N NaOH). После тщательного перемешивания к смеси было добавлено 300 μл нейтрализующего буфера III (3 M КоAc). Далее смесь вновь перемешивали, затем центрифугировали в течение 15 минут при 13000 оборотов/минуту. Супернатант был аккуратно перенесен в новую микроцентрифужную пробирку, к нему было добавлено 0,8 объема изопропилового спирта, после чего плазмидная ДНК была высажена центрифугированием в течение 15 минут на 12000 g при +4 °С. Осадок был промыт в 75% этаноле, высушен на воздухе при комнатной температуре и растворен в деионизованной воде (mQ).

2.1.7. Рестрикционный анализ.

Для проверки правильности встраивания генов NGF и BDNF в вектор pCMV, выделенные из компетентных клеток *E. coli* плазмидные ДНК были подвергнуты рестрикционному анализу. Для этого аликвоту плазмидной ДНК из каждой колонии клеток инкубировали 90 минут при 37 °С вместе с эндонуклеазой рестрикции BamHI в 1x Buffer Tango. Продукты реакции анализировали путем электрофореза в 1% агарозном геле, приготовленном на TAE буфере (40 mM Трис-ацетат pH 7.6, 1 mM ЭДТА).

2.1.8. Сборка лентивирусных систем для обеспечения экспрессии NGF и BDNF.

Сборка лентивирусных частиц осуществлялась сотрудниками Лаборатории молекулярной нейробиологии Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН по стандартному протоколу. В специализированные клетки-упаковщики линии HEK293T (Invitrogen) трансфицировали три базовых плазмиды, кодирующие вирусные белки, и полученные ранее плазмиды на основе вектора pCMV, содержащие гены NGF и BDNF.

Параллельно, для обеспечения контроля, по аналогичному протоколу были собраны лентивирусные частицы с использованием «пустого» вектора pCMV, не содержащего ген интереса, но содержащего все остальные компоненты полученной генно-инженерной конструкции, в том числе ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок.

После сборки лентивирусных частиц, их суспензию концентрировали на ультрацентрифуге для достижения рабочей концентрации в 200 нг р24/мл.

Концентрация была измерена с помощью набора для иммуноферментного анализа фирмы Вектор-БЕСТ (ВИЧ-1 р24-антиген-ИФА-БЕСТ, D-0134) по протоколу производителя.

2.2. Исследование влияния сверхэкспрессии NGF и BDNF на параметры длительной посттетанической потенциации в гиппокампе крыс в нормальных и патологических условиях.

Для оценки функциональных изменений в ЦНС экспериментальных животных после локальной сверхэкспрессии NGF и BDNF было проведено электрофизиологическое исследование динамики долговременной потенциации зубчатой фасции гиппокампа в нормальных условиях и под влиянием бета-амилоидного пептида.

2.2.1. Содержание животных.

Все эксперименты были выполнены на самцах крыс линии Вистар Р20-Р2 (50–70 г) из питомника «Столбовая» РАН (Московская область). Всего в работе было использовано 60 животных. Животных содержали по пять особей в пластмассовых клетках в условиях вивария при комнатной температуре, 12-часовом световом дне и свободном доступе к воде и пище. Проведение экспериментов было согласовано с этической комиссией Института Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН. В ходе работы были предприняты все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных.

2.2.2. Инъекция лентивирусных суспензий в зубчатые фасции гиппокампов экспериментальных животных.

Перед операцией все животные получали в качестве анестезии 8% раствор хлоралгидрата, вводимый внутривентриально из расчета 400 мг/кг.

Животных фиксировали в стереотаксическом приборе (Kopf, США), на коже головы делали разрез по саггитальной линии длиной 1,5-2 см. Минимально повреждая надкостницу, в теменных костях сверлили ручным сверлом диаметром 2 мм отверстия для инъекции. Инъекции осуществляли с помощью микрошприца Hamilton 88000 (Швейцария) и наноинжектора Stoelting QSI в зубчатую фасцию гиппокампа. Скорость введения составляла 0,5 μ л/мин, объем суспензии – 2 μ л. Координаты были подобраны по стереотаксическому атласу Paxinos, Watson (2005): AP –2,5; ML –1,5; DV –3,5. После операции животных содержали в виварии при тех же условиях в течение недели.

2.2.3. Приготовление переживающих срезов мозга.

Через неделю после инъекции вирусной суспензии, животные были декапитированы с помощью гильотины. Мозг был извлечен, обмыт ледяным раствором ACSF (artificial cerebrospinal fluid, искусственная цереброспинальная жидкость) и рассечен бритвой на 2 полушария. Мозжечок

был отделен, затем каудальная сторона мозга была срезана под углом 30° для достижения перпендикулярности плоскости срезов и средней части дорсального гиппокампа. После этого, полученная заготовка была приклеена суперклеем к столику и помещена в рабочую камеру вибротома Leica VT1200S. Срезы толщиной 500 μm изготавливались в оксигенируемом (95% CO_2 – 5% O_2) ледяном растворе ACSF при скорости резки 0,2 мм/сек. Из одного мозга изготавливались 3-4 среза, из которых только 2 лучших использовались в эксперименте.

Состав ACSF для резки: NaCl 124 мМ, KCl 3 мМ, NaHCO_3 26 мМ, NaH_2PO_4 1,25 мМ, MgSO_4 2,6 мМ, D-глюкоза 10 мМ, CaCl_2 1,3 мМ.

Готовые срезы помещали в ванночку с комнатным оксигенируемым раствором ACSF для восстановления на 1 час. Ванночка постепенно прогревалась до $+32^{\circ}\text{C}$ в водяной бане.

Состав ACSF для регистрации: NaCl 124 мМ, KCl 3 мМ, NaHCO_3 26 мМ, NaH_2PO_4 1,25 мМ, MgSO_4 1,3 мМ, D-глюкоза 10 мМ, CaCl_2 2,5 мМ.

2.2.4. Инкубация срезов в растворе β -амилоидного пептида (25-35).

После восстановления в камере срезы перемещали для моделирования патологических условий на 1 час в оксигенируемый раствор β -амилоидного пептида ($\text{A}\beta$ 25-35) в ACSF, либо в 50 нМ раствор контрольного $\text{A}\beta$ 35-25 с обратной аминокислотной последовательностью, либо в чистый ACSF (в случае контрольных групп). В ходе экспериментов были опробованы концентрации β -амилоида 20, 50 и 100 нМ. В качестве основной для моделирования нарушений синаптической пластичности была выбрана концентрация 50 нМ. Сухой лиофилизированный β -амилоид (Bachem, Швейцария) был растворен в $\text{mQ H}_2\text{O}$, аликвотирован по 5 μl и заморожен (-20°C). Для каждого эксперимента новая аликвота $\text{A}\beta$ была разморожена при комнатной температуре и растворена в требуемом объеме ACSF.

2.2.5. Перемещение срезов в экспериментальную камеру и установка электродов.

После инкубации в Аβ, либо в ACSF, срезы перемещали в экспериментальные камеры установки Scientifica Slicemaster. В камерах поддерживали постоянный проток оксигенируемого ACSF (3,5-4 мл/мин). Эксперимент одновременно производили на двух срезах от одного животного, из которых только один инкубировали в Аβ. Перед началом работы, срезы оставляли в камерах на 30 мин для акклиматизации. Затем с помощью микроманипуляторов под видеоконтролем производили установка электродов. Регистрирующий электрод из стеклянного капилляра, заполненного ACSF, с сопротивлением 5-10 МΩ, вводили в среднюю часть верхнего рога гранулярного слоя зубчатой извилины. Стимулирующий биполярный электрод из нихромовой проволоки помещали в медиальный продольный пучок, на удалении 150-200 μм от регистрирующего, после чего производили визуальную оценку поверхности среза на предмет нормальности морфологии и отсутствия повреждений при резке.

2.2.6. Поиск оптимального сигнала ВПСП и подбор рабочей интенсивности стимула.

После установки электродов, производили поиск сигнала фокальных ВПСП наибольшей мощности и наиболее правильной формы. Для этого на стимулирующий электрод подавали прямоугольные стимулы длительностью 100 миллисекунд с интервалом 30 секунд между стимулами. Регистрация фокальных ВПСП и управление параметрами стимуляции производили с помощью оригинальной программы Scientifica Slicemaster. После каждого стимула экспериментатор оценивал форму ответа и, при необходимости, перемещал стимулирующий электрод, либо изменял глубину его введения в ткань среза. На этапе поиска ответа устанавливали минимально возможная амплитуда во избежание преждевременного возбуждения синапсов. После удачной резки срезов от животного, хорошо перенесшего вирусную

инъекцию, ответ оптимальной формы и мощности удавалось обнаружить практически сразу, после чего положение электродов не изменялось.

После этого, производилось определение максимума амплитуды фокальных ВПСП. Для этого, силу стимула постепенно увеличивали с минимальным шагом. Как только ВПСП переставал расти при усилении стимула, в качестве рабочей устанавливали интенсивность стимула, вызывающую ВПСП мощностью 40-50% от максимума. В большинстве случаев, рабочая сила стимула находилась в диапазоне от 0,1 до 0,5 мА. В дальнейшем, силу стимула не изменяли на протяжении всего эксперимента.

2.2.7. Регистрация ВПСП.

Перед индукцией долговременной потенциации, для каждого среза производили получасовую запись базовой трансмиссии. Стимулы рабочей интенсивности длительностью 100 миллисекунд подавали на стимулирующий электрод каждые 30 секунд. В дальнейшем, при обработке результатов, средняя амплитуда фокальных ВПСП до тетанизации принималась за 100%, и с ней сравнивали ВПСП после тетанизации. Регистрацию фокальных ВПСП после тетанизации производили еще 2 часа по аналогичному протоколу.

В обработку были взяты только срезы, демонстрировавшие ВПСП нормальной формы и стабильный уровень базовой трансмиссии до тетанизации. Дополнительными критериями отбраковки были сопутствующие скачки температуры или давления газовой смеси $\text{CO}_2\text{-O}_2$, потеря изображением среза четкости слоев, появление в процессе регистрации ненормально мощного артефакта или популяционного спайка, делающего невозможным точное измерение амплитуды ВПСП. Наконец, работа с каждым новым пометом животных начиналась с записи контрольных срезов для проверки их стабильности и выживаемости в условиях эксперимента.

2.2.8. Парная стимуляция.

Для оценки пресинаптического компонента синаптической пластичности несколько срезов в каждой группе регистрировали в режиме парной стимуляции. В этом случае, стимулы рабочей интенсивности длительностью 100 микросекунд подавали на стимулирующий электрод каждые 30 секунд парой, с межстимульным интервалом 50 миллисекунд. При обработке результатов производили подсчет т.н. «парного отношения», т.е. отношения средней амплитуды второго стимула к амплитуде первого в абсолютных значениях.

2.2.9. Тетанизация.

После получасовой записи фокальных ВПСП, срезы подвергали высокочастотной тетанизации для индукции долговременной потенциации синапсов MPP-DG. На стимулирующий электрод подавали четыре пачки по 100 стимулов частотой 100 Гц с интервалом 20 секунд между пачками.

2.2.10. Инкубация срезов в растворах ингибиторов киназных каскадов рецептора TrkA.

Для исследования зависимости протекторного эффекта NGF от активности киназных каскадов рецепторов TrkA, производили полностью аналогичные эксперименты, дополненные часовой инкубацией срезов в растворах специфических ингибиторов: 20 μ M растворе LY294002 (ингибитора PI3K), 20 μ M растворе U0126 (ингибитора MAPK) и 20 μ M U-73122 (ингибитора PLC). Инкубацию производили на этапе 2.2.4., одновременно с инкубацией в A β либо ACSF. Ингибиторы (Sigma) были предварительно растворены в DMSO согласно протоколам производителя, аликвотированы и помещены на хранение в холодильник (+4⁰C). В каждом эксперименте новую аликвоту требуемого ингибитора растворяли в необходимом объеме ACSF.

2.2.11. Обработка результатов.

Основным оцениваемым параметром во всех экспериментах была выбрана амплитуда ВПСП. Амплитуды ВПСП измерялись полуавтоматически программой ClampFit 10.2. Результаты подсчета подвергали визуальной проверке, в ходе которой ВПСП, искаженные явными артефактами, исключали из подсчета.

Для каждого среза среднюю амплитуду ВПСП до тетанизации принимали за 100% и с ней далее сравнивали амплитуды всех ВПСП.

В рамках каждой группы производилось вычисление средних значений амплитуды ВПСП, стандартного отклонения и ошибки среднего для каждой временной точки с помощью программы MS Excel 2003. Построение графиков производилось с помощью программы OriginPro 8. Статистическая обработка результатов включала в себя проведение однофакторного дисперсионного анализа и Т-теста Стьюдента с помощью программы MS Excel 2003.

2.3. Оценка эффективности лентивирусной трансдукции.

Параллельно с электрофизиологическими экспериментами, часть инъецированных животных была использована в качестве материала для оценки эффективности лентивирусной трансдукции биохимическими методами.

2.3.1. Визуализация и локализация трансдуцированных клеток.

Перед началом количественных биохимических исследований, одно животное из каждой группы получало системную анестезию 8% раствором хлоралгидрата и подвергалось транскардиальной перфузии по стандартному протоколу. Далее, мозг животного извлекали и дополнительно фиксировали в 4% растворе параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение суток.

Фронтальные срезы мозга толщиной 50 мкм изготавливались на вибрационном микротоме Leica VT 1200S.

Исследование фиксированных срезов производилось с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B, оснащенного фотокамерой Leica DFC310FX. Размер области заражения и точность ее локализации в зубчатой фасции гиппокампа оценивали визуально по свечению зеленого флуоресцентного белка.

2.3.2. Количественная оценка изменения концентраций NGF и BDNF в гиппокампе экспериментальных животных вследствие лентивирусной трансдукции.

Аналогично процедуре изготовления переживающих срезов, для биохимических анализов, животные были декапитированы с помощью гильотины через неделю после инъекции вирусной суспензии. Мозг был извлечен, обмыт ледяным ACSF и помещен на лед. Оба гиппокампа извлекались, взвешивались и гомогенизировались в 10 объемах буфера (состав указан производителем наборов для ИФА). Полученный гомогенат центрифугировали при 10000 об/мин и температуре +4°C 30 минут. Супернатант далее использовали для 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.

Супернатант помещали в лунки, обработанные антителами к NGF или BDNF соответственно, и инкубировали в них в течение 12 часов при температуре +4°C. Затем лунки промывали буфером и последовательно обрабатывали первичными и вторичными антителами. Инкубация с каждым антителом продолжалась 3 часа при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Наконец, в лунках добавлением раствора ТВМ/Е запускали пероксидазную реакцию. Через 15 минут реакцию прерывали и плашка

устанавливали в спектрофотометр Wallac Victor. Измерение оптической плотности производили при 450 нм. Для каждого измерения на основе входящих в состав набора стандартов известной концентрации строили калибровочную кривую, что позволяло высчитать точное значение концентрации измеряемого нейротрофина в каждом образце.

2.4. Заключение.

Обобщая вышеизложенное, можно заключить, что работа методически состояла из следующих этапов:

1) Создание генно-инженерных конструкций для обеспечения сверхэкспрессии NGF и BDNF в гиппокампе. Конструкция основана на лентивирусном векторе рCSC с промотором CMV и встроенным геном зеленого флуоресцентного белка GFP.

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

3) Приготовление переживающих срезов мозга через 7 дней после вирусной инъекции. Инкубация срезов соответствующих групп в растворе бета-амилоида (25-35) для моделирования нарушений синаптической пластичности.

4) Исследование изменений динамики и мощности долговременной посттетанической потенциации вследствие сверхэкспрессии NGF и BDNF в нормальных и патологических условиях. Выявление роли киназных каскадов рецепторов TrkA в обнаруженных эффектах сверхэкспрессии NGF.

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

ГЛАВА 3. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕНТИВИРУСНОЙ ТРАНСДУКЦИИ.

Изложение результатов данной работы целесообразно начать с оценки эффективности локальной лентивирусной трансдукции клеток зубчатой фасции генами NGF и BDNF.

3.1. Визуализация и локализация трансдуцированных клеток.

Контроль локализации и размера области вирусного заражения производился методами флуоресцентной микроскопии на фиксированных срезах мозга. Критерием, по которому определялась эффективность трансдукции, было наличие в клетках флуоресценции зеленого флуоресцентного белка GFP, экспрессия которого происходит в клетках, зараженных любой из использованных вирусных суспензий. Этот белок удобен для детекции, поскольку в ответ на возбуждение светом синей области спектра он стабильно флуоресцирует ярко-зеленым светом. На рисунке ниже приведен пример заражения зубчатой фасции лентивирусной суспензией на базе конструкции рCMV.

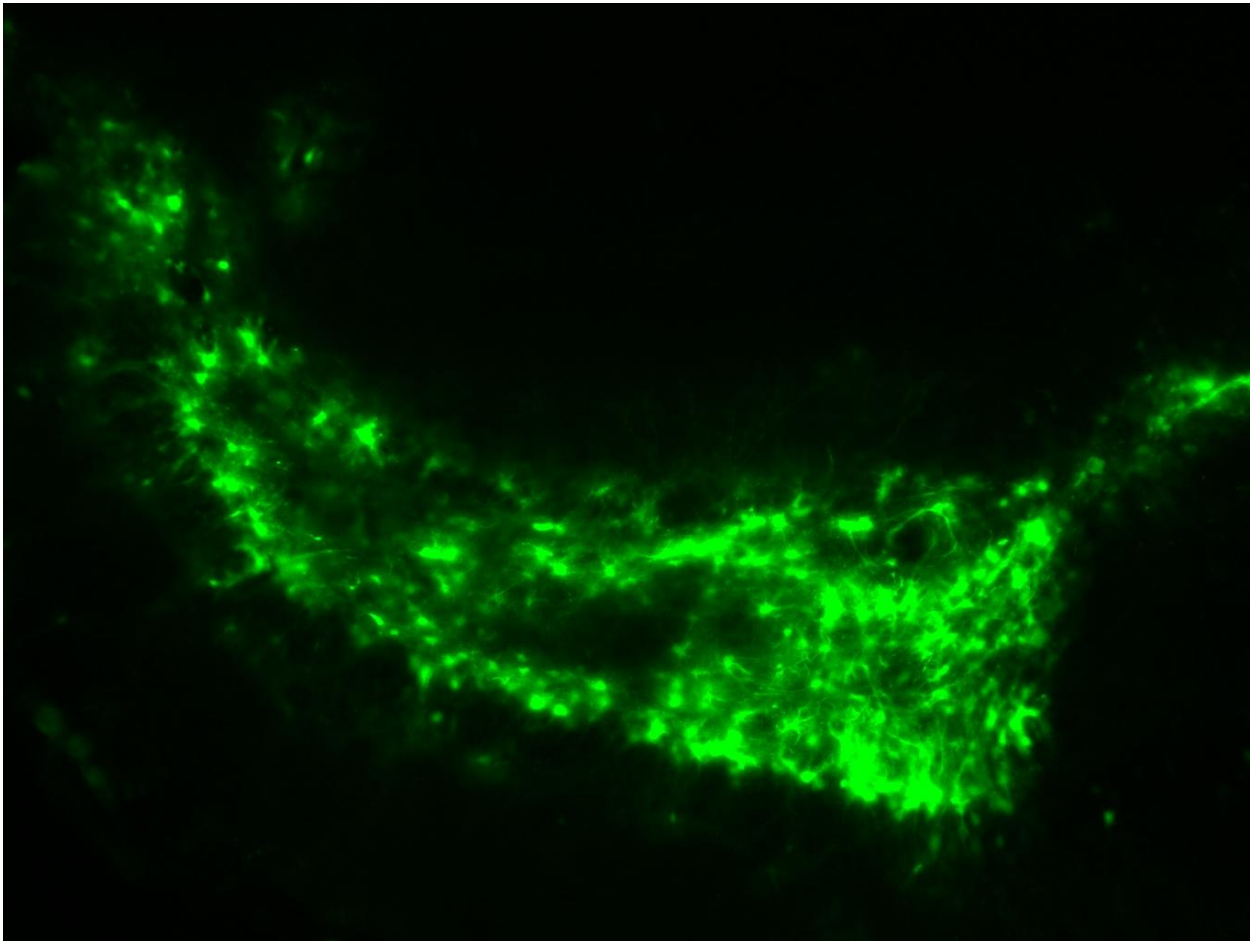


Рис. 3.1. Пример заражения зубчатой фасции гиппокампа крысы лентивирусной суспензией pCMV (10x).

Распространение области заражения в медио-латеральном и дорзо-вентральном направлениях можно измерить непосредственно, а для оценки распространения в rostro-каудальном направлении необходимо обследование серий срезов известной толщины. У разных животных была инфицирована область от 4 (2*2*1) до 1,75 (1,5*1,5*1) мм³, что позволило изготавливать 3-4 переживающих среза толщиной 500 мкм из одного мозга.

3.2. Увеличение концентрации NGF и BDNF вследствие лентивирусной трансдукции.

Количественная оценка эффективности оверэкспрессии NGF и BDNF после вирусной трансдукции клеток зубчатой фасции гиппокампа была выполнена с помощью иммуноферментного анализа.

Образцы гиппокампов для анализа были получены от животных, отобранных случайным образом из групп, предназначенных для электрофизиологических экспериментов. Время между вирусной инъекцией и забором ткани составило 7 дней для всех животных. В случае конструкций с промотором CMV для достижения стабильной экспрессии необходимо 3-4 дня. Таким образом, в момент эксперимента эффект вирусной трансдукции был уже значимым.

В случае обоих исследуемых нейротрофинов, инъекция в гиппокампы животных контрольных вирусных суспензий pCMV без генов интереса не влияла на концентрацию NGF и BDNF (рис 3.2.1 и 3.2.2). Концентрации обоих нейротрофинов в правом гиппокампе, в который производилась инъекция, не отличаются от таковых в контралатеральном гиппокампе, являющимся отрицательным контролем. В случае же инъекции вирусных суспензий pCMV-NGF и pCMV-BDNF концентрация соответствующего нейротрофина увеличивалась примерно вдвое (рис 3.2.1 и 3.2.2).

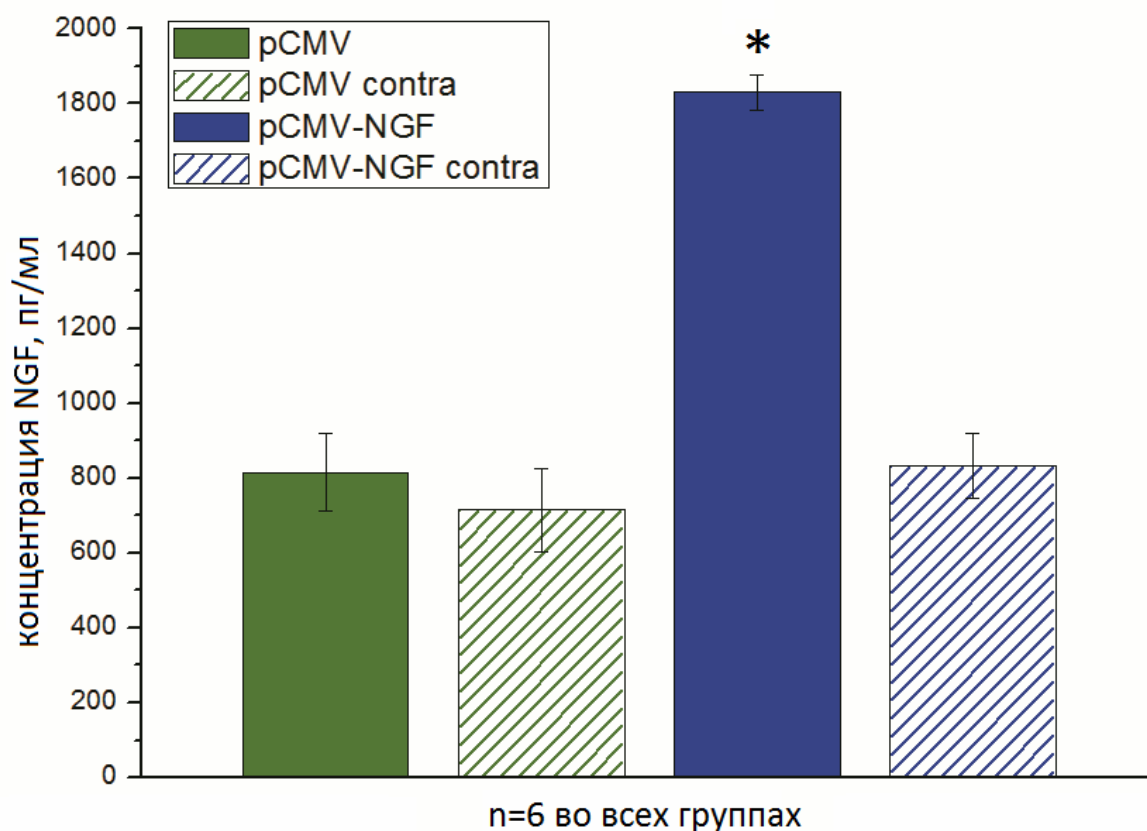


Рис. 3.2.1. Увеличение концентрации NGF после вирусной трансдукции. Синим – группа, трансдуцированная вирусом pCMV-NGF, зеленым – группа, трансдуцированная контрольным вирусом pCMV. Штриховка – образцы из контралатеральных гиппокампов соответствующих животных.

Средняя концентрация NGF после лентивирусной трансдукции составила 1830 ± 48 пг/мл ($n=6$) в ипсилатеральных гиппокампах, тогда как в контралатеральных гиппокампах тех же животных она равнялась 833 ± 88 ($n=6$). Результаты контрольных групп pCMV составили 815 ± 104 пг/мл ($n=6$, ipsi) и 714 ± 111 пг/мл ($n=6$, contra) соответственно. Показатели обоих гиппокампов контрольной группы и контралатеральных гиппокампов группы pCMV-BDNF статистически не отличаются друг от друга – $F(2,15)=0,39$ $p=0,68$ (ANOVA). В то же время, уровень NGF в ипсилатеральных гиппокампах животных, получивших вирусную инъекцию, достоверно отличается как от уровня в контралатеральных гиппокампах ($t=9,91 > t_{\text{Critical}}=2,30$ $p < 0,0001$), так и от уровня контрольной группы ($t=8,83 > t_{\text{Critical}}=2,36$ $p < 0,0001$).

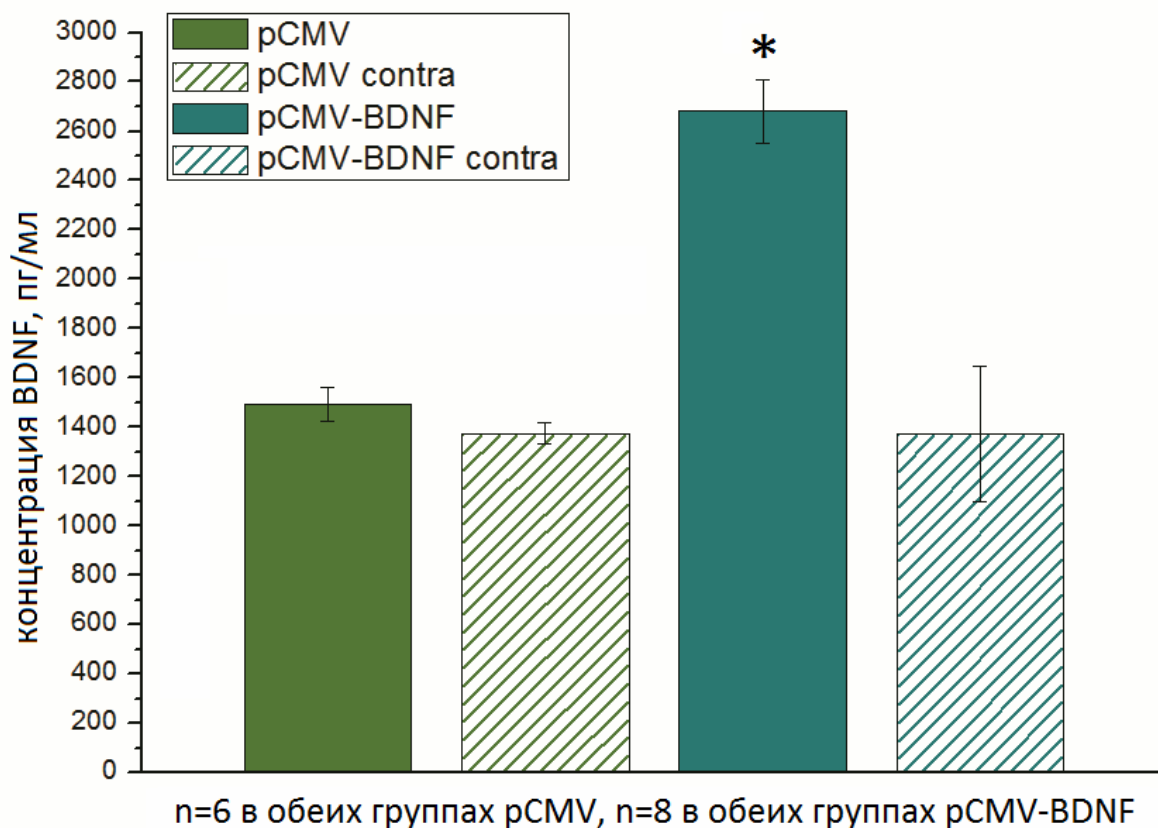


Рис. 3.2.1. Увеличение концентрации BDNF после вирусной трансдукции. Бирюзовым – группа, трансдуцированная вирусом pCMV-BDNF, зеленым – группа, трансдуцированная контрольным вирусом pCMV. Штриховка – образцы из контралатеральных гиппокампов соответствующих животных.

Средняя концентрация BDNF после лентивирусной трансдукции составила 2680 ± 131 пг/мл ($n=8$) в ипсилатеральных гиппокампах, тогда как в контралатеральных гиппокампах тех же животных она равнялась 1372 ± 276 пг/мл ($n=8$). Результаты контрольных групп pCMV составили 1493 ± 70 пг/мл ($n=6$, ipsi) и 1375 ± 44 пг/мл ($n=6$, contra) соответственно. Показатели обеих полушарий контрольной группы и контралатеральных гиппокампов группы pCMV-BDNF статистически не отличаются друг от друга – $F(2,14)=3,09$ $p=0,07$ (ANOVA). В то же время, уровень BDNF в ипсилатеральных гиппокампах животных, получивших вирусную инъекцию, достоверно отличается как от уровня в контралатеральных гиппокампах ($t=9,85 > t$

Critical=2,30 $p < 0,0001$), так и от уровня контрольной группы ($t=8,94 > t$ Critical=2,36 $p < 0,0001$).

Необходимо отметить, что в данном случае невозможно сравнить концентрации NGF и BDNF между собой ввиду различного коэффициента адгезии антител в наборах для ИФА, пусть и выпущенных одним и тем же производителем. Степень прироста концентраций нейротрофинов после вирусной трансдукции, несомненно, зависит от используемого промотора и от возраста животных. В предыдущих работах мы аналогичным образом оценивали эффективность оверэкспрессии NGF после инъекции вирусной суспензии, основанной на конструкции с нейрон-специфическим промотором CaMKII, взрослым крысам Вистар. Прирост средней концентрации NGF составил в этом случае 68%, если за 100% принять концентрацию в контралатеральных гиппокампах (Иванов, 2011). Данные различия могут быть объяснены тем, что при использовании промотора для убиквитарной экспрессии (CMV) нейротрофины нарабатываются как нейронами, так и глиальными клетками, благодаря чему достигается больший прирост концентрации. Таким образом, для последующих экспериментов было решено использовать неспецифические промоторы и проведение экспериментов на ювенильных крысах.

3.3. Заключение.

Приведенные в данной главе данные убедительно демонстрирую, что локальная вирусная трансдукция зубчатой фасции гиппокампа крыс приводит к достоверному устойчивому двукратному повышению концентрации исследуемых нейротрофинов. При этом сами процессы вирусной инъекции и последующего заражения клеток не оказывали сколь-нибудь заметного влияния на концентрацию NGF и BDNF по сравнению с негативным контролем.

ГЛАВА 4. ДОЛГОВРЕМЕННАЯ ПОТЕНЦИАЦИЯ НА ФОНЕ ОВЕРЭКСПРЕССИИ НЕЙРОТРОФИНОВ В НОРМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ.

4.1. Контрольные группы.

Для выявления возможных побочных эффектов лентивирусной трансдукции *per se* на параметры длительной посттетанической потенциации был использован контрольный вирус рСМV. В ходе экспериментов не были зарегистрированы никакие заметные изменения базовой нейротрансмиссии и динамики долговременной потенциации. В соответствии с обычной практикой, из эксперимента были исключены срезы, продемонстрировавшие нестабильность базовой трансмиссии. Во всех группах, кроме группы рСМV-BDNF, о которой будет сказано ниже, процент таких срезов был невелик (один-два на группу). Появление нестабильных срезов связано с неизбежными неточностями резки, а также с индивидуальными особенностями экспериментальных животных.

В стабильных срезах в ходе эксперимента наблюдалась ожидаемая динамика амплитуды фокальных ВПСП. До тетанизации все ВПСП имели примерно одинаковую амплитуду, близкую к средней на этом временном отрезке (100%). После высокочастотной тетанизации в рамках индукции долговременной потенциации ВПСП усиливались до 190-220%. В настоящий момент общепринятым является разделение долговременной потенциации на раннюю и позднюю фазы и определение временной границы между ними на уровне 40-60 минут после индукции (Rowan et al., 2003). В данных экспериментах регистрация ВПСП продолжалась 120 минут после тетанизации, т.е. запись гарантированно включала в себя как всю раннюю фазу (E-LTP), так и начало поздней фазы (L-LTP). К концу эксперимента амплитуда ВПСП, как правило, незначительно уменьшалась до 185-190%. В качестве четкого количественного параметра, позволяющего сравнивать

группы между собой удобно использовать среднее значение относительной амплитуды фокальных ВПСП после тетанизации.

Средняя амплитуда ВПСП после тетанизации составила в контрольной группе $rSMV$ $196,8 \pm 12,3\%$ ($n=6$) от средней амплитуды до тетанизации, а в группе чистого контроля – $200,7 \pm 10,8\%$ ($n=8$). Примеры ВПСП, полученные на срезе из группы $rSMV$ приведены на рисунке 4.1.

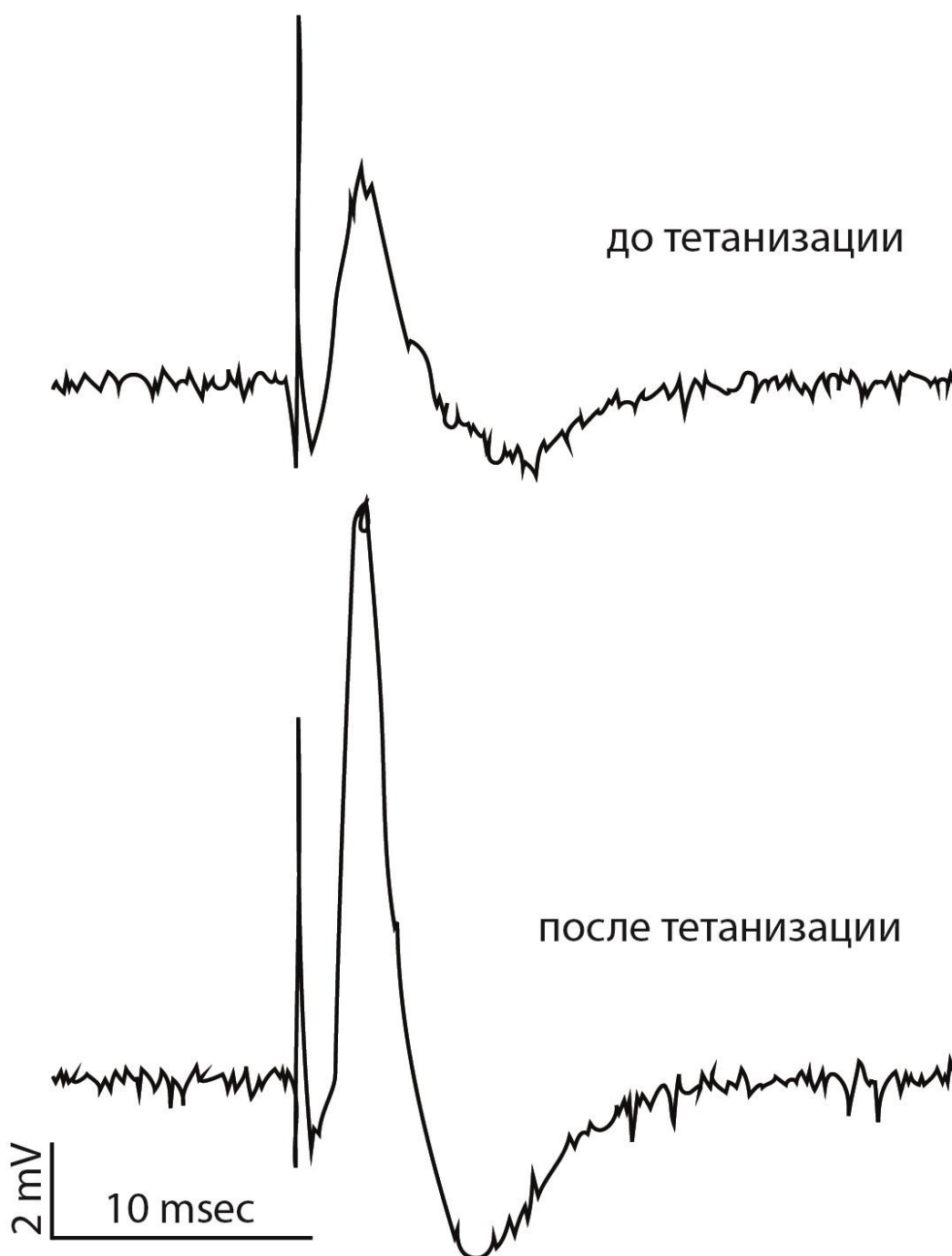


Рис. 4.1. Примеры фокальных ВПСП среза контрольной группы $rSMV$ до и после высокочастотной тетанизации.

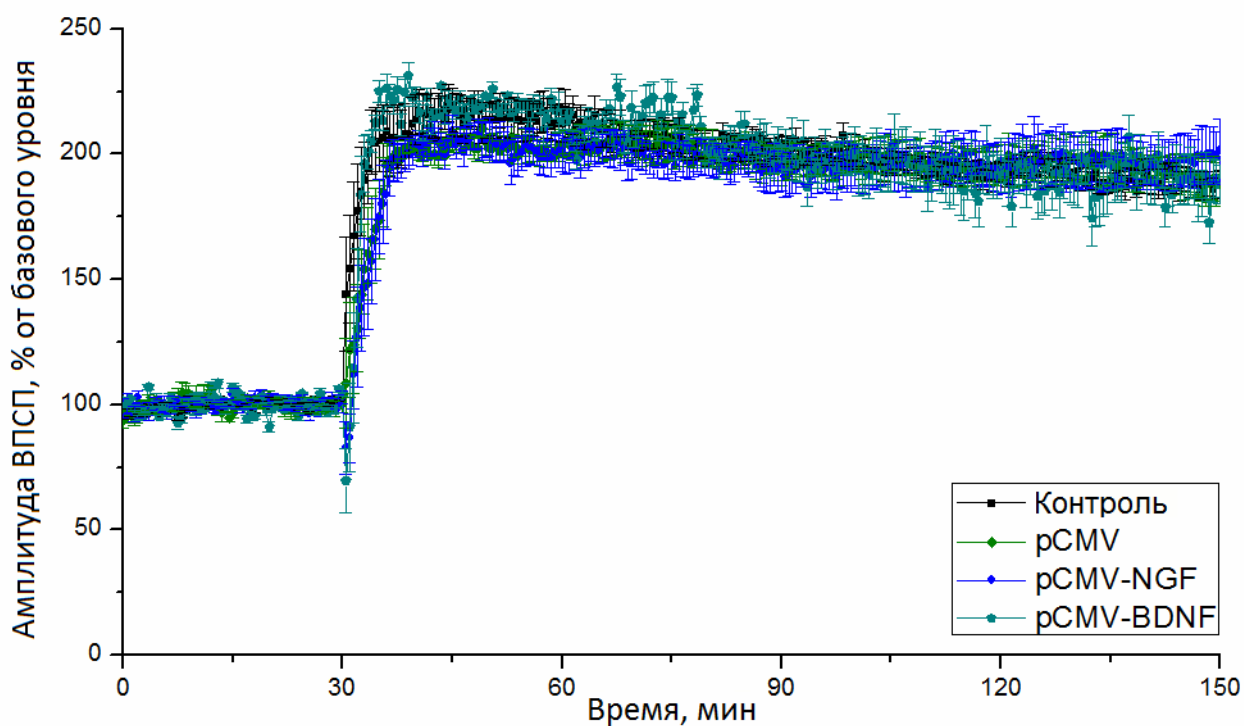


Рис 4.2. Динамика изменения средних амплитуд фокальных ВПСП после высокочастотной тетанизации в нормальных условиях. Черным – чистый контроль, зеленым – вирусный контроль rCMV, синим – группа с оверэкспрессией NGF, бирюзовым – группа с оверэкспрессией BDNF. Здесь и далее значения представлены в виде процентов от средней амплитуды ВПСП до тетанизации, разброс – ошибка среднего.

4.2. Группы с оверэкспрессией нейротрофинов.

Срезы из обеих групп с оверэкспрессией нейротрофинов продемонстрировали в нормальных условиях потенциацию, не отличающуюся от потенциации контрольных групп (рис. 4.2). В группе rCMV-NGF средняя амплитуда ВПСП после тетанизации составила $195,4 \pm 14,7\%$ (n=6), а в группе rCMV-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).

Для случая гиперэкспрессии NGF такой результат вполне предсказуем – в литературе абсолютно преобладают данные о возможном нейротрофическом действии фактора роста нервов (Kemp et al., 2011; Ubhi et al., 2013), в то время как непосредственные изменения синаптической пластичности вследствие инъекции NGF до сих пор не описаны (Kang, Schuman, 1995). Снижение или подавление синтеза и процессинга NGF ведет к глобальным патологическим изменениям, существенно более негативным, чем локальная дисрегуляция отдельных групп синапсов (Allen, Dawbarn, 2006; Capsoni, Cattaneo, 2006; Allard et al., 2012).

Результаты группы pCMV-BDNF, напротив, несколько неожиданны. Вовлеченность BDNF в процесс регуляции синаптической пластичности не вызывает сомнения (Bramham, Mésaoudi, 2005; Park, Poo, 2013). Известно, что BDNF воздействует как на пресинапс, так и на постсинапс, контролируя выброс медиатора, нивелируя синаптическую усталость и обеспечивая консолидацию LTP. Все эти процессы нарушаются при фармакологической блокаде BDNF-сигналинга (Patterson et al., 2001; Minichiello et al., 2002). Вместе с тем, для случаев увеличения, а не уменьшения концентрации BDNF, в литературе подробно описан феномен BDNF-LTP (Kang, Schuman, 1995; Gomez-Palacio-Schjetnan, Escobar, 2013). Суть BDNF-LTP заключается в самопроизвольной, не требующей тетанизации потенциации синапсов после инкубации среза в растворе BDNF, либо после его локальной инъекции. Во всех опубликованных работах на эту тему речь идет именно о резком увеличении концентрации фактора роста нервов на малом временном отрезке, непосредственно предшествующем потенциации.

В этой методической детали и кроется основное отличие данной работы от большинства ранее опубликованных: использование локальной вирусной трансдукции позволило существенно повысить концентрацию нейротрофического фактора мозга на длительный срок. Непосредственно перед началом регистрации ВПСН никаких острых изменений уровня BDNF не происходило, поэтому феномен BDNF-LTP и не мог быть

зарегистрирован. Следует, однако, отметить, что группа срезов с оверэкспрессией BDNF явно отличалась от остальных групп более высокой долей нестабильных срезов. Если в прочих группах таковых было один-два из шести-восьми, то в группе рCMV-BDNF нестабильных срезов, исключенных из эксперимента, было четыре из десяти. Можно предположить, что высокая доля нестабильных срезов в группе с оверэкспрессией BDNF связана с процессами, происходящими при BDNF-LTP, однако использовавшаяся методика экспериментов не позволяет ответить на этот вопрос.

4.3. Парное отношение и пресинаптический компонент пластичности.

Для оценки возможного влияния оверэкспрессии исследуемых нейротрофинов на пресинаптический компонент пластичности, некоторые эксперименты были проведены в режиме парной стимуляции. В синапсе зубчатая фасция – перфорантный пучок (DG-PP) в зависимости от попадания стимулирующего электрода в латеральную или медиальную часть пучка может наблюдаться как парная фасилитация, так и парная депрессия соответственно (Colino, Malenka, 1993). В ходе экспериментов имели место оба варианта, однако парные коэффициенты в группах не различались, т.е. пресинаптический компонент пластичности не был затронут (рис. 4.3). Ни сам процесс вирусной трансдукции, ни увеличение концентрации нейротрофинов не оказали значимого влияния на процессы транспорта и выброса медиатора.

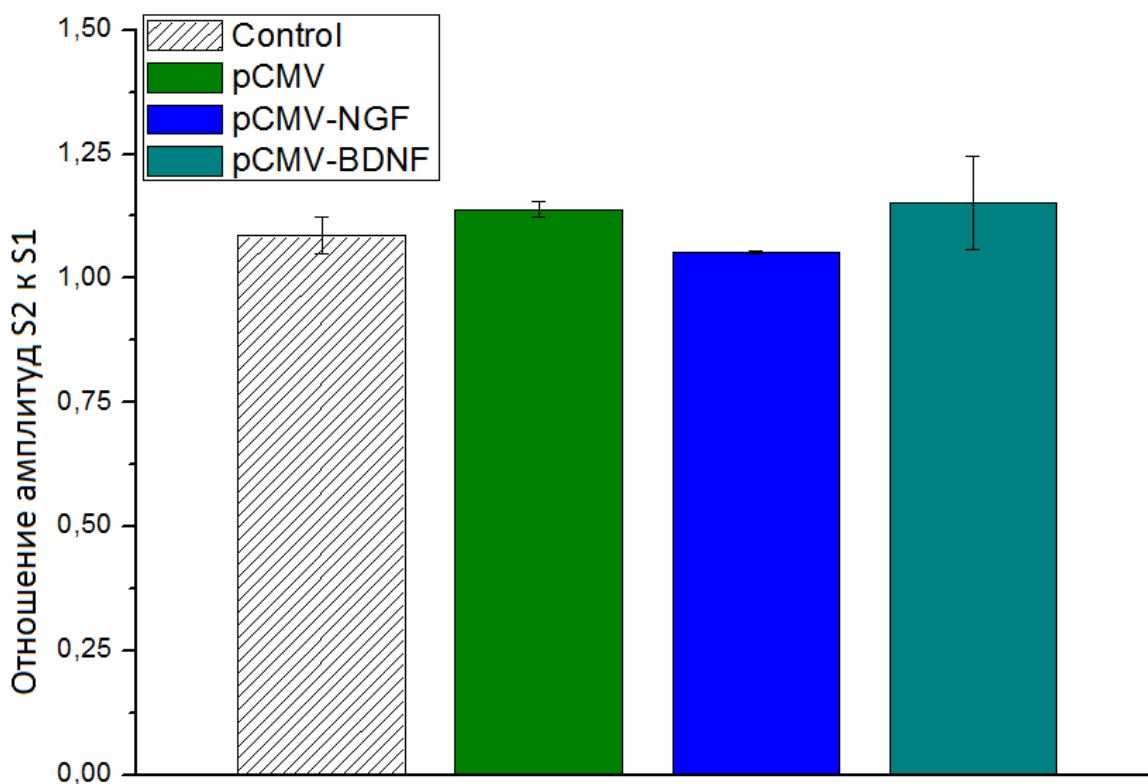


Рис. 4.3. Парная фасилитация. Отношения амплитуд второго стимула в паре к первому при межстимульном интервале 50 мсек. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил значимых различий между контрольными и экспериментальными группами: $F(3,5)=1,08$ $p=0,44$.

4.4. Заключение.

Приведенные в настоящей главе данные убедительно доказывают отсутствие видимых побочных эффектов вирусной трансдукции на динамику LTP. Увеличение концентрации фактора роста нервов и нейротрофического фактора мозга также не оказало никакого заметного влияния на процессы индукции, консолидации и поддержания долговременной потенциации. Подобный результат достаточно предсказуем в случае оверэкспрессии NGF, так как в литературе до сих пор не отмечены какие-либо изменения синаптической пластичности под действием фактора роста нервов, за исключением компенсаторных, т.е. направленных на возвращение *status quo*.

Отсутствие видимых последствий оверэкспрессии BDNF, однако, отнюдь не было очевидно на основании литературных данных. В ходе

эксперимента ожидаемым было скорее проявление феномена BDNF-LTP в том или ином виде. Отсутствие данного эффекта было обусловлено методическими особенностями работы, а именно долговременным стабильным увеличением концентрации нейротрофического фактора мозга, которое не обеспечивало необходимого для генерации BDNF-LTP резкого скачка концентрации BDNF.

Таким образом, стабильная оверэкспрессия исследуемых нейротрофинов в нормальных условиях не затрагивает базовые характеристики пластичности в синапсах зубчатая фасция – перфорантный пучок.

ГЛАВА 5. ДОЛГОВРЕМЕННАЯ ПОТЕНЦИАЦИЯ НА ФОНЕ ОВЕРЭКСПРЕССИИ НЕЙРОТРОФИНОВ В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ.

5.1. Подавление посттетанической потенции бета-амилоидным пептидом.

Для моделирования патологических условий в данной работе был использован β -амилоидный пептид, нарушение метаболизма которого считается одним из центральных элементов развития нейродегенерации при болезни Альцгеймера (Гаврилова, 2007; Castellani et al, 2008).

В соответствии с современной версией т.н. амилоидной теории, растворимый $A\beta$ токсичен и способен вызывать когнитивные нарушения уже на раннем этапе развития болезни Альцгеймера. Неоднократно экспериментально доказана способность $A\beta$ угнетать долговременную потенцию в гиппокампе крыс *in vivo* (Chapman et al., 2001; Dewatcher et al., 2002; Wang et al., 2002; Rowan et al., 2003).

В качестве оптимального способа оказания негативного воздействия на нейроны гиппокампа была выбрана предварительная инкубация переживающих срезов мозга в растворе $A\beta/ACSF$. Рабочая концентрация $A\beta$ была установлена опытным путем.

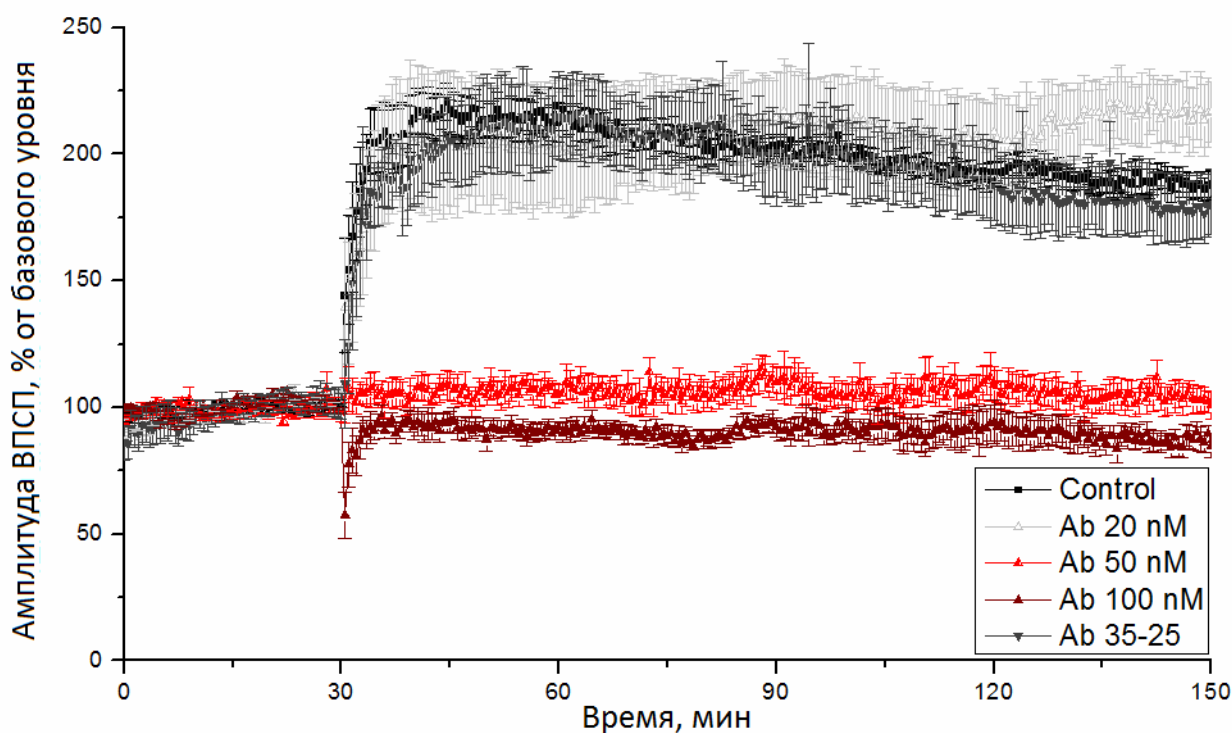


Рис. 5.1. Дозо-зависимое патогенное влияние $A\beta$ на динамику долговременной потенциации в зубчатой фасции. Черным – чистый контроль, серым – срезы после инкубации в 20 нМ растворе $A\beta$, красным – в 50 нМ растворе $A\beta$, коричневым – в 100 нМ растворе $A\beta$, темно-серым – в 50 нМ растворе контрольного $A\beta$ 35-25.

Как видно на рис. 5.1, инкубация срезов в 20 нМ растворе $A\beta$ не оказала заметного влияния на динамику долговременной потенциации. Средняя амплитуда ВПСР 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 – $196,0 \pm 14,3\%$ ($n=5$).

Напротив, часовая инкубация срезов как в 50 нМ, так и в 100 нМ растворе $A\beta$ /ACSF приводила к полной блокаде долговременной потенциации при использовании обычных параметров тетанизации. Средняя амплитуда фокальных ВПСР в группе срезов, инкубированных в 50 нМ растворе $A\beta$, составила $106,1 \pm 2,7\%$ ($n=5$). В группе срезов, инкубированных в

100 нМ растворе, средняя амплитуда составила $90,2 \pm 3,4$ ($n=5$), т.е., имела место даже небольшая депрессия. Показатели обеих групп достоверно отличались от результатов как группы чистого контроля (соответственно $t=31,1 > t_{\text{крит}}=1,65$ $p < 0,0001$ и $t=36,1 > t_{\text{крит}}=1,65$ $p < 0,0001$), так и 20 нМ А β (соответственно $t=31,1 > t_{\text{крит}}=1,65$ $p < 0,0001$ и $t=35,8 > t_{\text{крит}}=1,65$ $p < 0,0001$) и А β 35-25 (соответственно $t=29,7 > t_{\text{крит}}=1,65$ $p < 0,0001$ и $t=34,7 > t_{\text{крит}}=1,65$ $p < 0,0001$). Для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация раствора А β 50 нМ – минимальная достаточная для предотвращения индукции LTP.

5.2. Различия в нейропротекторном эффекте NGF и BDNF.

Защитное действие нейротрофинов, прежде всего, фактора роста нервов, многократно описано в литературе (Гомазков, 2011; Blesh et al., 2005; Tuszyński et al., 2005; 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 А β 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 рСМV.

Как и ожидалось, в обеих контрольных группах воздействие А β полностью предотвратило развитие долговременной потенциации (рис. 5.2). Средняя амплитуда ВПСП после тетанизации составила в группе А β $106,1 \pm 2,7\%$ ($n=5$), а в группе рСМV+А β – $104,4 \pm 4,6\%$ ($n=6$). Результаты статистического анализа не позволяют, однако, принять гипотезу об отсутствии различий между группами: $t=3,4 > t_{\text{крит}}=1,65$ $p < 0,001$ (Т-тест).

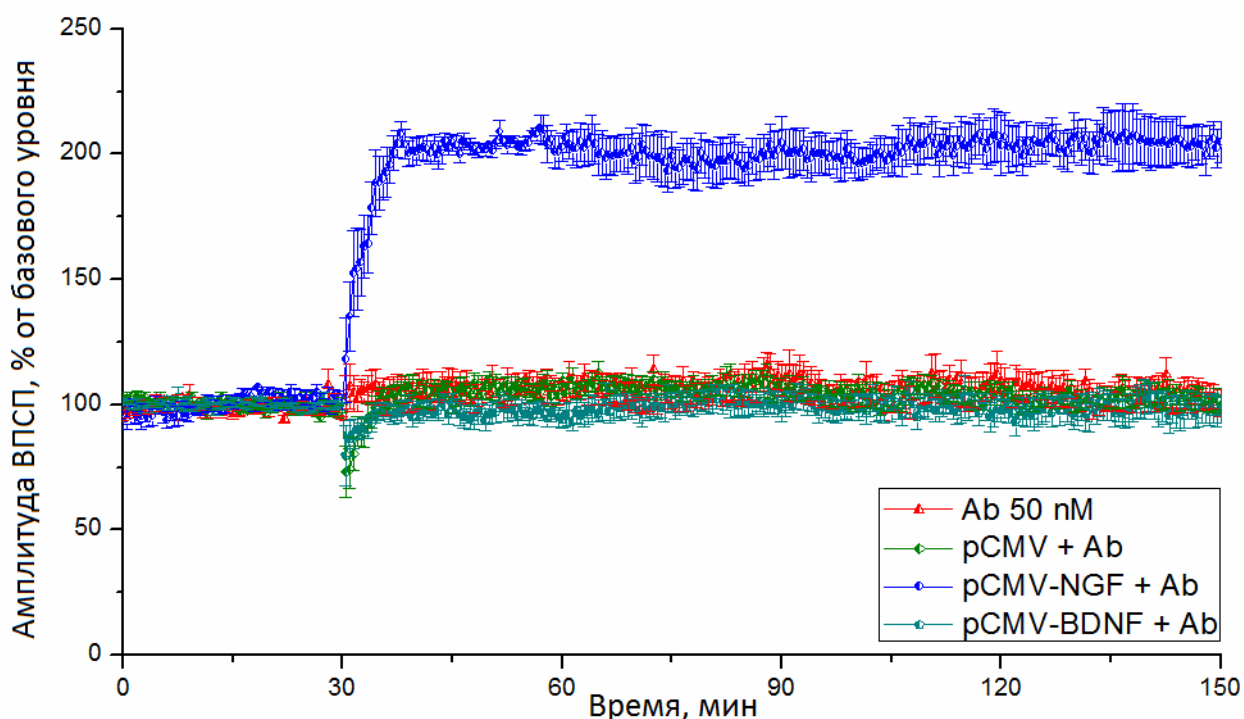


Рис 5.2. Динамика изменения средних амплитуд фокальных ВПСР после высокочастотной тетанизации в условиях предварительной инкубации срезов в растворе Аβ. Красным – контроль, зеленым – pCMV, синим – группа с сверхэкспрессией NGF, бирюзовым – группа с сверхэкспрессией BDNF.

Результаты групп NGF и BDNF отличались. В полном соответствии с предположениями и работами коллег, группа с сверхэкспрессией фактора роста нервов продемонстрировала нормальную мощность и динамику развития LTP: $200,3 \pm 10,1\%$ ($n=6$). Подобное двукратное увеличение средней амплитуды ВПСР после тетанизации статистически достоверно отличается от показателей групп Аβ ($t=31,4 > t_{\text{крит}}=1,65$ $p < 0,0001$) и pCMV+Аβ ($t=31,9 > t_{\text{крит}}=1,65$ $p < 0,0001$).

Группа с сверхэкспрессией нейротрофического фактора мозга, напротив, показала результат близкий, хотя и не вполне тождественный показателям контрольных групп: $98,3 \pm 2,9\%$ ($n=5$). Сравнение группы BDNF с группой Аβ и с группой pCMV+Аβ посредством Т-теста Стьюдента не позволяет принять гипотезу об отсутствии различий между каждой парой групп: $t=22,0 > t$

крит=1,65 $p < 0,0001$ и $t = 15,9 > t_{\text{крит}} = 1,65$ $p < 0,0001$ соответственно. На качественном уровне, однако, их сходство очевидно – как и в случае обеих этих групп, в группе BDNF нормальной потенциации нет. Столь же очевидно наличие значимых различий между результатами групп BDNF и NGF ($t = 34,0 > t_{\text{крит}} = 1,65$ $p < 0,0001$).

Пространственные структуры и аминокислотные последовательности фактора роста нервов и нейротрофического фактора мозга совпадают на 90%, что позволяет ожидать и сходства выполняемых функций и реализуемых эффектов. Полученные в ходе эксперимента данные, однако, заставляют отвергнуть подобное допущение. Существование функциональных различий между этими двумя родственными нейротрофинами видно уже на основании упоминавшейся в предыдущей главе важнейшей работы Канга и Шумана (Kang, Shuman, 1995), в которой был впервые описан феномен BDNF-LTP. В позднейших работах ведущих научных коллективов роль BDNF в модуляции процессов синаптической пластичности была изучена чрезвычайно подробно, что привело к формулировке синтетической BDNF-гипотезы синаптической консолидации (Bramham, Mésaoudi, 2005; Lu et al., 2008; Gomez-Palacio-Schjetnan, Escobar, 2013; Park, Poo, 2013). В рамках этой гипотезы, трофическая поддержка нейронов нейротрофическим фактором мозга без сомнения критически важна для реализации синаптической передачи, однако до сих пор в опубликованных работах не встречается никаких доказательств способности BDNF оказывать прямое нейропротекторное действие на нейроны, за исключением редукционных моделей на базе клеточных культур. Одна из самых подробных недавних обзорных статей на эту тему за авторством Нагахары и Тусзинского полна предположений и перечислений перспектив использования нейротрофического фактора мозга в терапевтических целях, но предоставляет не вполне достаточную фактическую базу (Nagahara, Tuszynski, 2011).

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 бета-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 β (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 β (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 β 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 бета-амилоидного пептида, из-за неустойчивости к последнему его рецепторов TrkB.

5.3. Заключение.

Данная глава посвящена экспериментальному подбору концентрации бета-амилоидного пептида, достаточной для нарушения нормальной динамики длительной посттетанической потенциации, и дальнейшему исследованию возможности компенсации патогенных воздействий путем повышения концентрации NGF и BDNF.

Переживающие срезы мозга были подвергнуты инкубации в растворах A β концентрацией 20, 50 и 100 нМ. 20 нМ раствор не оказал заметного влияния на динамику LTP, в то время как инкубация в 50 и 100 нМ растворах приводила к полной блокаде индукции длительной потенциации. В дальнейших экспериментах был использован 50 нМ раствор A β .

Локальная оверэкспрессия нейротрофического фактора мозга в гиппокампе экспериментальных животных не оказывала какого-либо защитного эффекта на синаптическую пластичность в патологических условиях. На основе этого результата и анализа литературы по проблеме можно сделать вывод о том, что недостаток BDNF явно ведет к негативным последствиям для нейронов, но его избыток недостаточен для противодействия воздействию бета-амилоида.

Долговременное повышение концентрации фактора роста нервов, наоборот, полностью компенсировало негативное воздействие растворимого A β на пластические свойства нейронов зубчатой фации гиппокампа и способствовало поддержанию их оптимального функционального состояния.

Выяснению механизмов, ответственных за реализацию нейропротекторного эффекта NGF, посвящена следующая глава.

ГЛАВА 6. ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ.

Исходя из общих сведений о нейротрофических факторах, описанный в предыдущей главе защитный эффект NGF может быть связан с увеличением активности каскадов рецептора TrkA. Таких каскадов, как уже было упомянуто в обзоре литературы, три: каскад MAPK, каскад PI3K и каскад PLC- γ 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. Оптимальным путем выявления значимости вклада каждого из каскадов в развитие итогового защитного эффекта является постановка электрофизиологических экспериментов с использованием селективных ингибиторов активности киназ.

6.1. Каскад фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K).

Как уже было сказано в первой главе, каскад PI3K традиционно связывают с обеспечением роста и выживания клеток (Vaillant et al., 1999; Segal, 2003; Skaper, 2008).

В ходе экспериментов, активность каскада была заблокирована специфическим ингибитором фосфатидилинозитол-3-киназы LY294002 (Vlahos et al., 1994).

Из литературы следует, что LY294002 в концентрации 20 μ M не влияет на индукцию и поддержание LTP в интактных переживающих срезах мозга крыс, но успешно предотвращает пластические изменения, вызванные обучением животных или использованием фармакологических агентов (Peineau et al., 2007; Bruel-Jungerman et al., 2009; Mans et al., 2010).

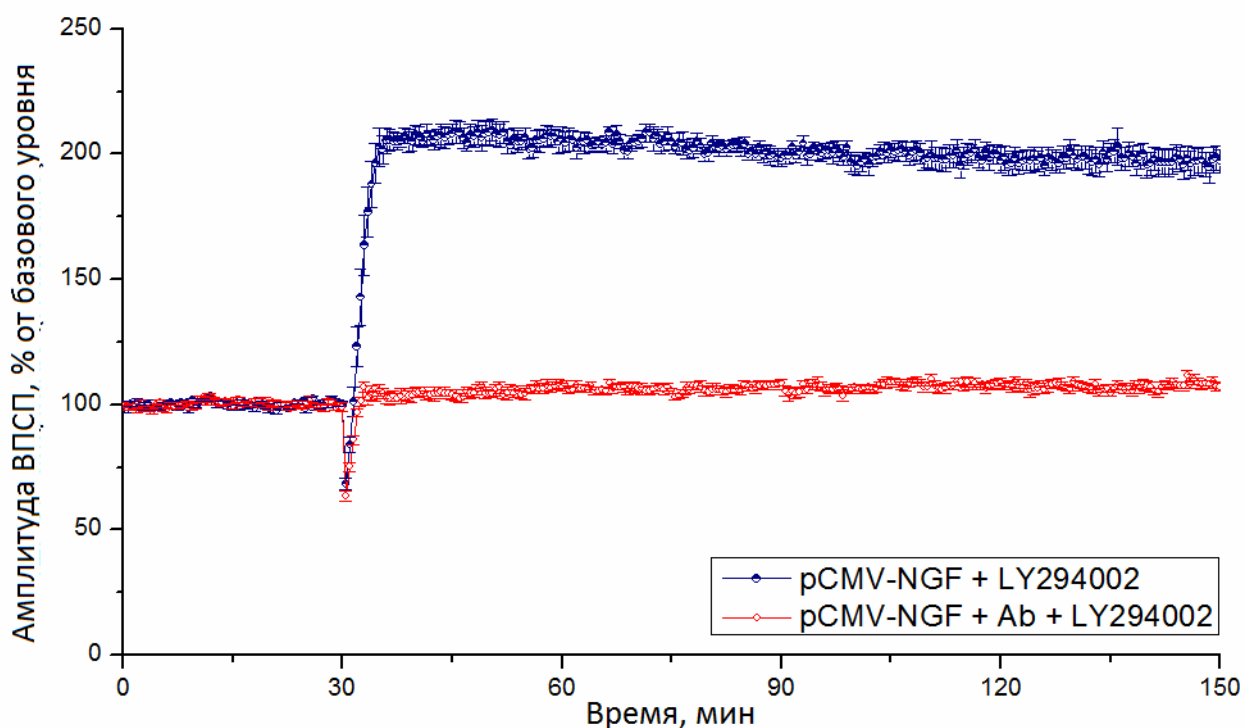


Рис. 6.1. Динамика изменения средних амплитуд ВПСП после высокочастотной тетанизации в условиях подавления активности каскада PI3K. Синим – срезы группы с оверэкспрессией NGF, инкубированные в растворе LY294002; красным – срезы группы с оверэкспрессией NGF, инкубированные в растворах LY294002 и Aβ.

В данной работе, как видно на рис. 6.1, LY294002 также не повлиял на потенциацию срезов группы pCMV-NGF. Показатели этой группы составили $200,0 \pm 14,7\%$ ($n=5$) и не имели достоверных отличий от записанных ранее групп чистого контроля ($200,7 \pm 10,8\%$ $n=8$) и контроля pCMV ($196,8 \pm 12,3\%$ $n=6$), а также от группы pCMV-NGF, не обработанной ингибитором ($195,4 \pm 14,7\%$ $n=6$). Однофакторный дисперсионный анализ не выявил значимых различий между всеми перечисленными группами: $F(3,1200)=0,62$ $p=0,64$ (ANOVA).

При этом подавление с помощью LY294002 активности PI3K привело к неспособности срезов из группы pCMV-NGF противостоять патогенному действию раствора бета-амилоида (25-35). Средняя амплитуда ВПСП после

тетанизации в группе срезов, инкубированных в 50 нМ растворе Аβ/ACSF, составила $106,8 \pm 4,1\%$ (n=6), что достоверно отличается от показателей группы срезов, не обработанных Аβ ($p < 0,0001$). Таким образом, активность каскад фосфатидилинозитол-3-киназы критична для реализации нейропротекторного эффекта фактора роста нервов.

6.2. Каскад активируемой митогенами протеинкиназы (МАРК).

Основной функцией каскада МАРК считается обеспечение дифференцировки нейронов и роста отростков, изменение интенсивности белкового синтеза и активности транскрипционных факторов. Кроме того, этот каскад чрезвычайно важен для перехода долговременной потенциации в позднюю фазу в рамках процесса консолидации (English, Sweatt, 1997; Huang, Reichardt, 2001).

Активность каскада была заблокирована специфическим ингибитором активируемой митогенами протеинкиназы U0126 (Favata et al., 1998)

Опубликованные данные о влиянии U0126 на потенциацию в интактных срезах достаточно противоречивы. Некоторые авторы утверждают, что аппликация U0126 не оказывает негативного влияния на LTP, индуцируемую достаточно сильной высокочастотной тетанизацией, в то время как большое число недавних работ показывает полное подавление потенциации этим ингибитором (Steward et al., 2007; Gelinias et al., 2008; Schafe et al., 2008; Asrar et al., 2009; Jin et al., 2013).

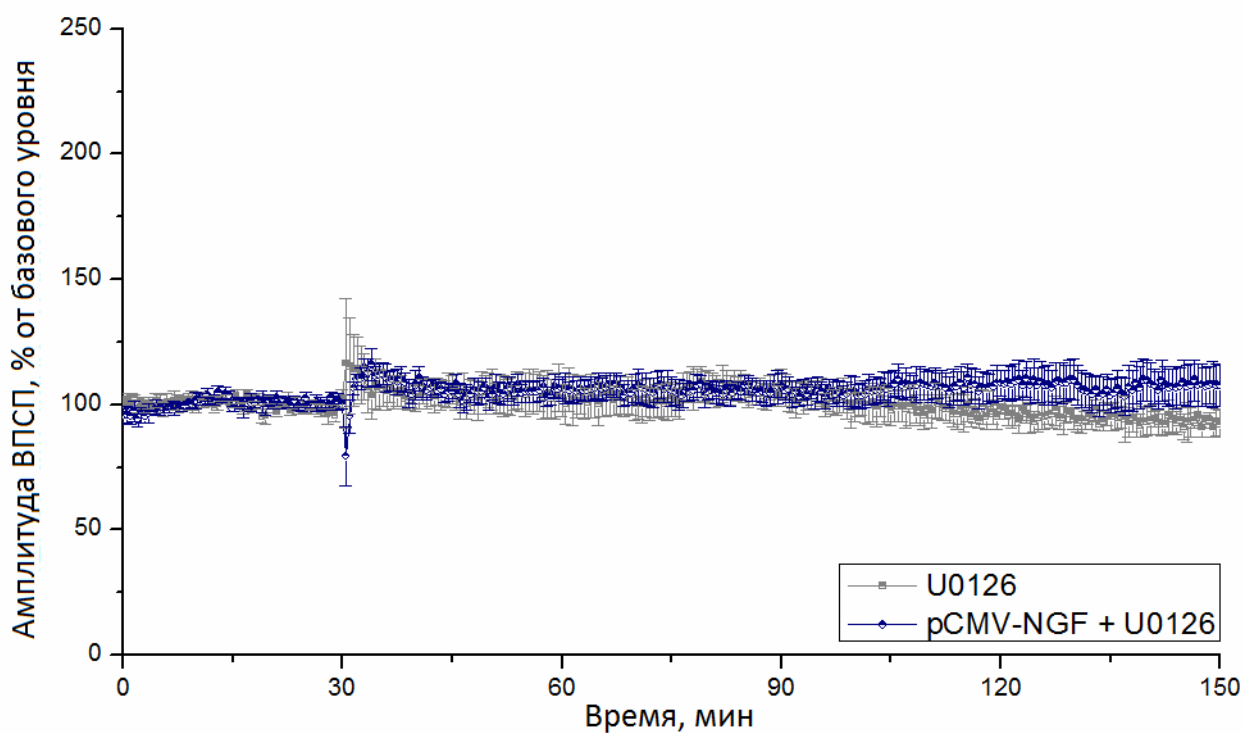


Рис. 6.2. Динамика изменения средних амплитуд ВПСП после высокочастотной тетанизации в условиях подавления активности каскада MAPK. Серым – контрольные срезы, инкубированные в растворе U0126; синим – срезы группы с оверэкспрессией NGF, инкубированные в растворе U0126.

В ходе проведенных экспериментов, использование U0126 в концентрации 20 μM для подавления активности каскада неизменно приводило к полному подавлению LTP (рис 6.2). Средняя амплитуда ВПСП после тетанизации составила в группе U0126 $100,9 \pm 5,0\%$ ($n=4$), а в группе pCMV-NGF + U0126 $106,5 \pm 2,9\%$ ($n=4$). Таким образом, прояснить роль каскада в реализации защитного эффекта NGF напрямую не удалось. Вовлеченность каскада MAPK в процесс защиты пластических свойств нейронов зубчатой фасции от подавления бета-амилоидом возможна, но разрешение этого вопроса требует поиска других ингибиторов активности киназ и проведения экспериментов по иному протоколу.

6.3. Каскад PLC- γ 1/PKC (фосфолипаза C- γ 1/протеин киназа C).

Активация каскада фосфолипазы C- γ 1 ведет к мобилизации выхода Ca^{2+} из внутриклеточных резервуаров, фосфорилирования AMPA-рецепторов и потенциал-зависимых ионных каналов, а также изменения интенсивности синтеза белков, в т.ч. белков K-каналов. Все вышеперечисленное критически важно для индукции и для ранней фазы долговременной потенциации (Matsumoto et al., 2001; Lu et al., 2005).

Последствия ингибирования активности каскада PLC- γ 1 недостаточно подробно описаны в литературе. Тем не менее, обобщая немногочисленные имеющиеся статьи, можно предположить, что аппликация специфического ингибитора фосфолипазы C- γ 1 U-73122 в микромолярных концентрациях не должна иметь значимых последствий для реализации защитного действия фактора роста нервов (Sarihi et al., 2008; Zhang et al., 2012; Rinaldo, Hansel, 2013).

Аналогично экспериментам с LY294002, воздействию ингибитора PLC- γ 1 U-73122 в концентрации 20 μM были подвергнуты срезы группы pCMV-NGF, как инкубированные, так и не инкубированные в 50 нМ растворе A β /ACSF.

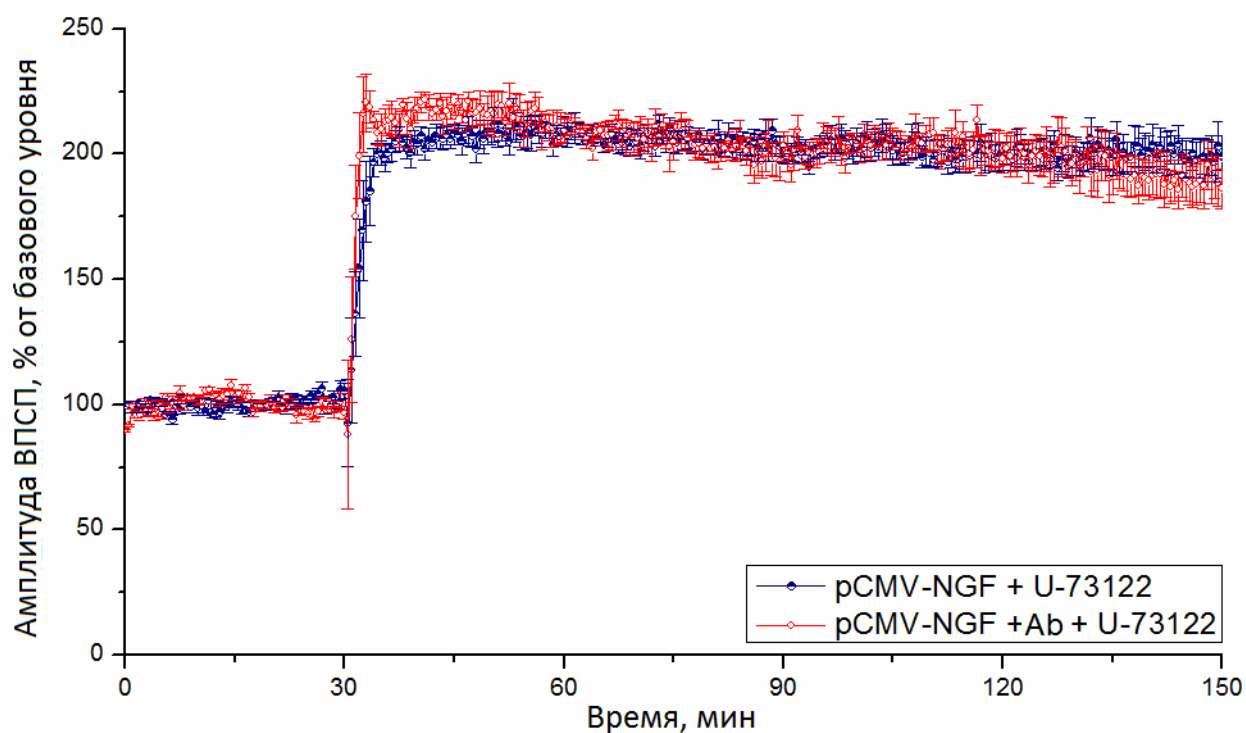


Рис. 6.3. Динамика изменения средних амплитуд ВПСР после высокочастотной тетанизации в условиях подавления активности каскада PLC- γ 1. Синим – срезы группы с оверэкспрессией NGF, инкубированные в растворе U-73122; красным – срезы группы с оверэкспрессией NGF, инкубированные в растворах U-73122 и A β .

Часовая пре-инкубация срезов из группы pCMV-NGF в растворе U-73122 не изменила динамику индукции и развития LTP. Средняя амплитуда фокальных ВПСР в этой группе составила после тетанизации $201,7 \pm 11,6\%$ (n=4). Срезы группы pCMV-NGF, обработанные одновременно U-73122 и A β , также продемонстрировали нормальный уровень потенциации: $203,5 \pm 12,6\%$ (n=4). Однофакторный дисперсионный анализ не выявил значимых различий между обеими группами U-73122 и группами чистого pCMV-NGF, интактного контроля и вирусного контроля pCMV: $F(4,1500)=1,27$ $p=0,27$ (ANOVA). Результаты проведенных экспериментов не позволяют утверждать незначимость каскада фосфолипазы C для реализации нейропротекторного действия NGF, однако позволяют считать его значимость неподтвержденной.

6.4. Заключение.

Для выявления возможных механизмов реализации обнаруженного защитного эффекта фактора роста нервов были проведены эксперименты по стандартному протоколу с дополнительным последовательным подавлением активности трех киназных каскадов рецептора TrkA. 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 бета-амилоида. Важно отметить, что в общепризнанной схеме сигналинга рецептора TrkA (см. гл. 1) 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 сигналинга киназных каскадов рецептора NGF TrkA, выявили критическую важность каскада фосфатидилинозитол-3-киназы для реализации обнаруженного защитного действия фактора роста нервов.

В соответствие 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. Широкоизвестный 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 нейроны 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор сердечно благодарит за неоценимую помощь и поддержку:

- Владимира Александровича Маркевича;
- Сергея Владимировича Саложина;
- Гульнур Рашидовну Тухбатову;
- коллектив лаборатории Молекулярной нейробиологии;
- коллектив лаборатории Нейрофизиологии обучения;
- коллектив лаборатории Функциональной биохимии нервной системы;
- Михаила Юрьевича Степаничева;
- Марию Степановну Лемак;
- Наталью Вячеславну Баль;
- Елену Петровну Кулешову;
- кафедру ВНД биологического факультета МГУ;
- Алексея Владимировича Тихомирова;
- Ивара Оскарловича Мурдмаа;
- Елену Владимировну Иванову.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гаврилова С.И.* Фармакотерапия болезни Альцгеймера. М.: Пульс, 2007. 13-108 с.
- Гомазков О.А.* Старение мозга и нейротрофическая терапия. М.: ИКАР, 2011. 41-68 с.
- Иванов А.Д.* Функциональные изменения в мозге крыс при локальной лентивирусной трансдукции фактора роста нервов. М.: на правах рукописи, 2011.
- Иванов А.Д.* Роль NGF и BDNF в регуляции деятельности зрелого мозга. Журн. высш. нерв. деят. 2014. 64(2): 137-146.
- Саложин С.В., Большаков А.П.* Трансфекция клеток нервной системы. Журн. высш. нерв. деят. 2008. 58(6): 658-669.
- Степаничев М.Ю.* Современные подходы и перспективы применения генной терапии болезни Альцгеймера. Нейрохимия. 2011. 28(3): 181-191.
- 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.
- Aicardi G., Argilli E., Cappello S., Santi S., Riccio M., Thoenen H., Canossa M.* Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. 101: 15788-15792.
- Allard S., Leon W.C., Pakavathkumar P., Bruno M.A., Ribeiro-da-Silva A., Cuellar A.C.* Impact of the NGF maturation and degradation pathway on the cortical cholinergic system phenotype. J Neurosci. 2012. 32: 2002-2012.
- Allen S.J., Dawbarn D.* Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. Clin. Science. 2006. 110: 175-191.
- Allen S.J., Watson J.J., Dawbarn D.* The neurotrophins and their role in Alzheimer's disease. Cur. Neuropharm. 2011. 9: 559-573.

Aloe L., Rocco M.L., Bianchi P., Manni L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *J. Transl. Med.* 2012. 10: 239.

Apfel S.C. Neurotrophic factor therapy - prospects and problems. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2001. 39(4): 351-355.

Asrar S., Zhou Z., Ren W., Jia Z. Ca²⁺ permeable AMPA receptor induced long-term potentiation requires PI3/MAP kinases, but not Ca/CaM-dependent kinase II. *PlosOne.* 2009. 4: e4339.

Backman C., Rose G.M., Hoffer B.J., Henry M.A., Bartus R.T., Friden P., Granholm A.C. Systemic administration of a nerve growth factor conjugate reverses age-related cognitive dysfunction and prevents cholinergic neuron atrophy. *J. Neurosci.* 1996. 16(17): 5437–5442.

Barbi S., Amani M., Mohaddes G., Alihemmati A., Ebrahimi H. Effect of aggregated β -Amyloid (1-42) on synaptic plasticity of hippocampal dentate gyrus granule cells in vivo. *BioImpact.* 2012. 2: 189-194.

Bemelmans A.P., Husson I., Jaquet M., Mallet J., Kosofsky B.E., Gressens P. Lentiviral-mediated gene transfer of brain-derived neurotrophic factor is neuroprotective in a mouse model of neonatal excitotoxic challenge. *J Neurosci Res.* 2006. 83(1):50-60.

Biane J., Conner J.M., Tuszynski M.H. Nerve growth factor is primarily produced by GABAergic neurons of the adult rat cortex. *Front. Cell. Neurosci.* 2014. 8: 220.

Blesch A., Conner J., Pfeifer A., Gasmi M., Ramirez A., Britton W., Alfa R., Verma I., Tuszynski M.H. Regulated lentiviral NGF gene transfer controls rescue of medial septal cholinergic neurons. *Mol. Ther.* 2005. 11(6): 916-925.

Blum R., Konnerth A. Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology.* 2005. 20: 70-78.

Bonini S., Rasi G., Bracci-Laudiero M.L., Procoli A., Aloe L. Nerve growth factor: neurotrophin or cytokine?. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 2003. 131: 80-84.

Bramham C.R., Southard T., Sarvey J.M., Herkenham M., Brady L.S. Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor

mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication. *J Comp. Neurol.* 1996. 368: 371-382.

Bramham C.L., Mesaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Progr. Neurobiol.* 2005. 76: 99-125.

Bruel-Jungerman E., Veyrac A., Dufour F., Horwood J., Laroche S., Davis S. Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *PlosOne.* 2009. 4: e7901.

Bruno M.A., Leon W.C., Fragoso G., Mushynski W.E., Almazan G., Cuellar A.C. Amyloid beta-induced nerve growth factor dysmetabolism in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2009. 68(8): 857-869.

Caccamo A., Maldonado M.A., Bokov A.F., Majumder S., Oddo S. CBP gene transfer increases BDNF levels and ameliorates learning and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. USA.* 2010. 107(52): 22687-22692.

Calissanto P., Matrone C., Amadoro G. Nerve growth factor as a paradigm of neurotrophins related to Alzheimer's disease. *Develop. Neurobiol.* 2010. 70: 372-383.

Capsoni S., Cattaneo A. On the molecular basis linking Nerve Growth Factor (NGF) to Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2006. 26: 619-633.

Castellani R.J., Lee H-G., Zhu X., Perry G., Smith M.A. Alzheimer disease pathology as a host response. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2008. 67(6): 523-531.

Cattaneo A., Capsoni S., Paoletti F. Towards non invasive nerve growth factor therapies for Alzheimer's disease. *J. Alz. Dis.* 2008. 15(2): 255-283.

Chapman P.F., Falinska A.M., Knevett S.G., Ramsay M.F. Genes, models and Alzheimer's disease. *Trends Genet.* 2001. 17: 254-261.

Charles V., Mufson E.J., Friden P.M., Bartus R.T., Kordower J.H. Atrophy of cholinergic basal forebrain neurons following excitotoxic cortical lesions is reversed by intravenous administration of an NGF conjugate. *Brain Res.* 1996. 728(2): 193-203.

Chen K.S., Gage F.H. Somatic gene transfer of NGF to the aged brain: behavioral and morphological amelioration. *J. Neurosci.* 1995. 15(4): 2819-2825.

Chen Q-S., Wei W-Zh., Shimahara T., Xie C-W. Alzheimer amyloid β -peptide inhibits the late phase of long-term potentiation through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2002. 77: 354-371.

Colino A., Malenka R.C. Mechanisms underlying induction of the long-term potentiation in rat medial and lateral perforant paths in vivo. *J. Neurophysiol.* 1993. 69: 1150-1159.

Conner J.M., Franks K.M., Titterness A.K., Russell K., Merrill D.A., Christie B.R., Sejnowski T.J., Tuszynski M.H. NGF is essential for hippocampal plasticity and learning. *J. Neurosci.* 2009. 29(35): 10883-10889.

Cooper J.D., Salehi A., Delacroix J-D., Howe C.L., Belichenko P.V., Chua-Couzen J., Kilbridge J.F., Carlson E.J., Epstein C.J., Mobley W.C. Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. 98: 10439-10444.

Counts S.E., Mufson E.J. The role of Nerve Growth Factor in cholinergic basal forebrain degeneration in prodromal Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005. 64(4): 263-272.

Cuello A.C., Bruno M.A., Allard S., Leon W., Iulita M.F. Cholinergic involvement in Alzheimer's disease. A link with NGF maturation and degradation. *J. Mol. Neurosci.* 2010. 40(1-2): 230-235.

Dewachter I., Reversé D., Caluwaerts N., Ris L., Kuipéri C., van den Haute C., Spittaels K., Umans L., Serneels L., Thiry E., Moechars D., Mercken M., Godaux E., van Leuven F. Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice. *J. Neurosci.* 2002. 22(9): 3445-3453.

English J.D., Sweatt J.D. A requirement for the Mitogen-activated Protein Kinase cascade in hippocampal long-term potentiation. *J. Biol. Chem.* 1997. 272: 19103-19106.

Escobar M.L., Figueroa-Guzman Y., Gomez-Palacio-Schjetnan A. In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res.* 2003. 991: 274-279.

Fa M., Orozco I.J., Francis Y.I., Saeed F., Gong Y., Arancio O. Preparation of oligomeric beta-amyloid 1-42 and induction of synaptic plasticity impairment on hippocampal slices. *JOVE.* 2010. doi: 10.3791/1884.

Fahnenstock M., Michalski B., Xu B., Coughlin M.D. The precursor proNGF is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol. Cell. Neurosci.* 2001. 18: 210-220.

Favata M.F., Horiuchi K.Y., Manos E.J., Daulerio A.J., Stradley D.A., Feeser W.S., Van Dyk D.E., Pitts W.J., Earl R.A., Hobbs F., Copeland R.A., Magolda R.L., Scherle P.A., Trzaskos J.M. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 1998. 273: 18623-18632.

Ferreira D., Westman E., Eyjolfsdottir H., Almqvist P., Lind G., Linderoth B., Seiger A., Blennow K., Karami A., Darreh-Shori T., Wiberg M., Simmons A., Wahlund L.O., Wahlberg L., Eriksson M. Brain changes in Alzheimer's disease patients with implanted encapsulated cells releasing nerve growth factor. *J. Alz. Dis.* 2014. Epub ahead of print.

Figurov A., Pozzo-Miller L., Olafsson P., Wang T., Lu B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature.* 1996. 381: 706-709.

Gault V.A., Holsher C. GLP-1 agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid. *Europ. J. Pharmacol.* 2008. 587: 112-117.

Gelinas J.N., Banko J.L., Peters M.M., Klann E., Weeber E.J., Nguyen P.V. Activation of exchange protein activated by cyclic-AMP enhances long-lasting synaptic potentiation in the hippocampus. *Learn. Mem.* 2008. 15: 403-411.

Giacchino J., Criado J.R., Games D., Henriksen S. In vivo synaptic transmission in young and aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Brain Res.* 2000. 876: 185-190.

Gomez-Palacio-Schjetnan A., Escobar M.L. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Curr. Topics Behav. Neurosci.* 2013. 15: 117-136.

Hock C., Heese K., Muller-Spahn F., Huber P., Riesen W., Nitsch R.M., Otten U. Increased CSF levels of nerve growth factor in patients with Alzheimer's disease. *Neurology.* 2000. 54(10): 2009-2011.

Huang E.J., Reichardt L.F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001. 24: 677-736.

Huber K.M., Sawtell N.B., Bear M.F. Brain-derived neurotrophic factor alters the synaptic modification threshold in visual cortex. *Neuropharmacol.* 1998. 37: 571-579.

Husson I., Rangan C.M., Lelièvre V., Bemelmans A.P., Sachs P., Mallet J., Kosofsky B.E., Gressens P. BDNF-induced white matter neuroprotection and stage-dependent neuronal survival following a neonatal excitotoxic challenge. *Cereb. Cortex.* 2005. 15(3):250-61.

Impey S., Obrietan K., Wong S.T., Poser S., Yano S., Wayman G., Deloulme J.C., Chan G., Storm D.R. Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK-nuclear translocation. *Neuron.* 1998. 21: 869-883.

Jerónimo-Santos A., Vaz S.H., Parreira S., Rapaz-Lérias S., Caetano A.P., Buée-Scherrer V., Castrén E., Valente C.A., Blum D., Sebastião A.M., Diógenes M.J. Dysregulation of TrkB receptors and BDNF function by amyloid- β peptide is mediated by calpain. *Cereb. Cortex.* 2014. 23: Epub ahead of print.

Jiang B., Akaneya Y., Ohshima M., Ichisaka S., Hata Y., Tsumoto T. Brain-derived neurotrophic factor induces long-lasting potentiation of synaptic transmission in visual cortex *in vivo* in young rats, but not in the adult. *Eur. J Neurosci.* 2001. 14: 1219-1228.

Jin S-X., Arai J., Tian X., Kumar-Singh R., Feig L.A. Acquisition of contextual discrimination involves the appearance of a RAS-GRF1/p38 MAP kinase-mediated signaling pathway that promotes LTP. *J. Biol. Chem.* 2013. 288: 21703-21713.

Kang H., Schuman E.M. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science.* 1995. 267: 1658-1662.

Kang H.J., Jia L.Z., Suh K.-Y., Tang L., Schuman E.M. Determinants of BDNF-induced hippocampal synaptic plasticity: role of the Trk B receptor and the kinetics of neurotrophin delivery. *Learn. Mem.* 1996. 3: 188-196.

Kang H., Welcher A.A., Shelton D., Schuman E.M. Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation. *Neuron.* 1997. 19: 653-664.

Kanhema T., Havik B., Dagestad G., Ying S.W., Nairn A.C., Sonenberg N., Bramham C.R. BDNF, translation control, and dendritic protein synthesis in adult synaptic plasticity. *Soc. Neurosci. Abstr.* 2003. 163(8).

Kemp S.W.P., Webb A.A., Dhaliwal S., Syed S., Walsh S.K., Midha R. Dose and duration of nerve growth factor (NGF) administration determine the extent of behavioral recovery following peripheral nerve injury in rats. *Exp. Neurol.* 2011. 229: 460-470.

Kim M.S., Shutov L.P., Gnanasekaran A., Lin Z., Rysted J.E., Ulrich J.D., Usachev Y.M. Nerve growth factor (NGF) regulates activity of the transcription factor NFAT in neurons via the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-Akt-glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) pathway. *J. Biol. Chem.* 2014. Epub ahead of print.

Kimura R., MacTarvish D., Yang J., Westaway D., Jhalmandas J.H. Beta amyloid-induced depression of hippocampal long-term potentiation is mediated through the amylin receptor. *J. Neurosci.* 2012. 32: 17401-17406.

Koliatsos V.E., Nauta H.J., Clatterbuck R.E., Holtzman D.M., Mobley W.C., Price D.L. Mouse nerve growth factor prevents degeneration of axotomized basal forebrain cholinergic neurons in the monkey. *J. Neurosci.* 1990. 10(12): 3801-3813.

Korte M., Griesbeck O., Gravel C., Carroll P., Staiger V., Thoenen H., Bonhoeffer T. Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. 93: 12547-12552.

Kossel A.H., Cambridge S.B., Wagner U., Bonhoeffer T. A caged Ab reveals an immediate/instructive effect of BDNF during hippocampal synaptic potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. 98: 14702-14707.

Kovalchuk Y., Hanse E., Kafitz K.W., Konnerth A. Postsynaptic induction of BDNF-mediated long-term potentiation. *Science.* 2002. 295: 1729-1734.

Lazo O.M., Mauna J.C., Pissani C.A., Inestrosa N.C., Bronfman F.C. Axotomy-induced neurotrophic withdrawal causes the loss of phenotypic differentiation and downregulation of NGF signaling, but not death of septal cholinergic neurons. *Mol. Neurodegener.* 2010. 5(5): 1-12.

Lee R., Kermani P., Teng K.K., Hempstead B.L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* 2001. 294: 1945-1948.

Lessmann V., Gottmann K., Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 2003. 69: 341-374.

Levi-Montalcini R. The saga of the nerve growth factor. *Neuroreport.* 1998. 9(16): 71-83.

Lou H., Kim S.K., Zaitsev E., Snaell C.R., Lu B., Loh Y.P. Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase E. *Neuron.* 2005. 45: 245-255.

Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn. Mem.* 2003. 10: 86-98.

Lu B., Pang P.T., Woo N.H. The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Rev. Neurosci.* 2005. 6: 603-614.

Lu Y., Christian K., Lu B. BDNF: a key regulator for protein-synthesis dependent LTP and long-term memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2008. 89(3): 312-323.

Lu Y., Ji Y., Ganesan S., Schloesser R., Martinowich K., Sun M., Mei F., Chao M.V., Lu B. TrkB as a potential synaptic and behavioral tag. *J Neurosci.* 2011. 31(33): 11762-11771.

Mandel R.J., Gage F.H., Clevenger D.G., Spratt S.K., Snyder R.O., Leff S.E. Nerve growth factor expressed in the medial septum following in vivo gene delivery using a recombinant adeno-associated viral vector protects cholinergic neurons from fimbria-fornix lesion-induced degeneration. *Exp. Neurol.* 1999. 155(1): 59-64.

Mans R.A., Chowdhury N., Cao D., McMahon L.L., Li L. Simvastatin enhances hippocampal long-term potentiation in C57BL/6 mice. *Neurosci.* 2010. 166: 435-444.

Matrone C., Barbagallo A.P.M., La Rosa L.R., Florenzano F., Ciotti M.T., Mercanti D., Chao M.V., Calissano P., D'Adamio L. APP is phosphorylated by TrkA and regulates NGF/TrkA signaling. *J. Neurosci.* 2011. 31: 11756-11761.

Matsumoto T., Numakawa T., Adachi N., Yokomaku D., Yamagishi S., Takei N., Hatanaka H. Brain-derived neurotrophic factor enhances depolarization-evoked glutamate release in cultured cortical neurons. *J. Neurochem.* 2001. 79(3): 522-530.

Messaoudi E., Ying S.W., Kanhema T., Croll S.D., Bramham C.R. BDNF triggers transcription-dependent, late phase LTP in vivo. *J. Neurosci.* 2002. 22: 7453-7461.

Minichiello L., Calella A.M., Medina D.L., Bonhoeffer T., Klein R., Korte M. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron.* 2002. 36(1): 121-137.

Mocchetti I., Brown M. Targeting neurotrophin receptors in the central nervous system. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2008. 7: 71-82.

Monteggia L.M., Barrot M., Powell C.M., Berton O., Galanis V., Gemelli T., Meuth S., Nagy A., Greene R.W., Nestler E.J. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2004. 101: 10827-10832.

Mowla S.J., Pareek S., Farhadi H.F., Petrecca K., Fawcett J.P., Seidah N.G., Morris S.J., Sossin W.S., Murphy R.A. Differential sorting of Nerve Growth Factor and Brain-derived Neurotrophic Factor in the hippocampus. *J. Neurosci.* 1999. 19(6): 2069-2080.

Nagahara A.H., Tuszynski M.H. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nature Rev. Drug Discovery.* 2011. 10: 209-219.

Namiki J., Kojima A., Tator C.H. Effect of brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 on functional recovery and regeneration after spinal cord injury in adult rats. *J. Neurotrauma.* 2000. 17(12):1219-31.

Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Tsybko A.S., Tikhonova M.A., Kulikov A.V., Popova N.K. Effect of Brain-derived Neurotrophic Factor on behavior and key members of the brain serotonin system in genetically predisposed to behavioral disorders mouse strains. *Neurosci.* 2012. 214: 59-67.

Nguyen N., Lee S.B., Lee Y.S., Lee K-H., Ahn J-Y. Neuroprotection by NGF and BDNF against neurotoxin-exerted apoptotic death in neural stem cells are mediated through Trk receptors, activating PI3-Kinase and MAPK pathways. *Neurochem. Res.* 2009. 34: 942-951.

Otten U., Scully J.L., Ehrhard P.B., Gadiant R.A. Neurotrophins: signals between the nervous and immune systems. *Prog. Brain Res.* 1994. 103: 293-305.

Ouyang Y., Rosenstein A., Kreiman G., Schuman E.M., Kennedy M.B. Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 1999. 19: 7823-7833.

Park H., Poo M.M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature Rev. Neurosci.* 2013. 14: 7-23.

Patterson J.C., Childs G.V. Nerve growth factor in the anterior pituitary: regulation of secretion. *Endocrinology.* 1994. 135(4): 1697-1704.

Patterson S.L., Abel T., Deuel T.A., Martin K.C., Rose J.C., Kandel E.R. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*. 1996. 16(6): 1137-1145.

Patterson S.L., Pittenger C., Morozov A., Martin K.C., Scanlin H., Drake C., Kandel E.R. Some forms of cAMP-mediated longlasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron*. 2001. 32: 123-140.

Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Elsevier: Academic Press, 2005. ISBN: 0-12-088472-0.

Peineau S., Taghibiglou C., Bradley C., Wong T.P., Liu L., Lu J., Lo E., Wu D., Saule E., Bouschet T., Matthews P., Isaac J.T.R., Bortolotto Z.A., Wang Y.T., Collingridge G.L. LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3 β . *Neuron*. 2007. 53: 703-717.

Peng S., Wu J., Mufson E.J., Fahnstock M. Increased proNGF levels in subjects with Mild Cognitive Impairment and Mild Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004. 63(6): 641-649.

Pezet S., Marchand F., Thibault K., Dauvergne C., Grist J., Smith G.M., McMahon S.B., Calvino B. Role of NGF in neuronal plasticity in the lateral reticular nucleus in chronic inflammatory pain. *The Open Pain J.* 2009. 2: 41-52.

Pozzo-Miller L.D., Gottschalk W., Zhang L., McDermott K., Du J., Gopalakrishnan R., Oho C., Sheng Z.H., Lu B. Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J. Neurosci.* 1999. 19: 4972-4983.

Ramirez J.J., Caldwell J.L., Majure M., Wessner D.R., Klein R.L., Meyer E.M., King M.A. Adeno-associated virus vector expressing nerve growth factor enhances cholinergic axonal sprouting after cortical injury in rats. *J Neurosci.* 2003. 23(7): 2797-2803.

Reichardt L.F. Neurotrophin-regulated signaling pathways. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2006. 361: 1545-1564.

Rinaldo L., Hansel C. Muscarinic acetylcholine receptor activation blocks long-term potentiation at cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses via cannabinoid signalling. *Proc. Natl. Acad. USA.* 2013. 110: 1118-11186.

Rosenberg M.B., Friedmann T., Robertson R.C., Tuszyński M., Wolff J.A., Breakefield X.O., Gage F.H. Grafting genetically modified cells to the damaged brain: restorative effects of NGF expression. *Science.* 1988. 242(4885): 1575-1578.

Rowan M.J., Klyubin I., Cullen W.K., Anwyl R. Synaptic plasticity in animal models of early Alzheimer's disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2003. 358(1432): 821-828.

Ruberti F., Capsoni S., Comparini A., Di Daniel E., Franzot J., Gonfloni S., Rossi G., Berardi N., Cattaneo A. Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy. *J. Neurosci.* 2000. 20(7): 2589-2601.

Salehi A., Delacroix J.D., Mobley W.C. Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 2003. 26(2): 73-80.

Sarihi A., Komaki A., Tsumoto T. Calcium signaling pathways involved in long-term potentiation at excitatory synapses on parvalbumin positive fast-spiking GABAergic neurons in the mouse visual cortex. *Yakhtex Med. J.* 2009. 11: 285-292.

Schäbitz W.R., Sommer C., Zoder W., Kiessling M., Schwaninger M., Schwab S. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2000. 31(9):2212-7.

Schafe G.E., Swank M.W., Rodrigues S.M., Debiec J., Doyere V. Phosphorylation of ERK/MAP kinase is required for long-term potentiation in anatomically restricted regions of the lateral amygdale *in vivo*. *Learn. Mem.* 2008. 15: 55-62.

Schaub R.T., Anders D., Golz G., Gohringer K., Hellweg R. Serum nerve growth factor concentration and its role in the preclinical stage of dementia. *Am. J. Psychiatry.* 2002. 159(7): 1227-1229.

Schinder A.F., Poo M.M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 2000. 23: 639-645.

Schindowski K., Belarbi K., Buee L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes, Brain and Behavior.* 2008. 7(1): 43-56.

Scott S.A., Crutcher K.A. Nerve growth factor and Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* 1994. 5(3): 179-211.

Segal R.A. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu. Rev. Neurosci.* 2003. 26: 299-330.

Skaper S.D. Nerve growth factor: a neurokine orchestrating neuroimmune-endocrine functions. *Mol. Neurobiol.* 2001. 24: 183-199.

Skaper S.D. The biology of neurotrophins, signaling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2008. 7: 46-62.

Snider W.D. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell.* 1994. 77(5): 627-638.

Sobreviela T., Clary D.O., Reichardt L.F., Brandabur M.M., Kordower J.H., Mufson E.J. TrkA-immunoreactive profiles in the central nervous system: colocalization with neurons containing p75 nerve growth factor receptor, choline acetyltransferase, and serotonin. *J. Comp. Neurol.* 1994. 350(4): 587-611.

Solntseva E.I., Kapai N.A., Popova O.V., Rogozin P.D., Skrebitsky V.G. The involvement of sigma1 receptors in donepezil-induced rescue of hippocampal LTP impaired by beta-amyloid peptide. *Brain Res. Bull.* 2014. 106: 56-61.

Steward O., Huang F., Guzowski J.F. A form of perforant path LTP can occur without ERK1/2 phosphorylation or immediate early gene induction. *Learn. Mem.* 2007. 14: 433-445.

Tartaglia N., Du J., Tyler W.J., Neale E., Pozzo-Miller L., Lu B. Protein synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* 2001. 276: 37585-37593.

Terry A.V., Kutiyawalla A., Pillai A. Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats. *Physiology & Behavior.* 2011. 102: 149-157.

Thal L.J. Neurotrophic factors. *Progr. Brain Res.* 1996. 106: 327-330.

Tomas K., Davis A. Neurotrophins: a ticket to ride for BDNF. *Curr. Biology.* 2005. 15(7): R262-264.

Tian L., Guo R., Yue X., Lu Q., Ye X., Wang Zh., Chen Zh., Wu B., Xu G., Liu X. Intranasal administration of nerve growth factor ameliorates β -amyloid deposition after traumatic brain injury in rats. *Brain Res.* 2012. 1440: 47-55.

Tuszynski M.H., Thal L., Pay M., Salmon D.P., U H.S., Bakay R., Patel P., Blesh A., Vahlsing H.L., Ho G., Tong G., Potkin S.G., Fallon J., Hansen L., Mufson E.J., Kordower J.H., Gall C., Conner J. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nature Medicine.* 2005. 11: 551-555.

Tuszynski M.H. Nerve growth factor gene therapy in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 2007. 21(2): 179-189.

Ubhi K., Rockenstein E., Vazquez-Roque R., Mante M., Inglis C., Patrick C., Adame A., Fahnestock M., Doppler E., Novak P., Moessler H., Masliah E. Cerebrolisin modulates pronerve growth factor/nerve growth factor ratio and ameliorates the cholinergic deficit in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci. Res.* 2013. 91: 167-177.

Vaillant A.R., Mazzoni I., Tudan C., Boudreau M., Kaplan D.R., Miller F.D. Depolarisation and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol-3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuron survival. *J. Cell. Biology.* 1999. 146(5): 955-966.

Vlahos C.J., Matter W.F., Hui KY., Brown R.F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 1994. 269: 5241-5248.

Volosin M., Song W., Almeida R.D., Kaplan D.R., Hempstead B.L., Friedman W.J. Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J. Neurosci.* 2006. 26(29): 7756-7766.

Wang H.W., Pasternak J.F., Kuo H., Ristic H., Lambert M.P., Chromy B., Viola K.L., Klein W.L., Stine W.B., Krafft G.A., Trommer B.L. Soluble oligomers of beta amyloid (1–42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res.* 2002. 924: 133-140.

Wang H., Wang R., Thrimawithana T., Little P.J., Xu J., Feng Z.P., Zheng W. The nerve growth factor signaling and its potential as therapeutic target for glaucoma. *Biomed. Res. Int.* 2014. 2014: 759473.

Wiesmann C., de Vos A.M. Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol. Life Sci.* 2001. 58(5-6): 748-759.

Williams L.R., Varon S., Peterson G.M., Wictorin K., Fischer W., Bjorklund A., Gage F.H. Continuous infusion of nerve growth factor prevents basal forebrain neuronal death after fimbria fornix transaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. 83(23): 9231-9235.

Xu B., Gottschalk W., Chow A., Wilson R.I., Schnell E., Zang K., Wang D., Nicoll R.A., Lu B., Reichardt L.F. The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. *J. Neurosci.* 2000. 20: 6888-6897.

Ying S.W., Futter M., Rosenblum K., Webber M.J., Hunt S.P., Bliss T.V., Bramham C.R. Brain-derived neurotrophic factor induces longterm potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J. Neurosci.* 2002. 22: 1532-1540.

Zhang Y.H., Kays J., Hodgdon K.E., Sacktor T.C., Nikol G.D. Nerve growth factor enhances the excitability of rat sensory neurons through activation of the atypical protein kinase C isoform, PKM ζ . *J. Neurophysiol.* 2012. 107: 315-335.