

На правах рукописи

Моргун Андрей Васильевич

**ПЕРИНАТАЛЬНОЕ ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКОЕ
ПОВРЕЖДЕНИЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА:
КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И МАРКЕРЫ
ДИСФУНКЦИИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.03.03 - Патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Томск – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Салмина Алла Борисовна
Таранушенко Татьяна Евгеньевна

Официальные оппоненты:

Желев Виктор Александрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной педиатрии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Томск)

Пономарева Наталия Васильевна – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией возрастной физиологии мозга и нейрокибернетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Москва)

Григорьев Евгений Валерьевич – профессор РАН, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории критических состояний отдела мультифокального атеросклероза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (Кемерово)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Нижний Новгород)

Защита диссертации состоится «__» ____ 201_ года на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://ssmu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 201_ года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Патология центральной нервной системы (ЦНС) занимает отдельное место в перинатальной заболеваемости и оказывает существенное влияние на здоровье будущих поколений. Согласно литературе, в мировой практике гипоксически-ишемическая энцефалопатия в период новорожденности выставляется, как диагноз в 1,8 – 25 на 1000 новорожденных. Актуальность и медико-социальная значимость перинатального поражения в педиатрической практике обусловлены целым рядом обстоятельств: высокая заболеваемость, нечеткость критериев дифференцировки физиологических процессов адаптации и патологии, сложность однозначной оценки выраженности клинических симптомов, наличие пограничных состояний, высокий риск летальных исходов (Янушанец Н.Ю., 2006; Власюк В.В., 2009; Volpe J.J., 2009; Капранова Е.И. и др., 2012).

В практической медицине существует серьезная проблема недостаточного понимания фундаментальных патологических процессов, происходящих при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении (ГИП) головного мозга (ГМ). Механизмы, по которым развивается ГИП, реализуются в результате сложного каскада патофизиологических процессов, конечным исходом которых является гибель клеток (Салмина А.Б. и др., 2006; Салмина А.Б. и др. 2010). В последние годы внимание исследователей привлекает регуляция деятельности нейроваскулярной единицы (НВЕ) как функционального комплекса клеток, обеспечивающего работу гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и скоординированную активность нейронов, глии и эндотелия церебральных сосудов. Формирование НВЕ продолжается после рождения – развиваются межклеточные коммуникации и метаболическое сопряжение клеток ЦНС. Нарушение межклеточных взаимодействий в пределах НВЕ, приводящие к изменению проницаемости ГЭБ и формированию отека ГМ, играют ключевую роль в развитии патологических изменений, которые наблюдаются при перинатальном ГИП ГМ. Понимание молекулярных особенностей патогенеза ГИП ЦНС открывает возможность разработки и использования стратегии нейропротекции. Основой такой стратегии является направленная модуляция механизмов, участвующих в межклеточной коммуникации и метаболическом сопряжении клеток ЦНС (Салмина А.Б. и др., 2010; Chaitanya G.V. et al., 2010).

В практической педиатрии актуальными остаются вопросы, связанные с идентификацией молекул-маркеров повреждения НВЕ, механизмов патологической проницаемости ГЭБ, разработкой и внедрением новых алгоритмов, протоколов и стандартов ведения пациентов с перинатальным ГИП ГМ.

Степень разработанности темы. В формировании функциональной активности гематоэнцефалического барьера важная роль принадлежит особенностям межклеточных взаимодействий в пределах ГЭБ. Нейроны и глиальные клетки индуцируют экспрессию ГЭБ-связанных белков в

эндотелиоцитах головного мозга (Kerr A.L., 2010; Stolp H.B., 2011). При этом долгое время считалось, что дисбаланс экспрессии белков плотных контактов приводит к нарушению формирования межэндотелиальных плотных контактов, что и является причиной патологической проницаемости, отека и поражения ЦНС (Mark K.S., 2002; Abbott N.J., 2006; Koto T., 2007). В настоящее время имеются сведения, что дисбаланс экспрессии белков плотных контактов характеризует активацию пролиферации эндотелиоцитов и ангиогенеза (L. Li, 2010; Economidou M., 2015, Malinovskaya N.A., 2016).

Доказано, при гипоксии-ишемии происходит накопление лактата в ткани мозга, что и приводит к повреждению клеток головного мозга (Cady E.V., 1987; Roth S.C., 1992; Pena J.P., 2007; Rocha-Ferreira E., 2016). В то же время известно, что в раннем перинатальном периоде нейроны способны использовать лактат и, отчасти, кетоновые тела в качестве дополнительного энергетического субстрата, утилизация глюкозы, в целом, снижена за счет низкой активности или экспрессии транспортеров глюкозы (Bergersen L.H., 2007; Proia P., 2016), а изменение экспрессии монокарбоксилатных транспортеров клетками ГЭБ/НВЕ обеспечивает возможность транспорта лактата через ГЭБ в прямом и обратном направлении (Barros L.F., 2013; Millet G., 2014 Freese, J., 2017; Riske L., 2017; Wolahan S.M., 2018). Таким образом, роль лактата не столь однозначна, как считалось ранее.

Еще одним важным вопросом является факт того, что астроциты являются клетками, которые более устойчивы к развитию гипоксии по сравнению с нейронами. Но повреждение астроцитов наблюдается в самом начале ишемического воздействия и при этом они, достаточно долго, находятся в компенсированном состоянии и обеспечивают жизнедеятельность нейронов (Hayakawa K., 2016; Leaw B., 2017; Okoreeh A., 2017). Как и в каких случаях, одни и те же процессы оказывают патологическое или компенсаторное влияние?

Ответ может быть связан с ролью молекул, которые регулируют межклеточные взаимодействия и обеспечивают метаболическое сопряжение клеток в пределах ГЭБ: коннексины, белок лекарственной устойчивости, монокарбоксилатные транспортеры, транспортеры глутамина, глутамата, а также сопряженные с ними молекулы (Ezan P., 2012; Ashrafi G., 2017).

С клинической точки зрения, нарушения, которые развиваются в пределах НВЕ при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении головного мозга, являются ключевыми в развитии патологических изменений и клинических проявлений (первичное изменение проницаемости ГЭБ, формирование отека ткани головного мозга). При этом диагностическая и прогностическая информативность регистрации в крови и ликворе белков-маркеров повреждения и метаболитов клеток НВЕ изучена недостаточно (Пальчик А.Б., 2013; Блинов Д.В. 2014; Glushakova O.Y., 2016).

Цель исследования: Исследовать с использованием современных экспериментальных подходов новые механизмы aberrантных межклеточных взаимодействий, лежащих в основе нарушения структурно-функциональной

целостности гематоэнцефалического барьера при перинатальном гипоксически-ишемическом повреждении головного мозга; оценить клиническую информативность регистрации характера повреждения нейроваскулярной единицы головного мозга для прогнозирования исходов церебральной ишемии новорожденных.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности экспрессии в клетках нейроваскулярной единицы молекул, регулирующих некоторые межклеточные взаимодействия (CD38, Cx43, Pgp, SLC), экспрессии транспортеров глюкозы (GLUT4) и лактата (MCT1, MCT4) в динамике постнатального развития экспериментальных животных в норме и после перенесенного перинатального гипоксически-ишемического повреждения головного мозга *in vivo*.
2. Выявить особенности развития неврологического дефицита у экспериментальных животных с патологической проницаемостью гематоэнцефалического барьера вследствие перенесенного перинатального гипоксически-ишемического повреждения головного мозга *in vivo*.
3. Разработать новые модели нейроваскулярной единицы головного мозга, гематоэнцефалического барьера *in vitro* и применить их для оценки межклеточных взаимодействий в норме и после перенесенного перинатального гипоксически-ишемического повреждения головного мозга в эксперименте.
4. Изучить механизмы функционального сопряжения клеток нейроваскулярной единицы головного мозга, опосредованные коннексином-43, в норме и после перенесенного перинатального гипоксически-ишемического повреждения головного мозга *in vitro*.
5. Оценить вклад ante- и интранатальных особенностей анамнеза ребенка в развитие гипоксического поражения мозга при церебральной ишемии различной степени тяжести, для установления наиболее значимых и управляемых причин развития данной патологии, а также сопоставить ведущие клинические симптомокомплексы с исследуемыми лабораторными показателями и нейросонографическими изменениями.
6. Оценить информативность маркеров повреждения НВЕ: нейронспецифической енолазы (NSE), глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP), sPECAM-1 в периферической крови, а также сопоставить наиболее существенные нейросонографические признаки поражения ЦНС для оценки выраженности клеточных повреждений при разной степени тяжести гипоксически-ишемического поражения ЦНС и рассмотреть взаимосвязь клиничко-анамнестических, параклинических и биохимических показателей для уточнения наиболее вероятных механизмов развития изучаемой патологии и прогнозирования исходов заболевания.
7. Дополнить существующую концепцию патогенеза гипоксического повреждения развивающегося мозга новыми данными о молекулярных

механизмах аберрантного барьерогенеза и нарушения структурно-функциональной целостности гематоэнцефалического барьера.

Научная новизна. Разработан новый протокол получения клеток, а также формирования модели нейроваскулярной единицы/гематоэнцефалического барьера *in vitro*, основанных на применении прогениторных клеток головного мозга.

Впервые экспериментально доказано участие CD38, Sx43, Pgp, транспортеров глутамата, глюкозы и лактата в повреждении и дизрегуляции нейрон-астроглиального метаболического сопряжения при перинатальном поражении головного мозга, а также выявлены новые молекулярные механизмы межклеточных взаимодействий и нарушений белков плотных контактов, актуальных для развития ишемического повреждения развивающегося мозга.

Установлены закономерности повреждений развивающегося головного мозга, обусловленные нарушениями нейрон-астроглиальных взаимодействий и развитием эндотелиальной дисфункции, что открывает перспективы создания новых эффективных фармакотерапевтических технологий нейропротекции и нейрорегенерации.

Получены новые данные об особенностях изменения уровней глутамата и маркеров повреждения клеток нейрональной, астроглиальной, эндотелиальной природы, а также эффективности нейрон-астроглиального метаболического сопряжения в периферической крови детей, перенесших перинатальное повреждение головного мозга, во взаимосвязи с клиническими проявлениями неврологической дисфункции.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработанные модели нейроваскулярной единицы/гематоэнцефалического барьера *in vitro* предложены к использованию для решения фундаментальных и прикладных задач нейрофармакологии, неврологии, патологической физиологии, молекулярной и трансляционной медицины.

Закономерности изменений молекул-мишеней повреждения нейроваскулярной единицы головного мозга могут быть основой для направленной разработки новых лекарственных средств с нейротропной активностью.

Определение концентраций NSE, GFAP, sPECAM-1 и глутамата в периферической крови детей, перенесших перинатальное повреждение головного мозга, рекомендуется использовать в качестве диагностических биомаркеров при определении степени тяжести повреждения ЦНС и эффективности проводимой терапии.

Данные о молекулах-маркерах повреждения клеток нейроваскулярной единицы могут быть использованы для разработки новых диагностических протоколов в неонатологии и оптимизации существующих протоколов нейропротекции в педиатрической практике.

Методология и методы исследования. Используются современные высокоинформативные методы исследования, включающие:

1. Моделирование перинатального гипоксически-ишемического поражения *in vivo* и гипоксического поражения *in vitro*.

2. Оценка нейроповеденческих функций животных: (неврологического статуса животных по шкале NSS; двигательной активности тестом «Открытое поле»; когнитивной функции тестом «Водный лабиринт Морриса»; тревожности и эмоциональности тестом «Приподнятый крестообразный лабиринт»).

3. Иммуногистохимическая регистрация целевых молекул.

4. Микроскопические методы исследования – световая, флуоресцентная, конфокальная микроскопия срезов и культур клеток.

5. Культуральные методы - сокультивирование клеток и формирование модели ГЭБ/НВЕ *in vitro*.

6. Клинические методы обследования – анализ медицинской документации с оценкой анамнеза, оценка неврологического статуса пациентов.

7. Инструментальные и лабораторные методы исследования – нейросонографическое исследование, ИФА (определение в сыворотке концентрации белков NSE, GFAP, sPECAM-1), спектрофотометрическое определение глутамата, лактата.

8. Математико-статистическая обработка результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Повреждение клеток нейроваскулярной единицы при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении головного мозга сопровождается изменением экспрессии молекул транспортных систем и молекул, участвующих в реализации механизмов нейрон-астроглиального метаболического сопряжения.

2. Применение оригинальной модели нейроваскулярной единицы *in vitro* позволяет оценить характер повреждения механизмов межклеточной коммуникации и определить молекулы-маркеры патологических процессов, а также молекулы-мишени для фармакотерапевтического воздействия.

3. Коннексин-43 в клетках нейроваскулярной единицы головного мозга может рассматриваться как потенциальная молекула-мишень для фармакотерапии перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС.

4. Изменения уровней белков, маркирующих повреждение клеток нейроваскулярной единицы, в периферической крови детей, перенесших перинатальное ишемическое повреждение головного мозга, соответствуют степени тяжести повреждений, особенностям клинической картины и патологических изменений структур и ликворопроводящих путей головного мозга и могут быть использованы в оценке степени тяжести церебральной ишемии.

5. Ведущими неврологическими проявлениями перенесенной церебральной ишемии в острый период следует считать нарушения сознания, мышечного тонуса, судорожный синдром, симптомы угнетения, а также нарушения ликвородинамики, сопровождающие нарушения структурно-функциональной целостности гематоэнцефалического барьера.

Внедрение в практику: результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, внедрены в учебный процесс кафедры педиатрии института последипломного образования КрасГМУ, учебный процесс кафедры биохимии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии (курс «Нейробиология развития» для последипломного образования (аспиранты), научный процесс НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, в отделении реанимации и интенсивной терапии и отделении патологии новорожденных и недоношенных детей ККК ГБУЗ «Красноярский краевой клинический центр охраны материнства и детства» (внесены предложения по дополнительным критериям диагностики церебральной ишемии у новорожденных детей с использованием динамического определения-концентрации нейроспецифических белков в сыворотке крови, изданы методические рекомендации: «Особенности анемического синдрома у новорожденных с церебральной ишемией»).

Степень достоверности и апробация результатов исследования:

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением работы на достаточном экспериментальном и клиническом материале (120 экспериментальных животных, моделирование гипоксически-ишемического повреждения ЦНС *in vivo* и гипоксического воздействия *in vitro*, 120 обследованных пациентов) с использованием современных и высокотехнологичных молекулярно-биологических методов исследований и высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Основные положения работы были представлены на I международной 3D онлайн-конференции «Фундаментальная медицина: от скальпеля - к геному, протеому и липидому» (Казань, 2011), Школе молодых ученых «Экспериментальные модели заболеваний центральной нервной системы» в рамках выездного Пленума проблемной комиссии «Фундаментальные вопросы нейронаук» Научного Совета РФ по неврологии (Красноярск, 2011), III Съезде физиологов СНГ (Украина, Ялта, 2011), XV Конгрессе педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии» (Москва, 2011), международном конгрессе «BITs 2nd Annual World Congress of NeuroTalk» (Dalian, China, 2011), X Всероссийской научно-технической конференции «Приоритетные направления развития науки и технологий» (Тула, 2011), X Российском конгрессе «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» и II Конгрессе детских врачей союзного государства (Москва, 2011), VII Сибирском съезде физиологов (Красноярск, 2012), ежегодных российско-японских семинарах «Интегративные нейронауки» (Красноярск, 2010-2012), XXII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Волгоград, 2013), Российско-Германской конференции «Фундаментальные и клинические проблемы артериальной гипертензии и нейродегенеративных заболеваний» (Красноярск, 2014), международном конгрессе International Congress on Neuroscience (Красноярск, 2014), научно-практической конференции «Актуальные вопросы педиатрии» (Красноярск, 2015), VII Межрегиональной

научно-практической конференции «Химическая наука и образование Красноярья» (Красноярск, 2015), IX научно-практической конференции по доклиническим и клиническим исследованиям (Москва, 2016), научно-практических семинарах НИИ молекулярной медицины и патобиохимии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (2012-2018 гг.), симпозиуме международных научных конференций «Saratov Fall Meeting 2017» (Саратов, 2017), научно-практической конференции «Актуальные вопросы педиатрии» (Красноярск, 2017), научно-образовательной конференции «Избранные вопросы детской неврологии: что должен знать педиатр» (Красноярск, 2018).

Публикации: по теме диссертации опубликовано 57 печатных работ: в том числе 26 статей - в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 4 – в зарубежных изданиях, опубликована 1 монография и 1 глава в монографии, 2 методические рекомендации.

Диссертационное исследование выполнено в соответствии с планом научно-исследовательских работ Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках комплексной темы «Научные модели и современные технологии в педиатрии (номер государственной регистрации № 01200906999).

Отдельные фрагменты работы выполнены при поддержке грантов ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (соглашение № 8061, 2012-2013 гг.), Президента РФ для поддержки научных исследований молодых кандидатов наук (МК-4818.2012.7 и МК-6907.2012.7), Российского фонда фундаментальных исследований (13-04-98091 p_сибирь_a), Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (9398p/15184), Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности (Дополнительное соглашение № 1/12 от 04 июля 2012 г. к Соглашению № 11 от 12 августа 2009 г), Российского Научного Фонда (проект № 14-25-00054), Российского фонда фундаментальных исследований (17-02-00358), государственного задания Министерства образования и науки РФ (№12.1223.2017/АР).

Фрагменты исследования вошли в работу «Молекулярные механизмы межклеточной коммуникации и сигнальной трансдукции в клетках головного мозга: новые молекулярные маркеры и мишени для трансляционных исследований», награжденную премией Правительства РФ в области науки и техники для молодых ученых за 2010 год (автор – член коллектива лауреатов Премии).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 326 страницах машинописного текста, состоит из введения, иллюстрирована таблицами и рисунками и состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, содержащего 565 источников (83 отечественных и 482 иностранных). Иллюстрирована 48 таблицами и 27 рисунками. Ссылки и список литературы оформлены с использованием

программы для работы с библиографией «Zotero» и автоматическим подключением ГОСТ 7.0.5.-2008 (numeric, sorted alphabetically, Russian; <https://www.zotero.org/>).

Личный вклад автора. Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе Моргуна А.В., получены самостоятельно. Диссертантом выполнено лично: определение цели, разработка конкретных задач работы и плана их выполнения; составление протоколов лабораторного и клинического исследований; набор клинического материала – динамическое клиническое обследование пациентов (в том числе совместно с к.м.н. Л.Н. Карповой, зав. отделением патологии новорожденных и недоношенных детей перинатального центра Красноярского краевого клинического центра охраны материнства и детства, к.м.н И.М. Демьяновой); тестирование животных; проведение иммуногистохимических исследований (в том числе совместно с д.м.н. Н.А. Малиновской); разработка и создание модели нейроваскулярной единицы *in vitro* (в том числе совместно с к.фарм. н. Н.В. Писаревой, н.с. Е.Д. Осиповой); статистическая обработка материала исследований и интерпретация результатов; написание публикаций, автореферата и текста диссертации.

СОДЕРЖАНИЕ И ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Объект и методы экспериментальной части исследования

Экспериментальная часть исследования осуществлялась с использованием моделей *in vivo* и *in vitro*. Объект исследования *in vivo* - белые беспородные крысы (n=120) обоего пола, средней массой 10-18 г. Эксперименты на животных одобрены биоэтической комиссией Локального этического комитета КрасГМУ и проводились согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977г. №755), приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». В опытной группе (n=80) были крысы с моделью перинатального гипоксически-ишемического поражения головного мозга. Головной мозг животных извлекался через 4, 8, 72 часа, 10 суток и 3 недели после моделирования перинатального ГИП - было сформировано 5 опытных подгрупп (n=16 в каждой подгруппе): P7, P7, P10, P17, P28 соответственно (P - день постнатального развития). Контрольная группа (n=40) - животные, которым провели ложную операцию. Подгруппы (n=8) соответствовали контролю - P7, P7, P10, P17, P28. Дизайн экспериментальной части исследования представлен на рисунке 1.

Моделирование гипоксически-ишемического поражения головного мозга *in vivo* осуществлялось по методике J.Rice (Rice J. et al., 1981). Через 4, 8, 72 часа, 10 суток и 3 недели после моделирования ГИП у животных обеих групп производился забор биологического материала для последующих исследований. Животные подвергались воздействию наркоза, декапитации,

после чего извлекали ГМ и переносили его в 40% раствор формальдегида с последующим приготовлением препаратов тонких срезов.

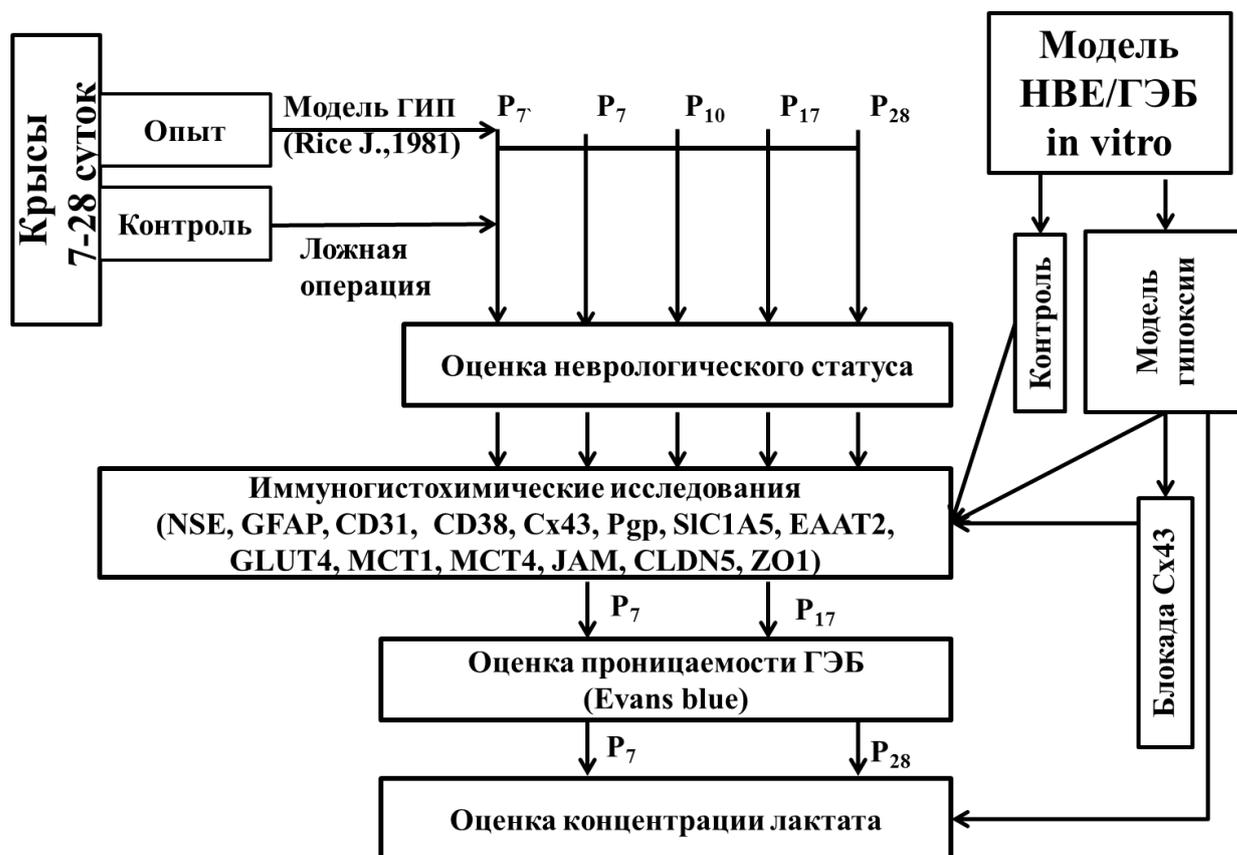


Рисунок 1 – Дизайн экспериментальной части исследования.

Оценка неврологического статуса животных осуществлялась с использованием международной шкалы Neurological Severity Score (NSS) для лабораторных животных (Chen J. et al., 2001; Speiser Z. et al., 2007).

Модель нейроваскулярной единицы *in vitro* содержала три вида клеток: нейроны, астроциты, эндотелиоциты. Материалом служили прогениторные клетки головного мозга эмбрионов крыс, из которых культивировались нейросферы с последующей дифференцировкой в астроциты и нейроны. Эндотелиоциты выделялись из сосудов головного мозга крыс.

Получение первичной тканевой культуры клеток ЦНС и начальной культуры крысиных нейросфер проводили из эмбрионов крыс гестационного возраста E15-E18 (E0 - день имплантации в стенку матки). Головной мозг эмбрионов извлекли согласно процедуре диссекции описанной в источнике (Julio E., 1998). Прогениторные клетки в количестве 6×10^4 - $1,2 \times 10^5$ жизнеспособных клеток/мл засеивали в культуральные флаконы T-25 cm^2 в 10 мл пролиферативной среды NeuroCult® NS-A Proliferation (StemCell, Канада). Инкубация клеток проводилась в условиях CO_2 -инкубатора при 5% CO_2 и температуре 37°C .

Дифференцировка крысиных нейросфер в нейроны и астроциты начиналась через 3-4 суток после посева, путем добавления в культуральную среду соответствующих факторов дифференцировки (NeuroCult® NS-A

Differentiation Kit (StemCell, Канада). В качестве питательной среды использовалась среда NeuroCult® NS-A Differentiation Medium (StemCell, Канада). Через 7 и 14 суток после начала дифференцировки клеток (нейроны, астроциты) проводили иммуноцитохимическую оценку чистоты полученных культур. Использовали флуоресцентные маркеры для нейронов (NSE), астроцитов (GFAP) по стандартным протоколам непрямого метода иммуноцитохимии. Чистота выделенных культур клеток рассчитывалась в процентах позитивных клеток на соответствующий маркер (NSE, GFAP) от общего числа клеток (как позитивных, так и негативных) в 10 полях зрения.

Выделение эндотелиоцитов из сосудов головного мозга проводили из сосудов ГМ крыс возраста 1-3 недели согласно протоколу (Niwa M. et al. 2006).

Создание модели нейроваскулярной единицы *in vitro* проводили после получения достаточного количества клеток в соответствии с протоколом, описанным в источнике (Моргун А.В. и др., 2011).

Модель химической гипоксии *in vitro* создавали путем инкубации сокультур клеток с йодацетатом натрия (50 мкМ конечная концентрация) в течении 30 минут при 37°C в стандартных условиях CO₂-инкубатора с последующей полной заменой культуральной среды. В качестве контроля использовалась сокультура, культивируемая без йодацетата с полной заменой среды (Gutmann B. et al., 2002).

Оценка пролиферативной активности клеток НВЕ проводилась с помощью прибора системы для клеточного анализа в реальном времени «xCELLigence» (Roche, Швейцария) (Jonsson M. et al., 2011, Guan N. et al., 2013).

Иммуногисто/цитохимические исследования (регистрация антигенов Р-гликопротеина, SLC1A5, Сх43, CD38, EAAT2, NSE, GFAP, CD31) проводились двойным непрямым методом иммуноферментного окрашивания как в срезах головного мозга полученных от крыс, так и в клеточной модели НВЕ *in vitro*. Первичными антителами являлись: 1. К Р-гликопротеину в разведении 1:100 (Abcam, ab3366). 2. Анти-SLC1A5 в разведении 1:200 (Abcam, ab84903). 3. Анти-CD38 в разведении 1:200 (Santa-Cruz, sc-7049). 4. Анти Connexin-43 в разведении 1:100 (Abcam, ab79010). 5. Анти-GFAP в разведении 1:100 (Sigma, G4546-100UG). 6. Анти-NSE в разведении 1:200 (Abcam, ab79757). 7. Анти-EAAT2 в разведении 1:400 (Abcam, ab85882). 8. Анти-CD31 в рабочем разведении 1:200 (Abcam, ab33858). Вторичные антитела: TRITC, FITC, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 350, Cy 5.5 в разведении 1:400. Препараты клеток (модель НВЕ *in vitro*) предварительно фиксировали, далее выполнялся стандартный протокол фирмы-производителя. Люминесцентная микроскопия препаратов осуществлялась при увеличении x900 (микроскоп «Olimpus-CX41», Olympus, Япония), а также лазерным конфокальным микроскопом «Olympus FV10i-W» (Olympus, Япония), использовалась видеосистема для анализа изображений Nikon Coolpix 4500 (Nikon, США). Считали относительное количество клеток, экспрессирующих каждый из видов антигена, а также их соэкспрессию на 300 клеток в образце при анализе не менее 10 полей зрения. При обработке результатов учитывалось относительное количество всех клеток, несущих

интересующую метку/метки и выраженное в процентах от общего количества клеток.

Объект и методы клинической части исследования

Объект исследования - новорожденные дети в возрасте от 0 до 28 дней жизни, всего 120 детей. Гестационный возраст детей целевой группы варьировал от 38 до 40 ($39,5 \pm 1,5$) недель. Масса тела при рождении варьировала от 3000 до 4150 (3283 ± 150) грамм. Критерии включения в целевую группу: доношенные новорожденные дети в возрасте 0-28 суток, находившиеся в условиях стационара с диагнозом «Церебральная ишемия» (ЦИ) разной степени тяжести, подписание родителем согласия на госпитализацию, диагностику и лечение. Дизайн клинической части исследования представлен на рисунке 2.



Рисунок 2 – Дизайн клинической части исследования.

Критерии исключения: родовая травма центральной нервной системы, внутриутробная инфекция, наследственные заболевания, метаболические и токсические поражения головного мозга, грубые пороки развития, билирубиновые энцефалопатии, гемолитическая анемия, кровопотери.

Дети, включенные в исследования, были разделены на группы: 1 группа (с церебральной ишемией 1 степени, $n=40$), 2 группа (с церебральной ишемией 2, $n=40$), 3 группа (с церебральной ишемией 3 степени, $n=40$). Был применен комплекс клинических, ультразвуковых и лабораторных методов исследования: ежедневное динамическое наблюдение за пациентами, анализ медицинской документации (истории болезни, амбулаторные карты), оценка

анамнестических данных, общие методы исследования: (клинический и биохимический анализ крови, общий анализ мочи), клиническое обследование новорожденных с оценкой неврологического статуса, нейросонография (АЛОКА -500 с датчиком 3,5 МГц) в ранний и поздний неонатальные периоды, регистрация нейронспецифической енолазы (NSE, нг/мл), глиального фибриллярного белка (GFAP, нг/мл), уровня sPECAM-1 (нг/мл) и глутамата (нг/мл) в сыворотке крови новорожденных (иммуноферментный анализ с использованием наборов Bender Medsystems и спектрофотометрия с использованием Glutamate Assay Kit, соответственно).

Статистическая обработка результатов исследования осуществлена с применением прикладных программ, «StatPlus Professional 5.8», Microsoft Excel 9.0, специальных прикладных программ для анализа изображений идущих в комплекте с оборудованием «Olimpus-CX41» и «Olympus FV10i-W». Описание качественных признаков представлено процентных долей и стандартной ошибки доли ($P \pm sp\%$). Ошибка показателей равных 0 рассчитывалась по методике Каминского. Количественные данные представлены в виде среднего (M) \pm среднеквадратичное отклонение (σ) при соблюдении закона нормального распределения; в виде медианы (Me), нижнего квартиля (LQ) и верхнего квартиля (UQ) при отсутствии нормального распределения. Для оценки распределения показателей на соответствие закона нормального распределения использовался критерий Колмогорова-Смирнова. В случаях несоблюдении условий нормальности распределения использовались методы непараметрической статистики. Две независимые группы сравнивались по критерию Манна-Уитни. Различия между зависимыми переменными оценивали с помощью критерия Уилкоксона. При нормальном распределении в выборках, сравнения проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Сравнения трех или более групп осуществлялось с использованием критерия Крускала-Уоллиса с последующими множественными сравнениями. Значимость различий качественных признаков оценивалась с использованием точного критерия Фишера. Корреляционные связи оценивались методом Спирмена (r). Сила корреляции считалась сильной при $r \geq 0,75$, слабой при $r \leq 0,25$ и умеренная при $0,25 \leq r \leq 0,75$. уровне значимости - $p < 0,05$. Различия принимали как статистически значимые при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Неврологический статус животных при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС

Неврологические нарушения наблюдались через 4 часа после ГИП (таблица 1). При этом наблюдается разница между опытной и контрольной группами ($p=0,001$). В группе контроля у животных в возрасте 7 суток наблюдались выраженные нарушения в неврологическом статусе, что соответствует повреждению средней степени тяжести. Статистически значимые различия в выраженности неврологических нарушений между опытной и

контрольной группами сохранялись до 4 недели (P28). Средняя степень тяжести в опытной группе ($9,8 \pm 0,3$ баллов) сохранялась до трех суток после ГИП (P10).

В то же время, в контрольной группе, наблюдалась умеренная неврологическая симптоматика ($2,5 \pm 0,5$ баллов). В дальнейшем отмечалось улучшение неврологического статуса у животных опытной группы. На 10 сутки после ГИП (P17) сумма баллов по шкале NSS составила $5,6 \pm 0,5$ (умеренное повреждение) против $1,2 \pm 0,2$ баллов в контрольной группе и была статистически значимо выше ($p=0,001$).

Таблица 1 - Результаты исследования неврологического статуса и экспрессии изучаемых молекул у животных опытной и контрольной групп (%; Me [LQ;UQ]).

Исследуемый показатель	Группа	Подгруппа					
		P7`	P7	P10	P17	P28	
Количество баллов по шкале NSS, M±δ	Опыт	$11 \pm 0,3^*$	$11 \pm 0,6^*$	$9,8 \pm 0,3^*$	$5,6 \pm 0,5^*$	$2,2 \pm 0,5$	
	Контроль	$7,5 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$	
Доля иммунопозитивных клеток, %	CD38	Опыт	2,2 [1; 3,5]*	8 [5; 10]*	8,5 [7; 10]*	4,5 [3,5; 6]	3 [2,5; 4]
		Контроль	5,3 [5; 7,5]	4,8 [3,8; 6]	4,5 [3,5; 6]	4 [3; 5,5]	2 [1; 4]
	GFAP	Опыт	6,2 [4; 8,5]	10 [9; 13] *	13 [11; 16]*	9 [7; 12]*	6 [4; 7]
		Контроль	6,8 [5; 8,5]	5 [2; 7]	7,8 [6; 9,5]	5,8 [3,8; 7]	5 [4; 6,5]
	GFAP/CD38	Опыт	26 [17; 35]*	23 [17; 30]*	26 [18; 34]*	34 [26; 40]*	28 [22; 36]*
		Контроль	19 [12; 23]	16 [11; 21]	16 [12; 19]	16 [12; 19]	10 [7; 12]
	Cx43	Опыт	11 [10; 13]	11 [10; 13]	13 [11; 14]*	15 [13; 16]*	13 [11; 16]*
		Контроль	12 [11; 14]	12 [10; 14]	8,5 [7; 11]	8,5 [7; 10]	9 [7,5; 10]
	Cx43/CD38	Опыт	72 [61; 83]	81 [76; 88]	76 [69; 83]	79 [74; 86]	75 [66; 85]
		Контроль	76 [68; 86]	78 [70; 88]	76 [68; 85]	77 [70; 81]	73 [62; 81]
	Cx43/GFAP	Опыт	75 [70; 83]	92 [84; 99]*	98 [95; 99]*	95 [89; 98]*	75 [64; 86]
		Контроль	72 [63; 77]	79 [73; 87]	76 [67; 86]	78 [75; 80]	78 [77; 80]
	Cx43/CD31	Опыт	74 [71; 78]	70 [67; 72]	47 [40; 52]*	51 [43; 60]*	66 [58; 72]*
		Контроль	75 [69; 80]	75 [70; 81]	78 [71; 86]	75 [68; 82]	75 [71; 78]

Примечания: * - статистическая значимость между опытной и контрольной группами ($p < 0,05$), критерий Манна-Уитни.

Особенности экспрессии CD38 в клетках головного мозга *in vivo*

В контрольной группе количество CD38+ клеток практически не меняется и остается стабильным в течение 17 суток постнатального развития на уровне 4-5,3% (таблица 1). Статистически значимое снижение зафиксировано в возрасте 28 суток. После перенесенного ГИП ЦНС произошло волнообразное изменение экспрессии CD38 в клетках НВЕ (таблица 1). Через 4 часа уменьшилось число CD38+ клеток, а через 8 часов увеличилось по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Увеличение числа клеток, экспрессирующих CD38 наблюдалось до 72 часов после ГИП ЦНС (P10), после чего зафиксировано уменьшение числа CD38-иммунопозитивных клеток к 10 суткам после ГИП (P17). В клеточной модели НВЕ *in vitro*, как и в исследовании *in vivo*, при гипоксии происходит увеличение числа CD38+ астроцитов (в 15 раз), с одновременным снижением количества CD38+ нейронов (в 15 раз) (таблица 5).

Для идентификации клеток, которые обеспечивают усиление экспрессии CD38 при перинатальном ГИП, изучены динамические изменения экспрессии

GFAP, а также соэкспрессия CD38 и GFAP при ГИП (таблица 1). У интактных животных экспрессия GFAP не изменилась, оставаясь в пределах 5-7,8% весь срок наблюдений. При этом наблюдается стойкое уменьшение числа CD38/GFAP+ астроцитов с 17 суток постнатального развития ($p < 0,05$). Таким образом, в раннем постнатальном периоде относительное количество астроцитов, экспрессирующих НАД+-гликогидролазу/CD38, уменьшается.

Иная картина характерна для опытной группы. Зафиксировано увеличение числа GFAP+ клеток через 8 часов после ГИП (максимально через 72 часа (P10)). К 28 суткам постнатального развития произошло снижение до контрольных значений. Также, после перенесенного перинатального ГИП произошло увеличение числа CD38/GFAP+ астроцитов, по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Во всех подгруппах у животных, после гипоксического воздействия, количество клеток, экспрессирующих GFAP и CD38, увеличивается (максимум в группе P17) и превышает значения контрольной группы в 2,5 раза ($p < 0,05$).

Итак, после перенесенного ГИП ЦНС развивается астроглиоз и подавляющее количество астроцитов НВЕ экспрессируют НАД+-гликогидролазу/CD38. На 28 сутки постнатального развития число астроцитов, соэкспрессирующих GFAP/CD38 уменьшается, но превышает контрольные значения ($p < 0,05$). Таким образом, при перинатальном ГИП ЦНС у животных, происходят разнонаправленные изменения экспрессии CD38: в первые часы - снижение с последующим увеличением экспрессии к 72 часам после поражения и нормализацией к 10 суткам. Отмечается уменьшение количества NSE+ нейронов, экспрессирующих CD38, с одновременным увеличением количества GFAP+ астроцитов (вероятно, вследствие реактивного астроглиоза или интенсификации процесса нейрогенеза), экспрессирующих исследуемый маркер. К 28 дню постнатального развития количество астроцитов уменьшается, но по-прежнему остается высоким количество клеток астроглиальной природы, экспрессирующих CD38.

Экспрессия коннексина-43 в клетках НВЕ экспериментальных животных *in vivo*

Для определения роли Cx43 в патогенезе перинатального ГИП проведено определение соэкспрессии CD38 и Cx43 в клетках НВЕ (таблица 1). Через 4-8 часов разница между группами отсутствует. Увеличение доли Cx43+ клеток отмечается с 3 суток эксперимента (P10), с продолжающимся увеличением к 10 суткам (P17) в 1,7 раза больше значений контрольной группы ($p < 0,05$). К 28 суткам жизни содержание клеток экспрессирующих Cx43 начинает снижаться, но остается значимо выше контрольных показателей ($p < 0,05$). При анализе соэкспрессии Cx43 и CD38 установлено, что у животных различного возраста обе молекулы экспрессируются одинаково часто в обеих группах.

Для определения клеток, экспрессирующих Cx43, проведена регистрация соэкспрессии коннексина-43 с маркером астроцитов (GFAP) и эндотелиоцитов (CD31) (таблица 1). Увеличение числа Cx43+ клеток после перенесенного ГИП

происходит за счет астроцитов, так как количество Сх43/GFAP-иммунопозитивных клеток в опытной группе увеличивается ($p < 0,05$). Через 8 часов количество Сх43+ астроцитов увеличивается (максимум через 72 часа). Уменьшение наблюдается с 10 суток с достижением контрольных значений к 28 суткам постнатального развития.

Иная картина экспрессии Сх43 наблюдается на эндотелиоцитах в опытной группе, где происходит 1,5-кратное уменьшение количества Сх43+ клеток. Через 72 часа отмечается минимальное содержание Сх43+ эндотелиоцитов. Восстановление значений до контрольных цифр произошло к 28 суткам постнатального периода. Подобные особенности экспрессии Сх43 установлены и в клеточной модели НВЕ *in vitro* (таблица 5). В контрольной культуре зафиксировано большое число астроцитов и эндотелиоцитов, экспрессирующих Сх43. В опытной культуре происходит увеличение только количества Сх43+ астроцитов ($p < 0,05$), без значимых изменений клеток эндотелия.

Эти изменения свидетельствуют о том, что реактивный астроглиоз сопровождается возрастанием функционального сопряжения астроцитов, а также скоординированной экспрессии Сх43 и CD38, участвующих в поддержании внутриклеточного гомеостаза НАД⁺ и регулирующих процессы его конверсии в кальций-мобилизирующий вторичный посредник, что может быть необходимым компонентом активации и миграции клеток астроглиальной природы.

Сопутствующее снижение экспрессии Сх43 эндотелиоцитами, вероятно, отражает процессы дизрегуляции барьерогенеза и нарушение целостности ГЭБ. Обнаруженное значительное количество (до $\frac{3}{4}$) клеток, соэкспрессирующих CD38 и Сх43, может свидетельствовать о функциональном сопряжении этих двух молекул на астроцитах. При этом коннексин-43 регулирует доступность субстратов (НАД⁺, АТФ) для взаимодействия с CD38, которая обеспечивает превращение НАД⁺ в цАДФР, мобилизующую кальций из внутриклеточных депо в цитозоль, что актуально для активации астроцитов и их миграции в очаг повреждения. Увеличение числа CD38+ астроцитов маркирует собой не только проявления феномена глутамат-зависимой эксайтотоксичности, но и нарушения межклеточного транспорта глутамата. Действительно, в ходе исследования, в экспериментах *in vitro*, зарегистрировано изменение экспрессии глутаматных транспортеров в астроцитах после перенесенной «химической гипоксии» (таблица 4).

В целом, полученные результаты свидетельствуют о новых механизмах нарушения структурной и функциональной целостности НВЕ/ГЭБ при ГИП ГМ, что и стало предметом изучения на следующем этапе работы, для проведения которого была использована разработанная нами оригинальная модель НВЕ *in vitro*.

Экспрессия белков плотных контактов церебральных эндотелиоцитов и маркеров пролиферативной активности в пато(физио)логических условиях *in vivo*

В физиологических условиях в период 7 - 28 суток постнатального развития количество эндотелиоцитов, экспрессирующих белок JAM (таблица 2), в коре головного мозга и миндалине лабораторных животных практически не меняется, а в гиппокампе увеличивается в два раза ($p < 0,05$). Количество эндотелиальных клеток, экспрессирующих белки ZO1 и CLDN5 статистически значимо увеличивается во всех изученных областях мозга ($p < 0,05$).

Таблица 2 – Количество эндотелиоцитов НВЕ, экспрессирующих белки плотных контактов (%), $M \pm \sigma$.

Область мозга	Подгруппа	JAM		ZO1		CLDN5	
		Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Гиппокамп	P7	9 \pm 1,1	13,8 \pm 1,8	27,2 \pm 2	48,1 \pm 4,7#	16,8 \pm 1,6	28 \pm 3,1#
	P28	18 \pm 1,7*	24,6 \pm 1,2*#	35,1 \pm 4,1*	25,6 \pm 3,9*	21,9 \pm 2*	34,4 \pm 3,6#
Миндалина	P7	10,5 \pm 5,5	24,5 \pm 2,7#	21,3 \pm 3,7	52,2 \pm 6,7#	14,6 \pm 2,8	22,4 \pm 2,6#
	P28	9,7 \pm 1,4	27,8 \pm 2,9#	28,5 \pm 1,5*	28,5 \pm 8,9*	24 \pm 4,8*	50,1 \pm 5,3*#
Кора	P7	22,9 \pm 4,8	29,5 \pm 2,7	19,1 \pm 1,4	42,8 \pm 4,2#	18,9 \pm 1,5	29,7 \pm 3#
	P28	24,2 \pm 2,7	28,3 \pm 2,6	28,2 \pm 5,5*	17,2 \pm 2,5*	44,9 \pm 3,2*	54,3 \pm 2,9*#

Примечание: * - статистическая значимость, $p < 0,05$ между животными различного возраста (P7, P28); # - статистическая значимость, $p < 0,05$ между животными группами контроля и опытной.

У животных опытной группы (P7), число JAM+ эндотелиоцитов в гиппокампе и коре головного мозга сопоставимо с группой контроля. Только в области миндалевидного тела количество JAM+ клеток в два раза больше ($p < 0,05$). К 28 суткам постнатального развития у животных опытной группы произошло статистически значимое двукратное увеличение количества JAM+-эндотелиальных клеток в области гиппокампа, при этом превышающим показатели группы контроля ($p < 0,05$). Интересно, что эндотелиоцитов, экспрессирующих белок ZO1 к 28 суткам постнатального развития в опытной группе, стало меньше и достигло показателей контрольной группы во всех изучаемых областях головного мозга. Одновременно с этим, в опытной группе животных, произошло статистически значимое увеличение количества CLDN5+эндотелиоцитов в миндалине и коре головного мозга с двукратным превышением изучаемого показателя по сравнению с группой контроля.

Перинатальная гипоксия-ишемия нарушает связи между экспрессией белков плотных контактов (JAM, ZO1 и CLDN5) и приводит к разнонаправленным изменениям экспрессии изучаемых белков эндотелиальными клетками в различных регионах головного мозга. Обнаруженные изменения можно объяснить необходимостью сохранения ангиогенеза как события, сопровождающего процессы пластичности мозга, что подтверждается высокой пролиферативной активностью клеток церебрального

эндотелия, зарегистрированной по экспрессии JAM+/PCNA+ иммунопозитивных меток, в первые часы после гипоксически-ишемического воздействия. Так относительное количество JAM+/PCNA+ клеток (пролиферирующих) в исследуемых регионах мозга после ГИП увеличивается в гиппокампе и коре головного мозга (P7) с последующим снижением к P28. В области миндалевидного тела наблюдалась обратная картина – уменьшение пролиферирующих клеток. Снижение пролиферативной активности клеток церебрального эндотелия к 28 суткам жизни может служить свидетельством нарушения барьерогенеза, что согласуется с особенностями неврологических нарушений, сохраняющимся в это время у экспериментальных животных.

Можно предположить, что перинатальное ГИП приводит к интенсификации ангиогенеза, что сопровождается дисбалансом в экспрессии белков плотных контактов и нарушениями формирования плотных контактов в клетках церебрального эндотелия. Эти изменения могут иметь не только патологическое, но и отчасти компенсаторное влияние - сохранение пролиферативного потенциала клеток микрососудов гиппокампа и коры головного мозга.

Экспрессия белков, транспортирующих глутамин, глутамат, гидрофобные молекулы, монокарбоксилатные транспортеры (MCT1, MCT4) и транспортер глюкозы (GLUT4) в клетках НВЕ *in vivo*

Для оценки роли белков-транспортеров в регуляции процессов межклеточной коммуникации при перинатальном ГИП ЦНС были изучены: экспрессия Р-гликопротеина (Pgp) - транспортера гидрофобных ксенобиотиков и белка SLC1A5 - транспортера глутамина - на нейронах, астроцитах и эндотелиоцитах. Для этого фенотипировали клетки НВЕ по экспрессии белков-маркеров нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов и соэкспрессии Pgp и SLC1A5. Полученные данные представлены в таблице 3.

В группе контроля, нейронов, экспрессирующих Pgp, не было обнаружено. В опытной группе животных зафиксировано значимое увеличение количества нейронов, экспрессирующих Pgp, в сравнении с контролем ($p < 0,05$) уже через 4 часа. На 10 сутки после ГИП (P17) количество Pgp+ нейронов уменьшилось в два раза ($p < 0,01$) и продолжало снижаться до 28 суток постнатального развития.

У контрольных животных количество астроцитов и эндотелиоцитов, экспрессирующих Pgp, практически не изменялось за весь период наблюдений и оставалось в пределах 0,6-2,8% (астроциты) и 1,5-4,3% (эндотелиоциты).

У животных опытной группы после ГИП количество Pgp+ астроцитов и эндотелиоцитов существенно превышало показатели контрольной группы. Через 4 часа число Pgp+ астроцитов увеличилось в 9,5 раз, эндотелиоцитов - 2,6 раза. Через 8 часов зафиксировано дополнительное увеличение число Pgp+ позитивных астроцитов и эндотелиоцитов ($p < 0,05$), практически в 2 раза, по сравнению с предыдущей временной подгруппой и в 4 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$). С третьих суток отмечается снижение числа

Pgp+ астроцитов. Однако, их количество оставалось в 5 раза выше, чем в контрольной группе ($p < 0,01$) к 28 суткам постнатального развития.

Иная ситуация наблюдалась с эндотелиоцитами. Через 72 часа после ГИП продолжается увеличение числа Pgp+ клеток до максимальных цифр среди всех подгрупп и больше чем в контрольной группе в 7,7 раз ($p < 0,01$). В дальнейшем, зафиксировано постепенное уменьшение количества Pgp+ эндотелиоцитов. Но их количество превышало контрольные показатели в 4,7 раза на 28 сутки жизни ($p < 0,01$).

Таблица 3 - Результаты регистрации изменения экспрессии белков-транспортёров гидрофобных молекул, глутамина, глутамата в клетках НВЕ у животных опытной и контрольной групп, (%; $M \pm \sigma$).

Подгруппа	Маркер	Нейроны		Астроциты		Эндотелиоциты	
		Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
P7'	Pgp	11,3±3,4*	0	16,3±4,9*	1,7±1,1	8,7±2,7*	3,3±0,8
	SLC1A5	2,4±1,1	2,1±0,6	5,8±0,3	5,2±0,1	н/э	н/э
	EAAT2	н/э	н/э	24,6±3,8*	50,3±5,6	н/э	н/э
P7	Pgp	16,7±4,3*	0	17,1±3,5*	1,5±0,9	16±2,1*	3,9±0,4
	SLC1A5	20,0±8,0*	2,5±0,3	9,0±1,0*	4,5±0,5	н/э	н/э
	EAAT2	н/э	н/э	23,0±5,5*	46,8±6,3	н/э	н/э
P10	Pgp	18,0±5,5*	0	13,7±3,1*	2,1±0,4	20,8±1,7*	2,7±1,2
	SLC1A5	23,0±5,0*	1,5±0,1	22,0±6,0*	4,8±0,3	н/э	н/э
	EAAT2	н/э	н/э	65±4,1*	52,7±3,8	н/э	н/э
P17	Pgp	9,1±2,1*	0	12,1±4,2*	1,4±0,6	16,0±2,7*	2,5±0,7
	SLC1A5	0,4±0,2*	2,2±0,8	18,0±4,0*	4,7±0,2	н/э	н/э
	EAAT2	н/э	н/э	72,1±4,2*	48,8±7,2	н/э	н/э
P28	Pgp	7,6±1,4*	0	10,1±2,6*	1,9±0,5	15,1±1,8*	3,2±0,6
	SLC1A5	0,3±0,1*	1,8±0,4	4,8±0,4	5,1±0,2	н/э	н/э
	EAAT2	н/э	н/э	54,1±2,6	52,1±6,2	н/э	н/э

Примечания: * - уровень значимости между группами $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни; н/э - не экспрессируется клетками.

Экспрессия SLC1A5 (транспортёр глутамина) зарегистрирована на астроцитах и нейронах, но не на эндотелиоцитах. При этом во всех возрастных подгруппах контрольной группы доля нейронов и астроцитов, экспрессирующих SLC1A5 была сопоставима (таблица 3). Через 8 часов после ГИП происходит десятикратное увеличение числа SLC1A5+ нейронов, которое сменяется резким уменьшением - ниже контрольных значений ($p < 0,01$). При этом происходит пятикратное увеличение числа SLC1A5+ астроцитов, которое сохраняется высоким намного дольше, чем на нейронах, до 10 суток после ГИП ($p < 0,05$). Снижение до контрольных значений наступает к 28 суткам постнатального развития. Изменения экспрессии транспортёра глутамина SLC1A5 в клеточной модели НВЕ *in vitro* принципиально не отличаются от результатов полученных *in vivo*. В условиях острой гипоксии происходит пятикратное увеличение экспрессии SLC1A5 на нейронах и астроцитах *in vitro* ($p < 0,01$).

В контрольной группе у крыс разного возраста уровень соэкспрессии EAAT2 (транспортёра глутамата) и GFAP оставался на одном уровне - в 40-60%

клеток в популяции. В опытной группе животных наблюдается времязависимое изменение экспрессии транспортера глутамата EAAT2. В первые 8 часов после ГИП наблюдается резкое уменьшение, а с 3 по 10 сутки увеличение EAAT2-позитивных клеток. Нормализация показателя экспрессии EAAT2 зафиксирована на 28 сутки постнатального развития. В группе контроля динамических изменений не было. В модели НВЕ *in vitro* в условиях гипоксии на астроцитах происходит аналогичное уменьшение экспрессии EAAT2.

Количество MCT1+-эндотелиоцитов и астроцитов в контрольной группе, в гиппокампе, коре и миндалине значительно уменьшается к 28 дню постнатального развития (таблица 4). Зафиксировано высокое, по сравнению с контролем, количество MCT1-иммунопозитивных эндотелиоцитов в области гиппокампа. К 28 дню жизни произошло статистически значимое превышение количества MCT1+ эндотелиоцитов во всех изучаемых анатомических областях головного мозга по сравнению с контрольной группой, где произошло уменьшение изучаемого показателя ($p < 0,05$).

Таблица 4 - Результаты регистрации изменения экспрессии белков-транспортеров гидрофобных молекул, глутамина, глутамата в клетках НВЕ у животных опытной и контрольной групп, (% M \pm σ).

Группа	Область мозга	Клетки	MCT1+		MCT4+		GLUT4+	
			P7	P28	P7	P28	P7	P28
Контроль	Гиппокамп	Астроциты	11,9 \pm 2,1	2,7 \pm 0,7*	0	12,6 \pm 1,4*	21,4 \pm 3	37,6 \pm 2,9*
		Эндотелий	30,2 \pm 2,6	11,4 \pm 1,6*	43,2 \pm 8,1	41,1 \pm 4,4	57,3 \pm 4,4	69,5 \pm 2,7*
	Кора	Астроциты	5,5 \pm 1,6#	6,8 \pm 3,8	9,7 \pm 5,3	17,8 \pm 2,6*	25,2 \pm 3,6	32,6 \pm 3,6*
		Эндотелий	39,7 \pm 2,9	27,8 \pm 2,7*	51,0 \pm 7,1	76,1 \pm 2,8*	82,7 \pm 3	80,7 \pm 1,7
	Миндалина	Астроциты	26,6 \pm 3,4	19 \pm 2,8*	5,3 \pm 2,5	10,9 \pm 3,1*	23,2 \pm 1,8	30,8 \pm 2,5*
		Эндотелий	35,1 \pm 3,9	17,6 \pm 2,4*	83,3 \pm 6,8	54,2 \pm 10,1*	43,3 \pm 6,1	68 \pm 3,5*
Опыт	Гиппокамп	Астроциты	13,3 \pm 1,6	15,1 \pm 1,6#	20,6 \pm 4,9#	3,2 \pm 1,8*#	22,2 \pm 1,8	14 \pm 2,7*#
		Эндотелий	52,0 \pm 1,8#	41,6 \pm 2,4#	85,5 \pm 4,2#	72,3 \pm 3*#	93,8 \pm 3#	84,7 \pm 4,7#
	Кора	Астроциты	20,3 \pm 2#	14,7 \pm 1,9*#	25,6 \pm 7#	2,0 \pm 1,4*#	20,1 \pm 1,8	24,6 \pm 2,6#
		Эндотелий	32,0 \pm 1,5	57,2 \pm 3,4*#	57,5 \pm 4,7	70,6 \pm 3,7*	81,1 \pm 2,8	90,9 \pm 4,3
	Миндалина	Астроциты	10,1 \pm 1,7#	20,1 \pm 2,5*	36,6 \pm 6,2#	6,8 \pm 3,2*	23,5 \pm 3,1	16,1 \pm 1,2*#
		Эндотелий	37,2 \pm 2,1	47,3 \pm 3,6*#	76,7 \pm 6,4	61,1 \pm 3,7*	88,8 \pm 7,4#	93,9 \pm 4,2#

Примечание: * - статистическая значимость, $p < 0,05$ между животными различного возраста (P7, P28); # - статистическая значимость, $p < 0,05$ между животными группы контроля и групп гипоксия.

Перинатальное ГИП вызывает резкое увеличение MCT4+ астроцитов в первые часы после ГИП (P7) с последующим уменьшением их количества к 28 суткам постнатального развития в гиппокампе, коре и миндалине (таблица 4), хотя в физиологических условиях количество астроцитов, экспрессирующих изучаемый транспортер увеличивается в период с P7 до P28, закономерно отражая возрастающую способность астроглиальных клеток к утилизации глюкозы и транспорту лактата.

В контрольной группе количество MCT4+-эндотелиоцитов в области гиппокампа с периода P7 до периода P28 не изменилось; в коре головного мозга произошло полутора кратное увеличение MCT4+ эндотелиальных клеток; в области миндалины – уменьшение ($p < 0,05$). После ГИП, через 8 часов

наблюдалось резкое увеличение количества эндотелиоцитов, экспрессирующих МСТ4 в области гиппокампа по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). В остальных изучаемых анатомических областях ГМ значимых изменений не зафиксировано. К 28 суткам постнатальной жизни у животных опытной группы наблюдались изменения количества МСТ4+ эндотелиоцитов, однонаправленные с группой контроля, однако изучаемый показатель оставался статистически значимо более высоким в области гиппокампа.

Экспрессия GLUT4 в клетках эндотелия определяет особенности транспорта глюкозы через ГЭБ и доступность глюкозы для реакций гликолиза (таблица 4). В физиологических условиях количество GLUT4+ нейронов во всех исследуемых анатомических областях головного мозга увеличивается к 28 дню постнатальной жизни ($p < 0,05$). Динамические изменения количества GLUT4+-эндотелиоцитов соответствуют изменениям числа нейронов, т.е. увеличение, но в коре головного мозга этот показатель практически не меняется и остается достаточно высоким (79-85%).

При развитии ГИП ЦНС зафиксировано резкое увеличение количества GLUT4-иммунопозитивных эндотелиоцитов в области гиппокампа и миндалина уже в первые часы (подгруппа P7) ($p < 0,05$). В этот же период времени количество нейронов, экспрессирующих изучаемый транспортер не менялось. К 28 суткам жизни зафиксировано статистически значимо меньшее количество GLUT4+-нейронов, по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). На фоне возрастающей потребности нейронов в глюкозе, которая развивается в ходе онтогенеза, наблюдается уменьшение транспортеров глюкозы (GLUT4) на нейронах. Именно этот факт может объяснить отсроченные клинические и патофизиологические изменения в ЦНС, наблюдаемые после перенесенного гипоксически-ишемического поражения.

При анализе концентрации лактата в клетках гиппокампа и миндалина установлено, что у животных контрольной группы уровень лактата в клетках гиппокампа постепенно увеличивается к 28 суткам постнатального развития с $1,97 \pm 0,41$ нмоль/мг белка до $2,23 \pm 1,76$ нмоль/мг белка ($p < 0,05$). В миндалевидном теле головного мозга в этот же период жизни животных произошло статистически значимое снижение внутриклеточной концентрации лактата с $4,9 \pm 0,89$ нмоль/мг белка до $3,1 \pm 0,8$ ($p < 0,05$).

После ГИП концентрация внутриклеточного лактата в клетках гиппокампа и миндалина оказалась статистически значимо ниже во все возрастные периоды по сравнению контрольной группой ($p < 0,05$) и практически не имела динамических изменений. Концентрация лактата в клетках гиппокампа у животных подгруппы P7 составила $0,78 \pm 0,29$ нмоль/мг белка, подгруппы P28 – $1,41 \pm 0,96$ нмоль/мг белка; в клетках миндалина – $1,06 \pm 0,91$ нмоль/мг белка (подгруппа P7) и $1,26 \pm 0,96$ нмоль/мг белка (подгруппа P28).

Итак, в ходе исследования экспериментально подтверждено, что развитие головного мозга, структурно-функциональная целостность гематоэнцефалического барьера зависят от скоординированной работы и

реакции клеток-компонентов НВЕ/ГЭБ, которая заключается в динамическом изменении экспрессии и активности молекул астроглиального происхождения, вовлеченных в локальное метаболическое сопряжение с клетками эндотелия. Эти механизмы нарушаются при действии повреждающих факторов в раннем онтогенезе, причем характер нарушения может зависеть от периода действия и типа повреждающего фактора. Четко можно обозначить гиппокамп и миндалину, как отделы мозга, которые демонстрируют высокую степень чувствительности к действию факторов, нарушающих процессы барьерогенеза.

Установлено, что ключевые изменения, маркирующие нарушение целостности ГЭБ и процессов ангиогенеза при перинатальном гипоксически-ишемическом повреждении головного мозга, заключаются в увеличении экспрессии МСТ1 клетками эндотелия на фоне снижения экспрессии МСТ4 астроцитами, увеличении экспрессии GLUT4 клетками эндотелия. Логично предположить, что одним из механизмов адаптации клеток нейроваскулярной единицы является обеспечение сочетанного использования лактата и глюкозы в качестве энергетических субстратов в неонатальном периоде.

Оценка проницаемости гематоэнцефалического барьера *in vivo*

В ходе работы была произведена оценка содержания красителя Evans blue в полушарии целиком, а также отдельно в гиппокампе, коре и миндалине головного мозга у животных в подгруппах P7 и P17.

На фоне гипоксически-ишемического поражения ЦНС статистически значимо изменяется содержание красителя Evans blue в полушарии в подгруппе P7 (в два раза), так и P17, что свидетельствует о нарушении проницаемости ГЭБ в целом. При этом коэффициент проницаемости для животных опытной группы оказался выше на 57% - 1,05, по сравнению с группой контроля - 0,45 ($p < 0,05$). Содержание красителя в гиппокампе (0,5 мкг/г) и миндалине (1,5 мкг/г) у животных опытной группы (подгруппа P7) был в 5 раз выше, чем в группе контроля (0,1 мкг/г и 0,3 мкг/г, соответственно). К 17 суткам жизни у животных опытной группы более высокое содержание красителя Evans blue зафиксировано только в области гиппокампа (3,1 мкг/г), по сравнению с группой контроля (1,8 мкг/г), в то время как в остальных областях головного мозга его содержание было сопоставимым.

Таким образом, общее увеличение проницаемости ГЭБ для красителя Evans blue, а также его накопление в ткани головного мозга, которое наблюдается к 17 суткам, происходит за счет области гиппокампа и миндалины, что согласуется с данными, полученными при анализе особенностей экспрессии белков плотных контактов. Это подтверждают гипотезу о том, что в нарушении проницаемости ГЭБ при гипоксически-ишемическом повреждении играет не только экспрессия белков плотных контактов, но и их функциональная активность, в частности, вероятнее всего, за счет ZO1-опосредованной дисрегуляции гликолитической активности в клетках церебральных микрососудов.

Изменение экспрессии белков плотных контактов и роль Cx43 в регуляции функционирования НВЕ *in vitro* и при гипоксическом повреждении

Следующий этап исследования проводился на клеточной модели НВЕ *in vitro*. В опытной группе произошло статистически значимое уменьшение числа эндотелиоцитов (таблица 5), экспрессирующих белки JAM, ZO1 и CLDN5 по сравнению с интактными клетками ($p=0,001$). При этом максимальное уменьшение зафиксировано в отношении клеток, экспрессирующих белок ZO1, практически в три раза. Выявленные особенности позволяют подтвердить предположение о том, что особенности экспрессии белков плотных контактов (JAM, ZO1 и CLDN5) выявленные *in vivo*, связаны с диссоциацией белков плотных контактов в эндотелиоцитах головного мозга экспериментальных животных, дисбалансом их экспрессии, а также их участием в компенсаторном ангиогенезе.

Для определения роли коннексина-43 в межклеточной коммуникации, а также транспортных систем в энергетическом сопряжении клеток нейроваскулярной единицы регистрировалась экспрессия изучаемых молекул в физиологических и патологических условиях (химическая гипоксия), в том числе, в присутствии блокатора активности коннексиновых каналов – карбенексолона (таблица 6).

Таблица 5 - Молекулы-транспортёры и регуляторы метаболического сопряжения в НВЕ при гипоксии *in vitro*, (% Me [LQ;UQ]).

Маркер	Нейроны		Астроциты		Эндотелиоциты	
	Гипоксия	Контроль	Гипоксия	Контроль	Гипоксия	Контроль
CD38	0,4 [0,2;0,6]*	6 [5,2; 6,7]	30 [25; 40]*	2 [1,7; 2,3]	20 [17; 22]	24 [22,5; 26]
Cx43	3,2 [2,4; 3,9]	4,1 [3,1; 5]	59 [45; 72]*	21 [14; 27]	15 [9; 23]	23 [15; 30]
Pgp	9 [7; 10]*	0	72 [60; 84]*	20 [14; 25]	78 [65; 90]*	50 [36; 63]
SLC1A5	5 [3,6; 6,4]*	1 [0,5; 2]	5 [4,4; 6]*	1 [0,5; 1,7]	0	0
EAAT2	0	0	6 [4; 7,8]*	9,6 [8,5; 10]	0	0
JAM	н/э	н/э	н/э	н/э	63 [52; 70]	90 [90; 97]*
ZO1	н/э	н/э	н/э	н/э	34 [22; 46]	96 [92; 98]*
CLDN5	н/э	н/э	н/э	н/э	65 [58;72]	95 [92; 98]*

Примечания: н/э - не экспрессируется клетками;* - уровень значимости между группами $p<0,01$, критерий Манна-Уитни.

При гипоксии в снижение CD38+нейронов в 15 раз, что сопряжено с увеличением Pgp+ и SLC1A5+ нейронов в 5 раз ($p<0,01$). Число астроцитов, экспрессирующих CD38 увеличилось в 15 раз, транспортер глутамин - 5 раз, Pgp - 3,6 раз, Cx43 - 2,8 раз ($p<0,01$). На эндотелиоцитах единственной молекулой, из числа изученных, отреагировавшей на действие химической гипоксии является Р-гликопротеин - увеличение в 1,5 раза ($p<0,01$).

При добавлении в культуральную среду к исследуемым клеткам карбенексолона - блокатора проницаемости Cx43, зарегистрированы изменения экспрессии молекул, представленные в таблице 6.

В стандартных условиях культивирования, в клеточной модели НВЕ *in*

in vitro, уменьшением числа нейронов, экспрессирующих Cx43, CD38 и SLC1A5; астроцитов, несущих на своей поверхности CD38, SLC1A5 и EAAT2 и CD38+ эндотелиоцитов.

Таблица 6 - Молекулы-транспортеры и регуляторы метаболического сопряжения в НВЕ при гипоксии *in vitro* при подавлении проницаемости коннексина-43, (% Me [LQ;UQ]).

Маркер	Нейроны		Астроциты		Эндотелиоциты	
	Гипоксия+ карбено-ксолон	Контроль+ карбено-ксолон	Гипоксия+ карбено-ксолон	Контроль + карбено-ксолон	Гипоксия+ карбено-ксолон	Контроль+ карбено-ксолон
CD38	0,4 [0,2;0,6]*	3,5 [2,7; 4,2]	2 [1,8; 2,2]	1,5 [1,3; 1,7]	20 [16; 22]	18 [10; 27]
Cx43	0,8 [0,6;1]*	1,5 [1,2; 1,8]	1,2 [0,8;1,4]*	3,8 [3,3 4,2]	2 [1; 2,6]*	10 [2;16]
Pgp	11 [8;15]*	0	60 [40;80]*	22 [14; 30]	96 [90; 99]*	58 [42;72]
SLC1A5	0,04 [0,02;0,07]	0,02 [0,01;0,04]	0	0	0	0
EAAT2	0	0	3,2 [2; 4,4]	2,4 [2,1;2,8]	0	0

Примечания: * - уровень значимости между группами $p < 0,01$, критерий Манна-Уитни.

Уменьшение экспрессии CD38 может быть связано со снижением доступности субстратов (НАД⁺, АТФ), которые доставляются из клеток в клетки или во внеклеточное пространство посредством коннексинов. С учетом полученных результатов и данных литературы, логично предположить, что при этом наблюдается уменьшение накопления внутриклеточного кальция, снижение потери клетками НАД⁺, снижение активности NMDA-каналов, уменьшение секреции нейронами глутамата во внеклеточное пространство. А уменьшение концентрации глутамата во внеклеточном пространстве, приводит к уменьшению транспортеров глутамата (EAAT2) на астроцитах. Вследствие снижения поступления субстрата для глутаминсинтетазы, ее активность в астроцитах уменьшается, происходит уменьшение биосинтеза глутамина из глутамата, который в нормальных условиях поступает в нейроны (Lehmann S. et al., 2009). Уменьшение секреции астроцитами глутамина вызывает уменьшение экспрессии транспортеров глутамина (SLC1A5) на нейронах и астроцитах.

Блокирование коннексина-43 на клетках НВЕ проявляется в снижении экспрессии Cx43 и CD38 на всех клетках НВЕ, транспортера глутамина на нейронах, транспортера глутамата на астроцитах, а также усилении экспрессии Pgp на эндотелиоцитах, культивируемых в условиях нормоксии. В условиях гипоксии под действием блокатора Cx43 регистрируется угнетение экспрессии Cx43 и CD38, отсутствует увеличение экспрессии глутаминовых и глутаматных транспортеров, характерное для астроцитов.

Особенности экспрессии монокарбоксилатных транспортеров и изменение концентрации лактата и глутамата в клетках НВЕ *in vitro*

Для определения роли монокарбоксилатных транспортных систем (MCT1 и MCT4) в реализации межклеточной коммуникации и энергетического сопряжения клеток НВЕ иммуногистохимическим методом проведена

регистрация экспрессии МСТ1 и МСТ4 в физиологических условиях и при гипоксии. При этом нейроны не экспрессируют целевые молекулы (таблица 7).

Таблица 7 – Монокарбоксилатные транспортеры клеток НВЕ *in vitro*, (%; Ме [LQ;UQ]).

Маркер	Астроциты			Эндотелиоциты		
	Контроль	Опыт	p	Контроль	Опыт	p
МСТ1	13,4 [12; 15]	26 [22; 28]	0,01	40 [37; 42]	64 [60; 66]	0,001
МСТ4	19 [13; 24]	30 [25; 36]	0,03	40 [38; 45]	85 [81; 90]	0,001

Примечания: p - уровень значимости между группами, критерий Манна-Уитни.

После гипоксического воздействия количество клеток астроглии, экспрессирующих МСТ1 увеличилось в 2 раза по сравнению с контрольной группой ($p=0,01$). МСТ4-иммунопозитивных астроцитов в опытной группе было в 1,5 раза больше по сравнению с контрольной ($p=0,03$).

В опытной группе наблюдается увеличение числа эндотелиоцитов, экспрессирующих монокарбоксилатные транспортеры: МСТ1 в 1,5 раза, МСТ4 – 2 раза, по сравнению с клетками контрольной группы ($p=0,001$).

Принимая во внимание роль монокарбоксилатных транспортеров в осуществлении метаболического сопряжения церебральных эндотелиоцитов и астроглии посредством молочной кислоты, была оценена концентрация лактата в культуральной среде после гипоксического воздействия *in vitro*. Через 6 часов инкубации после перенесенной гипоксии концентрация лактата в среде ($55,8 \pm 5,4$ нг/мкл) было статистически значимо меньше, чем в группе контроля - $143 \pm 5,8$ нг/мкл ($p=0,001$). Через 24 часа после гипоксического воздействия сохранялись обнаруженные ранее особенности. Концентрация лактата в опытной группе практически не изменилось – $60,3 \pm 3,2$ нг/мкл и было статистически значимо ниже, чем в группе контроля – $135 \pm 5,2$ нг/мкл ($p=0,001$).

Еще одним параметром, который характеризует межклеточные взаимодействия в НВЕ/ГЭБ в норме и при гипоксии, является концентрация внеклеточного глутамата. В результате проведенного исследования мы выявили, что в результате гипоксического воздействия произошло статистически значимое увеличение количества глутамата в среде ($32,82 \pm 1,41$ нг/мл), по сравнению с контрольной группой клеток - $29,95 \pm 1,27$ нг/мл ($p < 0,05$).

Результаты исследования *in vitro* однотипны с результатами, полученными с использованием экспериментальных животных. Гипоксическое воздействие на клетки НВЕ/ГЭБ вызывает дисбаланс в экспрессии МСТ1 и МСТ4 астроцитами и эндотелиальными клетками. Скорее всего, обнаруженные изменения связаны с тем, что в большей степени меняется лактат-продуцирующая активность эндотелиальных клеток и, в меньшей степени, происходят изменения в клетках астроглиальной природы.

Выявленные в ходе исследования особенности содержания лактата в культуральной среде после гипоксического воздействия согласуются с изменением числа клеток, которые экспрессируют транспортеры лактата

(MCT1 и MCT4) и соответствуют результатам, которые были получены ранее в эксперименте *in vivo*.

Повышение концентрации глутамата во внеклеточном пространстве согласуется с уменьшением количества клеток, несущих на своей поверхности транспортеры глутамата (EAAT2), учитывая функциональную активность этой молекулы, которая осуществляет захват внеклеточного глутамата и транспортировку его внутрь клетки.

В физиологических условиях астроциты, в отличие от эндотелиоцитов, MCT1 могут реализовывать транспорт лактата и в клетку, и из клетки. Такие возможности определяются метаболическим статусом астроглиальных клеток, соотношением НАДН/НАД⁺. В то же время MCT4 обеспечивает только экспорт лактата при активном гликолизе (Halestrap A.P., 2013). После выхода лактата в межклеточное пространство, эндотелиальные MCT1 осуществляют его транспорт внутрь клетки. Учитывая результаты, обнаруженные в экспериментах *in vivo* можно предположить, что в раннем неонатальном периоде гликолитически активные эндотелиоциты ГЭБ продуцируют лактат, который поступает во внеклеточное пространство за счет активности монокарбоксилатных транспортеров. При этом лактат, в ранние сроки постнатального развития, является энергетическим субстратом для нейронов, а также обладает проангиогенным эффектом, влияет на пролиферативную активность клеток эндотелия и апоптоз (Kasischke K., 2011).

Особенности пролиферативной активности клеток НВЕ *in vitro*

Для оценки особенностей пролиферативной активности клеток НВЕ (астроциты, эндотелиоциты, нейроны) *in vitro* в (пато)физиологических условиях провели регистрацию клеточного индекса с использованием системы анализа пролиферации клеток в режиме реального времени «xCELLigence» в течение 48 часов с интервалом 5 мин. При анализе пролиферативной активности мы выявили статистически значимое уменьшение пролиферативной активности (по величине клеточного индекса) в группе клеток, которые подверглись воздействию гипоксии, по сравнению с клетками, которые культивировали в физиологических условиях ($p < 0,05$).

Принимая во внимание выявленные нами особенности изменения концентрации лактата, экспрессии монокарбоксилатных транспортеров (MCT1 и MCT4) и пролиферативной активности клеток НВЕ/ГЭБ мы изучили роль монокарбоксилатных транспортеров на пролиферативную активность клеток. Проведенное экспериментальное исследование с применением модуляторов транспорта лактата (флоретин - блокатор монокарбоксилатных транспортеров MCT1, MCT4) в клетках модели НВЕ/ГЭБ *in vitro* (рисунок 3) позволило установить, что подавление транспорта лактата в клетках астроглии имеет своим результатом нарушение функциональной компетентности эндотелиального слоя, что свидетельствует о формировании антиангиогенного микроокружения для клеток церебрального эндотелия вследствие нарушения лактат-опосредованных биологических эффектов. Выявлено снижение

клеточного индекса в первые 10 часов ($p < 0,05$) в модели НВЕ/ГЭБ *in vitro* с последующей нормализацией этого показателя. В то же время предобработка эндотелия флоретином привела к увеличению пролиферативной активности клеток неэпителиальной природы.

В целом, ингибирование активности монокарбоксилатных транспортеров (МСТ1 и МСТ4), приводящее к нарушению транспорта лактата вызывает изменение функциональной компетентности клеток в модели НВЕ/ГЭБ *in vitro*. Обнаруженные нами эффекты характеризуют формирование антиангиогенного влияния клеток неэндотелиальной природы на клетки церебрального эндотелия в пределах НВЕ. Таким образом, монокарбоксилатные транспортеры (МСТ1 и МСТ4) можно обозначить как актуальные молекулы-мишени для разработки новых протоколов фармакотерапии заболеваний головного мозга.

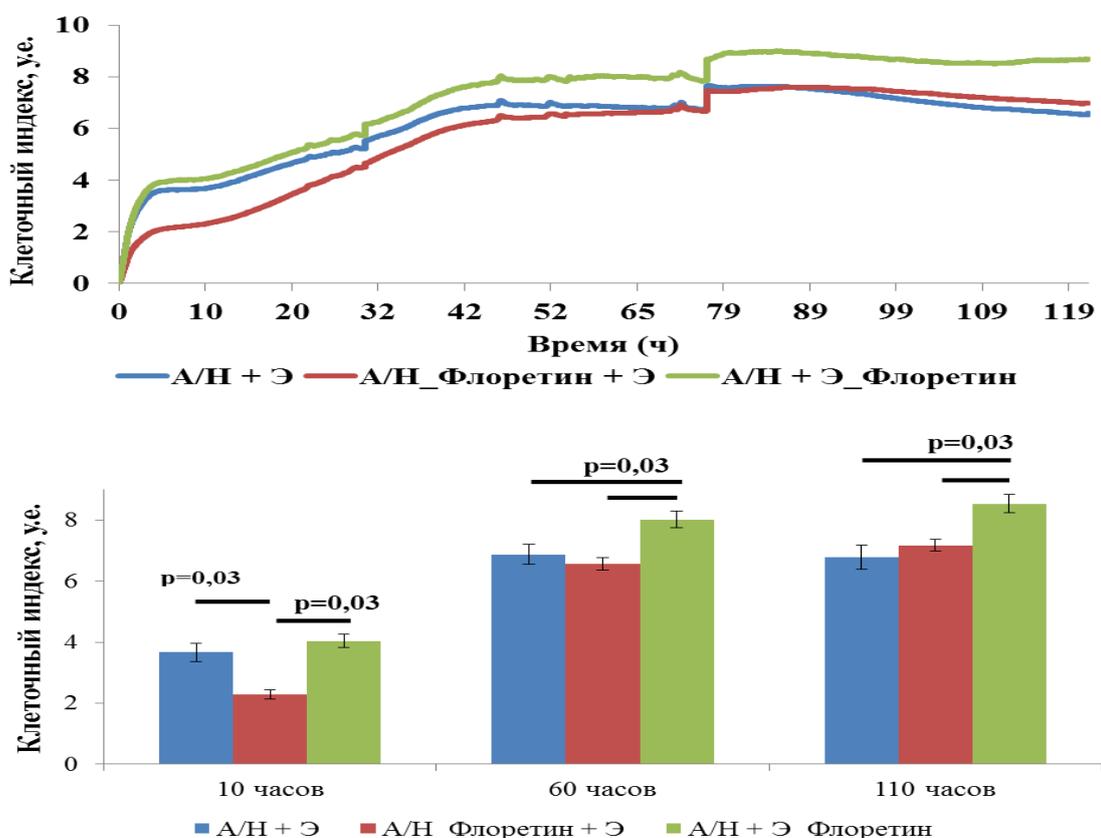


Рисунок 3 – Значения клеточного индекса (y.e.), определенные на клеточном анализаторе «xCelligence» (Roshe), для культуры астроцитов и нейронов в присутствии на вставках эндотелиоцитов в контрольной (A/N + Э) и экспериментальных (A/N_Флоретин + Э – прединкубированные астроциты и нейроны в присутствии флоретина (100мкМ, 24 часа); A/N + Э_Флоретин – прединкубированные эндотелиоциты в присутствии флоретина (100мкМ, 24 часа)) группах *in vitro*.

Клиническая характеристика антенатального и интранатального периодов у детей с церебральной ишемией

Наиболее часто встречающейся патологией беременности у матерей, детей, включенных в исследование, была анемия, которая зарегистрирована во всех исследуемых группах (легкой и средней степени). Однако чаще ($p < 0,05$)

анемический синдром диагностирован у женщин, дети которых составили 3 группу наблюдения (72,5%) - в 2,4 раза больше по сравнению с 1 (30%) и 2 группами (35%). У матерей, родивших детей с ЦИ 3 степени, статистически значимо чаще диагностировали хроническую фетоплацентарную недостаточность (45%) - в 4 раза чаще по сравнению с первой и в 2,5 раза по сравнению со второй группами, а также угрозу прерывания беременности в первой половине (40%) по сравнению с женщинами других групп ($p < 0,05$). Преждевременная отслойка плаценты, а также причины, приводящие к необходимости экстренного кесарева сечения статистически значимо чаще ($p = 0,04$) были зарегистрированы у женщин родивших детей с ЦИ 3 степени. Дородовое излитие околоплодных вод чаще встречалось при ЦИ 2 и ЦИ 3 ($p < 0,005$). У детей с ЦИ 2 и 3 степени оценка по шкале Апгар в конце первой минуты была статистически значимо ниже ($4,8 \pm 0,75$ и $4,1 \pm 2,1$ баллов, соответственно), чем в первой группе ($7,6 \pm 0,2$ баллов). В конце 5 минуты сохранялись особенности присутствующие в конце первой минуты: оценка по шкале Апгар в группах 2 ($6,18 \pm 0,75$ баллов) и 3 ($6,5 \pm 1,5$ баллов) осталась ниже, чем в группе 1 ($8,6 \pm 0,5$ баллов). Значимых различий между группами 2 и 3 не было выявлено ни в конце первой минуты, ни в конце пятой минуты. По сравнению с группой 1 необходимость проведения ИВЛ чаще требовалась детям из групп 2 (75%) и 3 (100%), без различий между собой ($p < 0,001$).

Особенности неврологической симптоматики и нейросонографических (НСГ) параметров у детей с церебральной ишемией

Анализ неврологической симптоматики у детей с ЦИ выявил следующие особенности (таблица 8).

Таблица 8 - Особенности неврологического статуса у детей с церебральной ишемией разной степени тяжести в ранний неонатальный период.

Клинические проявления	Ранний неонатальный период					
	1 группа (n=40)		2 группа (n=40)		3 группа (n=40)	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%
Нарушение сознания	0*	0	13	32,5	18	45
Судорожный синдром	0*	0	20	50	16	40
Арефлексия	0*	0	22	55	23	57,5
Гипорефлексия	4*	10	24	60	18	45
Гипотонус	3*	7,5	38	95	30	75
Гипертонус	7	17,5	4	10	7	17,5

Примечания: *- статистически значимые различия 1 группы со 2 и 3 группами ($p < 0,05$), критерий χ^2 .

В раннем неонатальном периоде установлены статистически значимые различия в размерах ликворопроводящих путей у детей с ЦИ 2 и 3 степени по сравнению с группой детей, у которых диагностирована церебральная ишемия 1 степени (таблица 9).

Таблица 9 - Значения основных НСГ признаков (ликворопроводящие пути) у детей с церебральной ишемией разной степени тяжести в ранний неонатальный период (мм, М±σ).

Показатель	1 группа (n=40)	2 группа (n=40)	3 группа (n=40)
	мм	мм	мм
Передние рога боковых желудочков	1,7±0,2*	2±0,3	2,1±1,1
Задние рога боковых желудочков	16±1,8*	20,1±1,6	19,4±1,3
Тело бокового желудочка	1,6±0,4*	2,9±1,3	2,9±0,6
III желудочек (ширина)	1,8±0,5	2,1±0,8	1,9±0,7
IV желудочек (глубина)	1,4±0,3*	1,9±0,3	2,1±0,3
Большая затылочная цистерна мозга	4,1±0,6	3,6±1,1	3,7±1,2
Субарахноидальное пространство	1,8±0,4*	1,2±0,2	1±0,4
Межполушарная щель	1,9±0,3	1,8±0,4	1,8±0,2

Примечания: * - статистически значимые различия указанной группы с другими группами (p<0,05), критерий Манна-Уитни.

Таким образом, данные НСГ позволили обозначить структуры мозга, наиболее вовлеченные в патологический процесс при ЦИ различной степени тяжести, при этом клиническая неврологическая симптоматика мало зависит от уровня и характера поражения, что подтверждает ограниченность эффективности этого исследования. Обнаруженные изменения могут являться следствием повреждения клеток НВЕ головного мозга, контролирующей продукцию и транспорт спинномозговой жидкости. Для проверки этой гипотезы мы оценили содержание маркерных белков нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов в периферической крови детей.

Содержание нейроспецифических белков, sPECAM-1, лактата и глутамата в сыворотке крови новорожденных детей с церебральной ишемией

Обнаружены особенности реагирования клеток НВЕ на ишемическое воздействие, выражающиеся в индивидуальном (для каждого вида клеток) характере высвобождения в кровь маркерных молекул. Дополнительно проведена оценка уровня глутамата в периферической крови детей, так как изменение его содержания отражает особенности межклеточного транспорта глутамата в клетках НВЕ (таблица 10).

Максимальная концентрация NSE в сыворотке крови сочетается с ЦИ 3 степени у детей с выраженной неврологической симптоматикой (нарушения сознания, судорожный синдром, арефлексия, гипорефлексия, нарушения мышечного тонуса), при необходимости проведения ИВЛ, а также при расширении ликворной системы и выраженном отеке головного мозга.

Повышение уровня GFAP отмечается при ЦИ любой тяжести. Максимальная концентрация наблюдается у пациентов с нарушением сознания, судорожным синдромом, при необходимости проведения ИВЛ, уменьшением размеров ликворной системы и выраженным отеком головного мозга.

Превышение нормальных значений уровня sPECAM-1 определяется у детей 2 и 3 группы при нарушении сознания, судорогах, гипертонусе,

гипорефлексии, в случаях расширения ликворопроводящих путей и выраженном отеке ГМ.

Таблица 10 - Уровни НСБ, sPECAM-1, концентрации лактата и глутамата у новорожденных с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС в ранний неонатальный период, (нг/мл, М±σ).

Группа		NSE (нг/мл)	GFAP (нг/мл)	sPECAM-1 (нг/мл)	Лактат (ммоль/л)	Глутамат (нг/мл)
1 группа (n=40)	М±σ	4,72±2,5	0,22±0,09	1,8±0,2	2,58±0,8	0,1±0,09*
	min-max	1,1-8,2	0,012-0,32	1,1-2,43	1,29-4,1	0,02 - 0,28
2 группа (n=40)	М±σ	6,52±2,3	0,68±0,28	5,7±1,7	24,6±12,5	4,2±2,2
	min-max	2,3-36	0,01 - 1,36	3,1-7,7	4,9-39,9	0,07 -8,45
3 группа (n=40)	М±σ	9,18±1,1*	0,451±0,22	9,8±2,2	50,9±12,1	4,5±2,6
	min-max	5,8-42,9	0,2-1,7	7,8-12,8	40,13-89,7	0,047-12,04
Уровень статистической значимости		p1,2=0,1 p1,3=0,001 p2,3=0,0001	p1,2=0,03 p1,3>0,05 p2,3=0,03	p1,2=0,001 p1,3=0,001 p2,3>0,05	p1,2=0,02 p1,3=0,01 p2,3<0,05	p1,2=0,001 p1,3=0,001 p2,3=0,0001

Примечания: p - уровень значимости между группам.

Максимальное содержание глутамата обнаружено у пациентов с ЦИ 3 степени, также высокий уровень - у детей с ЦИ 2. Повышенный уровень глутамата наблюдается при выраженной неврологической симптоматике (нарушение сознания, судорожный синдром, арефлексия, гипорефлексия, нарушения мышечного тонуса), при необходимости проведения ИВЛ, выраженном отеке головного мозга и изменении размеров ликворопроводящих путей.

Далее мы проанализировали зависимость активности маркеров поражения нейронов, астроцитов, эндотелиоцитов (NSE, GFAP, sPECAM-1) и уровня глутамата в сыворотке крови новорожденных детей от рассмотренных клинических признаков:

1. **Необходимость ИВЛ.** При этом содержание NSE (9,94±4,8 нг/мл), GFAP (1,73±0,2 нг/мл) было очень высоким и сопоставимым с концентрацией при нарушении сознания, и выше, чем в ситуациях проведения санации верхних дыхательных путей, и подачи кислорода через маску - NSE 6,18±4,5 нг/мл, GFAP 0,86±0,14 нг/мл. Концентрация sPECAM-1 (4,3±2,4 нг/мл) в три раза выше (p=0,001), чем в ситуациях подачи кислорода через маску (1,3±0,4 нг/мл). Концентрация лактата оказалась в четыре раза выше (p<0,05), а глутамата в семь раз выше (p<0,01), по сравнению с подачей кислорода через маску.

2. **При судорожном синдроме,** концентрация сывороточной NSE была в два раза выше нормы (9,69±5,2 нг/мл), GFAP - 0,93±0,12 нг/мл, sPECAM-1 максимально высокой (5,64±2,2 нг/мл), содержание лактата и глутамата (7,9±3,2 ммоль/л и 38,5±8,5 нг/мл соответственно).

3. **При нарушении сознания** уровень NSE превышал 75-перцентильное значение в 2,3 раза (10,06±3,3 нг/мл). Содержание sPECAM-1 превысило нормативные показатели - 5,2±2,0 нг/мл (p=0,001). Зарегистрирована

максимально высокая концентрации GFAP ($1,86 \pm 0,16$ нг/мл), лактата и глутамата ($8,8 \pm 2,2$ ммоль/л и $46,7 \pm 12,7$ нг/мл соответственно), ($p=0,03$).

4. Нарушения рефлекторной деятельности проявлялись ослаблением рефлексов или полным их отсутствием. При арефлексии концентрация NSE ($9,48 \pm 1,8$ нг/мл) оказалась сопоставима с концентрацией у пациентов с судорожным синдромом и выше, чем при гипорефлексии ($8,8 \pm 1,9$ нг/мл). Концентрации маркера астроглии ($0,55 \pm 0,22$ нг/мл), sPECAM-1 ($4,5 \pm 1,7$ нг/мл), лактата и глутамата ($8,1 \pm 1,8$ ммоль/л и $33,2 \pm 6,3$ нг/мл соответственно) превышали нормативные показатели ($p < 0,05$) и сопоставимы с арефлексией.

5. Особенности нейросонографических показателей: увеличение размеров передних и задних рогов, тел боковых желудочков, III и IV желудочков, субарахноидального пространства большой затылочной цистерны мозга и межполушарной щели сочетается с увеличением концентрации NSE, GFAP, sPECAM-1, лактата, глутамата. Эти значения статистически значимо превышали нормальные показатели и значения, зафиксированные в случаях, когда размеры были без изменений ($p < 0,05$). Самое высокое содержание NSE, sPECAM-1, лактата, глутамата зафиксировано в случаях увеличения размеров третьего желудочка ($p=0,01$).

В ходе анализа выраженности отека различных структур головного мозга и концентраций изучаемых маркеров повреждения клеток, образующих НВЕ и глутамата установлена прямая корреляционная связь между выраженностью отека ткани головного мозга и концентрацией нейронспецифической енолазы ($r=0,54-0,6$; $p < 0,05$), глиофибрилярного белка ($r=0,62-0,85$; $p < 0,05$), sPECAM-1 ($r=0,63-0,95$; $p < 0,05$), лактата ($r=0,8-0,9$; $p < 0,05$) и глутамата ($r=0,89-0,96$; $p < 0,05$). Поражение центральной нервной системы вследствие гипоксии-ишемии у новорожденных детей характеризуется индивидуальными (для каждого типа маркеров) изменениями концентраций маркеров нейронов и астроглии. Зафиксировано увеличение уровня NSE, глутамата и sPECAM-1 при увеличении размеров ликворопроводящих путей (NSE $r=0,53-0,82$, $p < 0,05$; sPECAM-1 $r=0,5-0,95$, $p < 0,05$; лактата $r=0,75-0,9$, $p < 0,05$; глутамата $r=0,75-0,95$, $p < 0,05$). В случае уменьшения размеров ликворопроводящих путей обнаружена корреляционная взаимосвязь ($r=0,5-0,68$; $p < 0,05$) с увеличением содержания глиального фибриллярного кислого белка в крови пациентов.

Обсуждение результатов

Одним из ведущих механизмов развития клеточного и субклеточного повреждения в пределах нейроваскулярной единицы, в результате гипоксии-ишемии, являются нарушения метаболического сопряжения и разобщение межклеточных взаимодействий. Нарушение этих механизмов может привести к нарушениям репаративных процессов и возникновению остаточных проявлений и осложнений. Межклеточная коммуникация и энергетическое сопряжение осуществляется различными белками-рецепторами (CD38), транспортерами (SLC1A5, EAAT2, Pgp, MCT1, MCT4, GLUT4), транспортными системами, коннексинами и транспортируемыми ими соединениями и молекулами (АДФ, АТФ, НАД⁺, лактат, глутамат, глутамин). Анатомическая

целостность и функциональная уникальность, в контексте избирательности проницаемости ГЭБ, обеспечивается эндотелиальными белками плотных контактов (JAM, ZO1, CLDN5).

В ходе экспериментального исследования мы обнаружили регион-специфический характер изменений состояния ГЭБ, которые развиваются при гипоксически-ишемическом повреждении (рисунок 4). Миндалевидное тело и гиппокамп являются отделами мозга, демонстрирующими высокую степень чувствительности к действию факторов, нарушающих процессы барьерогенеза, и могут быть использованы для анализа молекулярных механизмов развития и повреждения ГЭБ. Одновременно это объясняет характер неврологических нарушений, регистрируемых нами при экспериментальном перинатальном гипоксическом повреждении головного мозга.

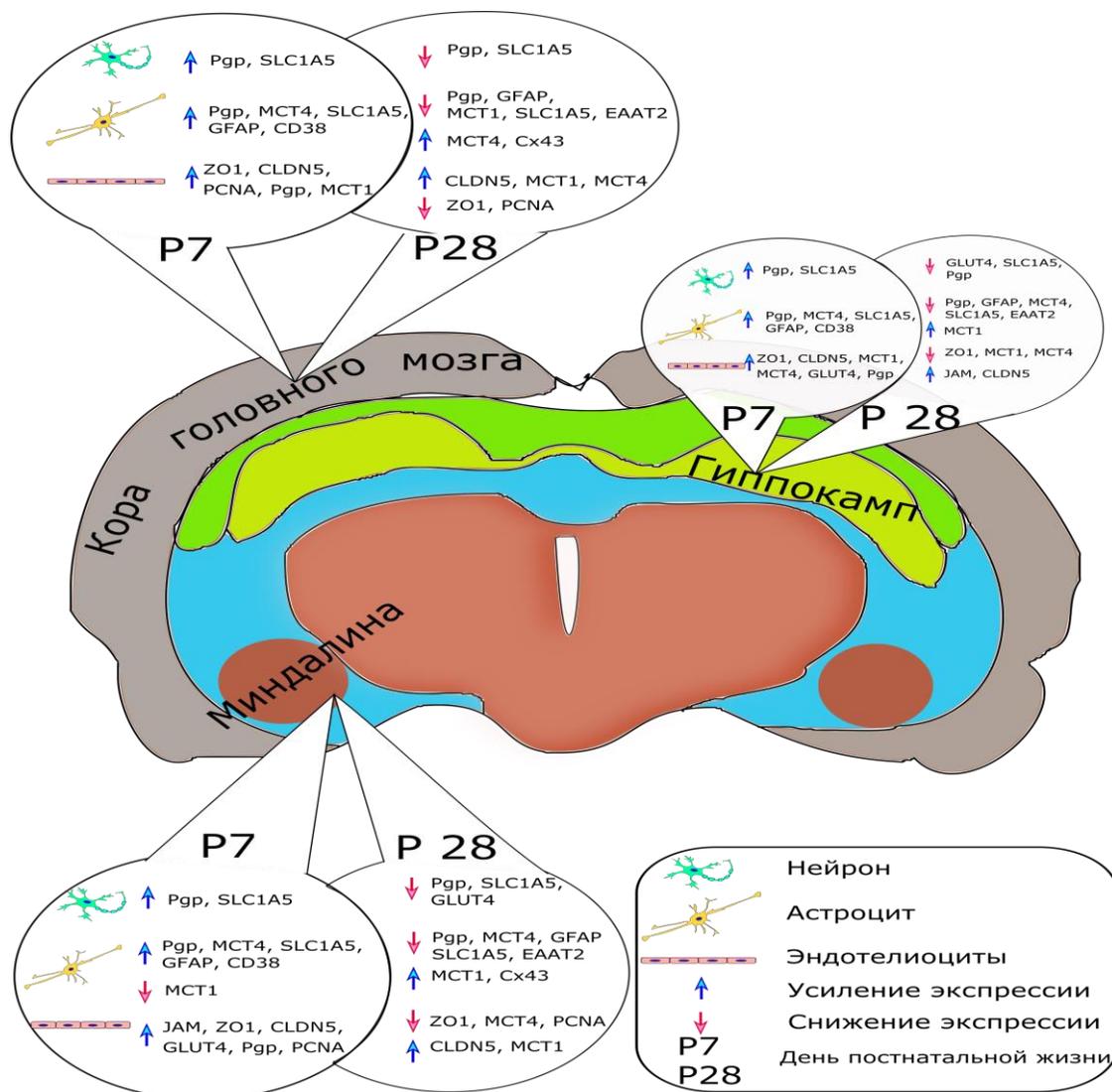


Рисунок 4 – Регион-специфичные и клеточно-специфичные изменения экспрессии целевых молекул клетками НВЕ после гипоксически-ишемического повреждения развивающегося головного мозга.

Учитывая обнаруженные изменения и механизмы межклеточных взаимодействий и особенности энергетического сопряжения в пределах НВЕ большое значение имеет перспектива того, что транспортные системы

глутамата и глутамина можно обозначить мишенью для терапевтического воздействия при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении. Мы предлагаем следующую схему межклеточной коммуникации и метаболического сопряжения в нейроваскулярной единице: в физиологических условиях нейрон-глиальное соотношение, которое характеризует количество астроцитарных клеток, функционально взаимосвязанных с нейроном, составляет 1:2-1:3. В условиях возникающей гипоксии-ишемии и недостаточности субстратов наблюдается изменение нейрон-глиального соотношения, развивается астроглиоз. При этом часть клеток астроглии обеспечивает процессы репаративного нейрогенеза. В этом случае происходит увеличение экспрессии молекул CD38 и Cx43 (обеспечивают функциональную активность астроглиального синцития и контроль пуринаргических механизмов регуляции активности клеток, транспорт, утилизацию и метаболизм НАД⁺, который высвобождается при разрушении клеток), SLC1A5 и EAAT2 (регулируют обмен глутамина/глутамата, снижают эффект эксайтотоксичности, обеспечивают метаболические потребности делящихся клеток). В это же время меняется нейрональная экспрессия молекул CD38, SLC1A5, Pgr. Эндотелиальные клетки изменяют экспрессию Р-гликопротеина и коннексина-43, что приведет к изменению транспорта гидрофобных субстратов, лактата и НАД⁺ в пределах НВЕ/ГЭБ. В качестве компенсаторных событий выступают механизмы пролиферации клеток церебрального эндотелия и стимуляции ангиогенеза (вероятнее всего, лактат-регулируемого). Однако сопутствующее нарушение экспрессии белков плотных контактов в церебральном эндотелии имеет своим результатом изменение целостности ГЭБ и повышение проницаемости барьера. Вместе с тем, зарегистрированное снижение уровня лактата в НВЕ в раннем периоде ГИП, сопровождающееся увеличением экспрессии МСТ4, может усугублять явления энергетического дефицита в сопряженных клетках, которые могли бы в физиологических условиях утилизировать лактат в качестве альтернативного источника энергии. Как следствие, развивается неврологический дефицит, степень выраженности которого соответствует характеру повреждения клеток НВЕ/ГЭБ (P7). И напротив, редуцирование неврологической дисфункции и восстановление неврологического статуса (P28) соответствует нормализации проницаемости ГЭБ у животных опытной группы (рисунок 5).

Полученные результаты экспериментального исследования находят подтверждение в клинической части работы. Так, ведущими симптомокомплексами в раннем неонатальном периоде у детей со второй и третьей степенью тяжести церебральной ишемии являются: гипотонус, гипо- и арефлексия, нарушение сознания и судороги, изменение размеров ликворопроводящих путей и отек головного мозга, что является следствием повреждения клеток ЦНС. Это сопровождается выраженными изменениями уровней молекул, маркирующих повреждение клеток нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы, а также лактата и глутамата в сыворотке крови. Сочетание выраженного отека ГМ в ранний неонатальный

период и отсутствие положительной динамики у пациентов с тяжелым перинатальным ГИП ЦНС могут свидетельствовать о глубоком и распространенном повреждении клеток ЦНС, избыточной ликворопродукции и начальных проявлениях атрофии вещества мозга уже в раннем неонатальном периоде, что и объясняет более низкую эффективность терапевтических мероприятий и неблагоприятные исходы и последствия.

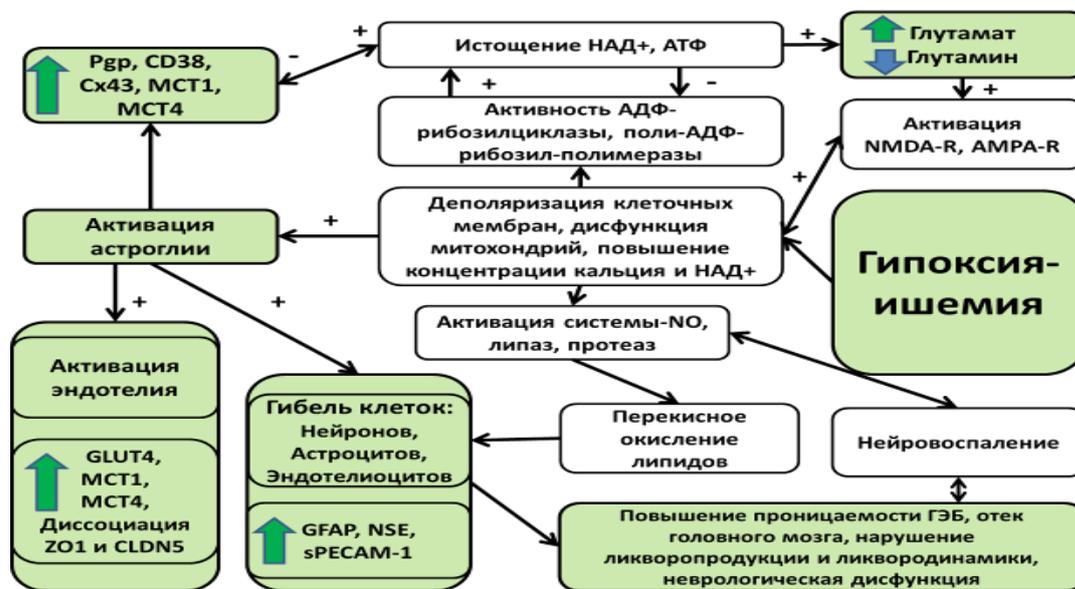


Рисунок 5 – Ключевые механизмы повреждения НВЕ при гипоксически-ишемическом поражении развивающегося головного мозга («+» - стимулирующее влияние, «-» - ингибирующее влияние), цветом выделены собственные данные.

Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о повышении концентрации НСБ и sPECAM-1 при церебральной ишемии 2 и 3 степени, при тяжелой клинической симптоматике (арефлексия, гипорефлексия, судорожный синдром, нарушение сознания), а также нарушении размеров ликворопроводящих путей, выраженном отеке коры головного мозга и подкорковых структур. Выявленные изменения концентрации нейронспецифической енолазы, с учетом клинической симптоматики (нарушения сознания и судороги) обуславливают диагностическую значимость указанного маркера, который отражает повреждение нейронов. Увеличение концентрации GFAP является маркером тяжести гипоксического поражения подкорковых структур головного мозга, выраженность отека, соответствует выраженной неврологической симптоматике (судороги и нарушение сознания) и является неблагоприятным прогностическим маркером. Молекула sPECAM-1 является маркером повреждения и дисфункции эндотелиоцитов. Повышение уровня sPECAM-1 имеет прямую корреляционную связь с выраженностью повреждения эндотелиоцитов сосудов головного мозга и является маркером их дисфункции, что характерно для повышенной проницаемости ГЭБ и объясняет появление в крови забарьерных нейроспецифических белков.

Таким образом, три маркера повреждения клеток НВЕ (NSE, GFAP, sPECAM-1) в периферической крови «сигнализируют» о развитии ситуаций, требующих проведения ИВЛ, при наличии судорог и нарушении рефлекторной деятельности, что можно использовать как прогностические критерии при ведении пациентов с перинатальным гипоксически-ишемическим поражением ЦНС.

Анализируя полученные в ходе исследования данные об основных событиях в межклеточной коммуникации НВЕ, мы предполагаем участие следующих механизмов в регуляции ответа на гипоксическое повреждение клеток нейроваскулярной единицы (рисунок 6):

1) гипоксия является триггером активации астроцитов за счет секреции глутамата нейронами, многократного усиления экспрессии коннексина-43 и функционально сопряженной молекулы CD38 на поверхности астроцитов, нарушения экспрессии белков плотных контактов в церебральных эндотелиоцитах;

2) изменение экспрессии транспортеров приводит к aberrantной секреции молекул, координирующих процессы нейрон-глиального метаболического сопряжения и ангиогенеза (глутамат, лактат);

3) развивающаяся патологическая проницаемость ГЭБ (в частности, в чувствительных к гипоксии регионах головного мозга – миндалевидном теле и гиппокампе) приводит к нарушению ликвородинамики и способствует проявлениям неврологического дефицита;

4) явления репаративного ангиогенеза/барьерогенеза индуцируются за счет изменения локальной продукции и транспорта лактата.

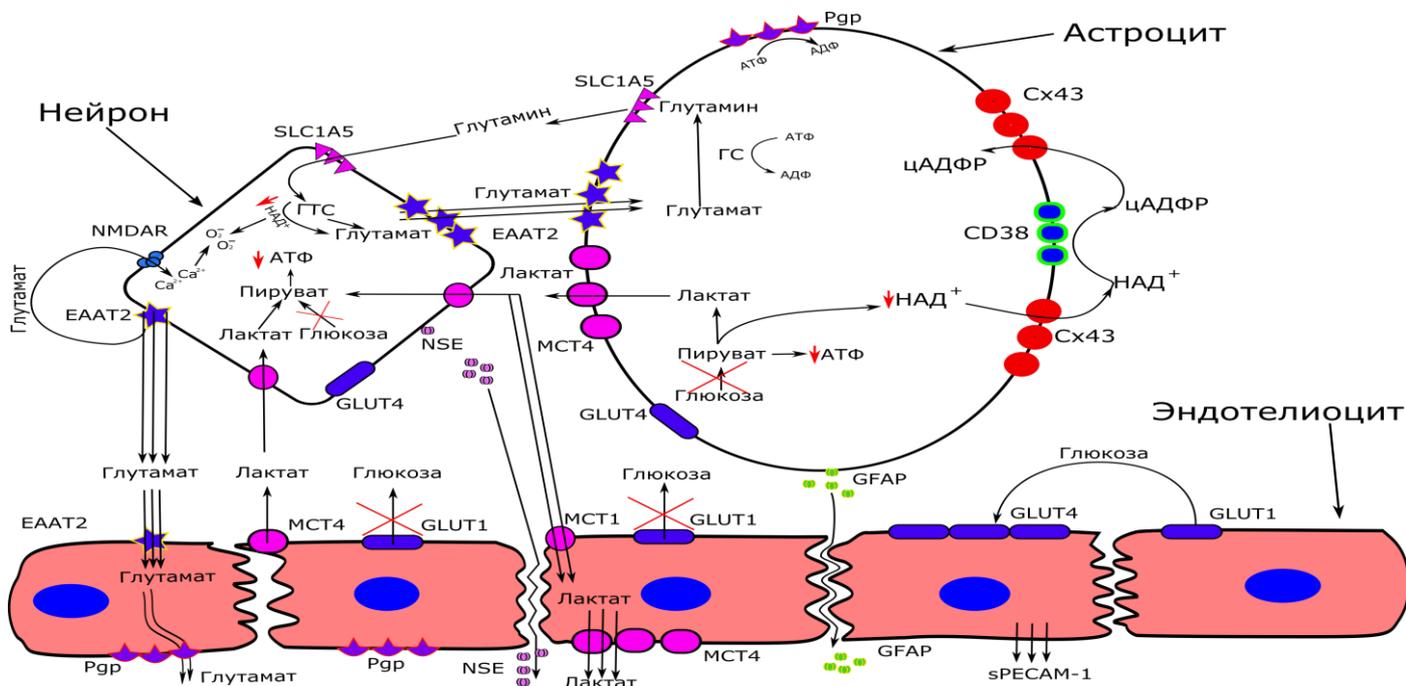


Рисунок 6 - Нарушение межклеточных взаимодействий в пределах НВЕ при гипоксически-ишемическом повреждении развивающегося мозга.

ВЫВОДЫ

1. Гипоксически-ишемическое повреждение ЦНС вызывает регион-специфические особенности реакции клеток НВЕ и приводит к изменению количества клеток, экспрессирующих транспортер глюкозы (GLUT4) и монокарбоксилатные транспортеры (MCT1 и MCT4): к 28 суткам жизни снижается количество нейронов экспрессирующих GLUT4 в области гиппокампа, коры и миндалина; астроциты характеризуются разнонаправленными изменениями экспрессии MCT1 - через 8 часов происходит резкое увеличение количества в коре, со снижением в области миндалина и усилением экспрессии в гиппокампе и коре к 28 суткам жизни, с одновременным увеличением числа MCT4-иммунопозитивных клеток в области гиппокампа, коры и миндалина с последующим уменьшением к 28 суткам жизни; эндотелиоциты реагируют увеличением экспрессии GLUT4 в 1,5-2 раза в области гиппокампа и миндалина с первых часов после гипоксически-ишемического воздействия, что сохраняется до 28 суток жизни и увеличением экспрессии MCT1; MCT4 в области гиппокампа, в коре и миндалине увеличивается только экспрессия MCT1 в 2-3 раза к 28 суткам жизни животных.

2. В динамике раннего постнатального периода относительное количество астроцитов, экспрессирующих НАД⁺-гликогидролазу/CD38, но не Sx43, прогрессивно уменьшается. У экспериментальных животных в течение 72 часов после перенесенного перинатального гипоксически-ишемического повреждения головного мозга происходит изменение экспрессии CD38 и Sx43, в основном, в клетках астроглиальной природы, что характеризует процессы активации астроцитов, изменение метаболизма НАД⁺, аналогичные изменения характерны для эффектов острой гипоксии в оригинальной модели НВЕ *in vitro*. Наиболее выраженные изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера при перинатальном гипоксически-ишемическом повреждении ЦНС происходят в области гиппокампа и миндалина, что связано с дисбалансом экспрессии белков плотных контактов CLDN5 и ZO1.

3. Моделирование гипоксически-ишемического повреждения ЦНС у экспериментальных животных вызывает развитие неврологической дисфункции и поведенческих реакций в виде альтерации двигательной и рефлекторной деятельности в первые часы после поражения, что соответствует нарушению структуры тесных контактов клеток эндотелия, изменениям транспорта глюкозы, продукции и транспорта лактата, индуцированных повреждением головного мозга, с последующим восстановлением моторной, сенсорной и двигательной активности в течение нескольких дней и вплоть до 28 суток жизни, когда зафиксировано полное восстановление неврологических, а также когнитивных функции, но с сохранением повышенной тревожности, что соответствует периоду репаративного ангиогенеза.

4. Разработанная и созданная новая модель нейроваскулярной единицы головного мозга, гематоэнцефалического барьера *in vitro* позволила оценить

особенности межклеточных взаимодействий в норме и моделировании гипоксического повреждения *in vitro*, выявить индивидуальный (для каждого вида клеток) характер реакции на патологическое воздействие: астроциты НВЕ характеризуются высоким уровнем экспрессии Сх43 и транспортеров глутамата ЕААТ2 на фоне низкого уровня экспрессии НАД⁺-гликогидролазы/CD38 и транспортера глутамин SLC1A5; пребывание в условиях гипоксии индуцирует в астроцитах НВЕ значительное увеличение экспрессии Сх43, CD38, SLC1A5 в 2-15 раз, но снижение экспрессии ЕААТ2 в 1,5 раза; нейроны, входящие в состав клеточной модели НВЕ *in vitro*, демонстрируют высокий уровень экспрессии CD38, но низкий уровень экспрессии Сх43 и SLC1A5; пребывание в условиях гипоксии индуцирует в нейронах НВЕ уменьшение экспрессии CD38 в 15 раз и увеличение экспрессии SLC1A5 в пять раз; эндотелиоциты НВЕ характеризуются стабильным уровнем экспрессии Сх43, который практически не меняется при действии гипоксии *in vitro*; подавление активности Сх43 карбенксолоном вызывает снижение экспрессии CD38, Сх43, SLC1A5 в нейронах, контактирующих с астроцитами, а также снижение экспрессии CD38, Сх43 и ЕААТ2 в астроцитах НВЕ.

5. Блокирование функции Сх43 *in vitro* проявляется в снижении экспрессии Сх43 и CD38 на всех клетках НВЕ, транспортера глутамин на нейронах, транспортера глутамата на астроцитах в физиологических условиях, а в условиях гипоксии вызывает угнетение экспрессии Сх43 и CD38 и предотвращает увеличение глутаминовых и глутаматных транспортеров при гипоксии, что приводит к разобщению межклеточной коммуникации и метаболического сопряжения клеток НВЕ.

6. К наиболее значимым особенностям антенатального анамнеза, причастным к формированию перинатального поражения мозга гипоксического генеза, отнесены анемический синдром во время беременности и хроническая фетоплацентарная недостаточность, которые являются управляемыми факторами развития внутриутробной гипоксии; в раннем неонатальном периоде прогностически наиболее неблагоприятными клиническими проявлениями поражения ЦНС следует считать мышечную гипотонию, гипо- и арефлексию, а также нарушение сознания и судороги. Изменения, наблюдаемые при перинатальном гипоксически-ишемическом повреждении головного мозга, сопровождаются изменением структурной и функциональной целостности ГЭБ и появлением в крови нейроспецифичных белков (NSE, GFAP), sPECAM-1, повышением уровня глутамата и свидетельствуют о нарушении межклеточных взаимодействий. Вызванные гипоксией изменения экспрессии CD38, Сх43, Pgr, SLC1A5 в клетках-компонентах НВЕ определяют характер нарушения механизмов нейрон-астроглиального метаболического сопряжения, структурно-функциональной целостности ГЭБ, повреждения клеток и реактивного астроглиоза в развивающемся головном мозге.

7. Гипоксически-ишемическое поражение ЦНС новорожденных разной степени тяжести характеризуется разнонаправленными изменениями уровней

маркеров повреждения клеток нейрональной, астроглиальной природы и эндотелиальной дисфункции: наиболее высокие концентрации NSE, sPECAM-1 и глутамата в сыворотке крови зарегистрированы у детей с ЦИ 3 степени, а также на фоне выраженной неврологической симптоматики (нарушения сознания, судорожный синдром, арефлексия, гипорефлексия, нарушения мышечного тонуса) и значительных структурных изменениях ЦНС (расширение ликворной системы, выраженный отек коры головного мозга); повышение GFAP сопутствует ЦИ любой степени тяжести с максимально высокими концентрациями на фоне тяжелых неврологических нарушений (нарушение сознания, судорожный синдром, необходимость ИВЛ) и сочетается с уменьшением размеров ликворной системы и выраженным отеком головного мозга.

8. По данным нейросонографического исследования, при церебральной ишемии 2 и 3 степени значимыми структурными изменениями ЦНС являются умеренно-выраженные отечные изменения в корковых, подкорковых структурах и перивентрикулярных отделах; при этом церебральная ишемия 3 степени характеризуется увеличением доли пациентов с расширением размеров боковых и IV желудочков и сужением субарахноидального пространства с выраженным отеком коры и ПВП в раннем неонатальном периоде, а также нарастанием числа новорожденных, имеющих выраженные отечные изменения корковых структур, в позднем неонатальном периоде.

9. Гипоксическое поражение ЦНС у новорожденных сопровождается повреждением клеток нейроваскулярной единицы с резким увеличением концентрации нейроспецифических белков (NSE, GFAP), sPECAM-1 и глутамата в периферической крови, что коррелирует с клиническими особенностями патологии (необходимость ИВЛ, наличие судорог, нарушения сознания, нейромышечные расстройства) и отражает последующие структурные изменения головного мозга; отеку головного мозга сопутствует увеличение содержания в сыворотке крови всех изучаемых маркеров повреждения НВЕ ($r=0,5-0,95$), расширение ликворопроводящих путей сопровождается преимущественным увеличением уровней нейронспецифической енолазы ($r=0,53-0,82$), sPECAM-1 ($r=0,5-0,95$) и глутамата ($r=0,75-0,95$), а сужение желудочковой системы коррелирует с повышением уровня глиального фибриллярного кислого белка ($r=0,5-0,68$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Изменения маркеров повреждения нейронов и астроцитов, а также уровня глутамата в сыворотке периферической крови новорожденных детей рекомендуется применять в качестве дополнительного диагностического критерия для верификации гипоксически-ишемического поражения ЦНС, а также определения степени тяжести.

2. Определение уровня sPECAM-1 в сыворотке периферической крови новорожденных детей предлагается использовать как прогностический

показатель развития тяжелого состояния (выраженного отека головного мозга, нарушений сознания, судорог, гипертонуса, гипорефлексии, расширения ликворной системы).

3. Направленная модуляция экспрессии и активности Р-гликопротеина может быть рекомендована для управляемой нейропротекции и доставки лекарственных веществ в очаг поражения.

4. Направленная модуляция экспрессии и активности Сх43 может быть полезна для разработки новой стратегии терапии перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС.

5. Транспортные молекулы нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов участвуют в механизмах развития гипоксического повреждения НВЕ и могут рассматриваться в качестве молекул-мишеней для фармакологической коррекции перинатального гипоксически-ишемического поражения головного мозга.

6. Трехклеточная модель НВЕ и ГЭБ *in vitro* может использоваться для изучения молекулярно-клеточных особенностей межклеточных взаимодействий в пато(физио)логических условиях, а также для доклинических исследований новых препаратов с нейротропной активностью.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК на соискание ученой степени доктора наук

1. Диагностическое значение изменений содержания глутамата в сыворотке крови у детей с перинатальной гипоксически-ишемической энцефалопатией / **А.В. Моргун**, Е.Д. Хилажева, Е.Б. Бойцова, Т.Е. Таранушенко, Н.В. Кувачева, А.Б. Салмина // **Российский педиатрический журнал**. - 2016. - Т.6. - №19. - С.351-355.
2. Модуляция продукции, транспорта и рецепции лактата клетками нейроваскулярной единицы головного мозга *in vitro* / Е.Д. Хилажева, **А.В. Моргун**, Н.В. Кувачева, Е.Б. Бойцова, Н.А. Малиновская, Е.А. Пожиленкова, А.Б. Салмина // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. - 2016. - №12. - С.1-5.
3. Перинатальное повреждение головного мозга сопровождается нарушением экспрессии белков суперсемейства SLC в клетках эндотелия микрососудов гиппокампа / **А.В. Моргун**, Н.В. Кувачева, Е.Д. Хилажева, Е.А. Пожиленкова, Я.В. Горина, Н.А. Малиновская, Ю.К. Комлева, О.Л. Лопатина, Ю.А. Панина, Э.Д. Гасымлы, А.Б. Салмина // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. - 2016. - Т.161. - №6. - С.723-727.
4. Нарушения сложных форм поведения у животных, перенесших перинатальную гипоксию и стресс раннего периода жизни / Н.А. Малиновская, Ю.А. Успенская, Ю.А. Панина, В.В. Волкова, Р.В. Рябоконь, Н.В. Кувачева, **А.В. Моргун**, А.Б. Салмина // **Неврологический вестник. Журнал им. В.М.Бехтерева**. - 2015. - Т.47. - №4. - С.40-47.
5. Перинатальное поражение центральной нервной системы: повреждение и возможности восстановления гематоэнцефалического барьера / **А.В. Моргун**, Н.В. Кувачева, Е.Д. Хилажева, Я.В. Горина, Т.Е. Таранушенко Е.А. , Пожиленкова, А.Б. Салмина // **Вопросы практической педиатрии**. - 2015. - №4. - С.29-37.
6. Экспрессия белков-транспортёров глутамата и глутамина в клетках нейроваскулярной единицы *in vitro* / **А.В. Моргун**, Н.В. Кувачева, Е.Д. Хилажева, Т.Е. Таранушенко, А.Б. Салмина // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. - 2015. - №5. - С.569-572.

7. Изучение метаболического сопряжения и межклеточных взаимодействий на модели нейроваскулярной единицы *in vitro* / **А.В. Моргун**, Н.В. Кувачева, Е.Д. Хилажева, Е.А. Пожиленкова, А.Б. Салмина // **Сибирское медицинское обозрение**. - 2015. - Т.91. - №1. - С.28-31.
8. Особенности экспрессии коннексинов клетками нейроваскулярной единицы в норме и при гипоксии в условиях эксперимента / **А.В. Моргун**, Н.В. Кувачева, Е.Д. Хилажева, Т.Е. Таранушенко, А.Б. Салмина // **Бюллетень сибирской медицины**. - 2014. - №6. - С.1-5.
9. Способ экспериментального моделирования перинатального гипоксически-ишемического поражения головного мозга *in vivo* / **А.В. Моргун**, Н.В. Кувачева, Т.Е. Таранушенко, Е.Д. Хилажева, С.И. Устинова, А.Б. Салмина // **Вопросы современной педиатрии**. - 2014. - Т.13. - №5. - С.31-36.
10. Коннексиновые и паннексиновые транспортные системы в клетках нейроваскулярной единицы головного мозга / А.Б. Салмина, Н.А. Малиновская, Н.В. Кувачева, **А.В. Моргун**, Е.Д. Хилажева, Я.В. Горина, Е.А. Пожиленкова, О.В. Фролова // **Нейрохимия=Neurochemical Journal**. - 2014. - Т.31. - №2. - С.122-133.
11. Экспрессия Pgp в клетках нейроваскулярной единицы при перинатальном гипоксически-ишемическом повреждении головного мозга / **А.В. Моргун**, Т.Е. Таранушенко, Н.А. Малиновская, О.С. Окунева, С.И. Устинова, Л.Н. Карпова, А.Б. Салмина, Е.А. Пожиленкова, Д.И. Лалетин, О.В. Фролова, Н.В. Реушева, Л.В. Труфанова // **Анналы клинической и экспериментальной неврологии**. - 2014. - Т.8. - №1. - С.40-43.
12. Проницаемость гематоэнцефалического барьера в норме, при нарушении развития головного мозга и нейродегенерации / Н. В. Кувачева, А. Б. Салмина, Ю. К. Комлева, Н. А. Малиновская, **А. В. Моргун**, Е. А. Пожиленкова, Г. С. Замай, Н. А. Язуина, М. М. Петрова // **Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова**. - 2013. - Т. 113, № 4. - С. 80-85.
13. Межклеточные взаимодействия в развивающемся гематоэнцефалическом барьере / А. Б. Салмина, **А. В. Моргун**, Н. В. Кувачева, Ю. К. Комлева, Е. А. Пожиленкова, И. А. Кутищева, Л. В. Труфанова, Т. Е. Таранушенко, Г. П. Мартынова // **Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского**. - 2013. - Т. 92, № 2. - С. 155-159.
14. Маркеры апоптоза и нейроспецифические белки в диагностике перинатальных поражений центральной нервной системы у новорожденных детей / **А. В. Моргун**, Н. В. Овчаренко, Т. Е. Таранушенко, С. И. Устинова, О. С. Окунева, С. К. Антонова, Д. Ф. Гилязова, О. А. Успенская, А. Б. Салмина // **Сибирское медицинское обозрение**. - 2013. - № 3. - С.3-10.
15. Современные представления о патогенезе перинатального ишемического повреждения клеток нейроваскулярной единицы головного мозга: молекулы-мишени для нейропротекции / **А. В. Моргун**, Н. В. Кувачева, Т. Е. Таранушенко, Е. Д. Хилажева, Н. А. Малиновская, Я. В. Горина, Е. А. Пожиленкова, О. В. Фролова, А. Б. Салмина // **Вестник РАМН**. - 2013. - № 12. - С. 26-35.
16. Молекулярные механизмы нарушения развития мозга в пре- и неонатальном периоде / А. Б. Салмина, Ю. К. Комлева, Н. В. Кувачева, О. Л. Лопатина, А. И. Инжутова, С. М. Черепанов, Н. А. Язуина, Г. А. Морозова, Н. А. Малиновская, Е. А. Пожиленкова, **А. В. Моргун**, Т. Е. Таранушенко, М. М. Петрова // **Вопросы современной педиатрии**. - 2012. - Т. 11, № 6. - С. 15-20.
17. НАД⁺-конвертирующие ферменты в клетках нейрональной и глиальной природы: CD38 как новая молекула-мишень для нейропротекции / А. Б. Салмина, А. И. Инжутова, **А. В. Моргун**, О. С. Окунева, Н. А. Малиновская, О. Л. Лопатина, М. М. Петрова, Т. Е. Таранушенко, А. А. Фурсов, Н. В. Кувачева // **Вестник РАМН**. - 2012. - № 10. - С. 29-37.
18. Моргун, А. В. Основные функции гематоэнцефалического барьера / **А. В. Моргун** // **Сибирский медицинский журнал (г. Иркутск)**. - 2012. - Т. 109, № 2. - С. 5-8.
19. Модели гематоэнцефалического барьера *in vitro*: современное состояние проблемы и перспективы / **А. В. Моргун**, Н. В. Кувачева, Ю. К. Комлева, Е. А. Пожиленкова, И. А.

- Кутищева, Е. С. Гагарина, Т. Е. Таранушенко, А. В. Озерская, О. С. Окунева, А. Б. Салмина // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. - 2012. - Т. 6, № 4. - С. 42-50.
20. Клинико-метаболические особенности церебральной ишемии у доношенных новорожденных с анемией / Л. Н. Карпова, Т. Е. Таранушенко, А. Б. Салмина, С. И. Устинова, **А. В. Моргу** // *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. - 2011. - Т. 90, № 1. - С. 23-29.
21. Перинатальное гипоксически-ишемическое поражение головного мозга вызывает нарушение глутаматергической сигнальной трансдукции, сопряженной с активностью АДФ-рибозилциклазы в нейронах / А. Б. Салмина, О. С. Окунева, С. В. Михуткина, Н. А. Малиновская, **А. В. Моргу**, Л. Д. Зыкова, Г. В. Юдин, Д. И. Лалетин, М. А. Фурсов, О. В. Фролова, Г. А. Тагаева, Е. В. Большакова // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. - 2010. - Т. 150, № 11. - С. 512-516.
22. Уровни белков нейрональной и глиальной природы в крови новорожденных при церебральной ишемии / Т. Е. Таранушенко, О. С. Окунева, И. М. Демьянова, А. Б. Салмина, Н. А. Малиновская, Л. А. Шароглазова, И. А. Критская, **А. В. Моргу** // *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. - 2010. - Т. 89, № 1. - С. 25-30.
23. Изменение экспрессии и активности CD38 в клетках астроглиальной природы при нарушениях нейрон-глиальных взаимодействий при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении головного мозга / А. Б. Салмина, О. С. Окунева, Н. А. Малиновская, Л. Д. Зыкова, А. А. Фурсов, **А. В. Моргу**, С. В. Михуткина, Т. Е. Таранушенко // *Нейрохимия*. - 2009. - Т. 26, № 3. - С. 237-244.
24. НАД⁺-зависимые механизмы нарушения жизнеспособности клеток головного мозга в остром периоде гипоксически-ишемического перинатального поражения / А. Б. Салмина, О. С. Окунева, Н. А. Малиновская, Т. Е. Таранушенко, **А. В. Моргу**, Н. С. Манторова, С. В. Михуткина // *Нейрохимия*. - 2008. - Т. 25, № 3. - С. 247-254.
25. Перинатальное гипоксически-ишемическое поражение центральной нервной системы вызывает изменение экспрессии коннексина 43, CD38 и активности АДФ-рибозилциклазы в клетках головного мозга / А. Б. Салмина, Н. А. Малиновская, О. С. Окунева, Т. Е. Таранушенко, А. А. Фурсов, С. В. Михуткина, **А. В. Моргу**, С. В. Прокопенко, Л. Д. Зыкова // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. - 2008. - Т. 146, № 12. - С. 641-645.
26. Маркеры повреждения нейронов и астроцитов в плазме крови новорожденных при церебральной ишемии разной степени тяжести / И. М. Демьянова, Т. Е. Таранушенко, А. Б. Салмина, О. С. Окунева, **А. В. Моргу**, Н. А. Малиновская, Г. А. Тагаева, Л. А. Шароглазова, И. А. Крицкая // *Сибирское медицинское обозрение*. - 2008. - Т. 50, № 2. - С. 27-31.

Методические рекомендации

27. Особенности анемического синдрома у новорожденных с церебральной ишемией: методические рекомендации / Т.Е. Таранушенко, А.Б. Салмина, Л.Н. Карпова, С.И. Устинова, Н.Г. Киселева, **А.В. Моргу**. - Красноярск : КМИАЦ, 2010. - 35 с.
28. Результаты морфологического и гистологического исследования плацент в прогнозировании тяжести патологии у новорожденных, перенесших внутриутробную гипоксию: методические рекомендации / Т.Е. Таранушенко, А.Б. Салмина, Л.Н. Карпова С.И., Устинова, Н.Г. Киселева, **А.В. Моргу**. - Красноярск : КМИАЦ, 2010. - 13 с.

Монографии

29. Повреждение гематоэнцефалического барьера в развивающемся мозге: фундаментальные механизмы и клинические приложения : монография / **А.В. Моргу**, Т.Е. Таранушенко, Е.А. Пожиленкова, Н.В. Кувачева, Е.Д. Хилажева, Е.Б. Бойцова, Салмина А.Б. - Красноярский медицинский университет. - Красноярск : Версо, 2016. - 169 с.

30. Технологии изучения и моделирования гематоэнцефалического барьера / **А.В. Моргу****н**, Н.В. Кувачева, Е.Д. Хилажева, Е.А. Пожиленкова, Т.Е. Таранушенко, Н.Н. Медведева, А.Б. Салмина // Неврология XXI века: диагностические, лечебные и исследовательские технологии: Руководство для врачей. В 3-х томах. Под ред. М.А. Пирадова, С.Н. Иллариошкина, М.М. Танамян. Т. III, С. 134-166. - Москва, АТМО. - 2015. - 376 с.

Статьи в международных журналах

31. Gliotransmitters and cytokines in the control of blood-brain barrier permeability / E.D. Osipova, O.V. Semyachkina-Glushkovskaya, **А.В. Моргу****н**, N.V. Pisareva, N.A. Malinovskaya, E.B. Boytsova, E.A. Pozhilenkova, O.A. Belova, V.V. Salmin, T.E. Taranushenko, M. Noda, A.B. Salmina // Reviews in the Neurosciences. - 2017. - P.1-10.

32. Glial dysfunction and blood-brain barrier impairment in the developing brain / A.B. Salmina, E.A. Pozhilenkova, **А.В. Моргу****н**, N.V. Kuvacheva, A.N. Shuvaev, O.L. Lopatina, E.B. Boytsova, T.E. Taranushenko // Advances in Neuroimmune Biology. - 2016. - №2. - P.1-14.

33. Glycolysis-mediated control of blood-brain barrier development and function / A.B. Salmina, N.V. Kuvacheva, **А.В. Моргу****н**, Y.K. Komleva, E.A. Pozhilenkova, O.L. Lopatina, Y.V. Gorina, T.E. Taranushenko, L.L. Petrova // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. - 2015. - №64. - P.174-184.

34. Establishment of neurogenic microenvironment in the neurovascular unit: the connexin 43 story / A. B. Salmina, A. V. Morgun, N. V. Kuvacheva, O. L. Lopatina, Y. K. Komleva, N. A. Malinovskaya, E.A. Pozhilenkova // Reviews in the Neurosciences. - 2014. - V. 25, № 1. - P. 97-111.

Публикации в других изданиях.

35. Биотехнологические решения в моделировании гематоэнцефалического барьера in vitro / **А.В. Моргу****н**, Е.Д. Хилажева, Е.Б. Бойцова, Н.В. Писарева, В.В. Салмин, А.Н. Шуваев, Н.А. Малиновская, Е.А. Пожиленкова, Я.В. Горина, А.Б. Салмина // Материалы II международной конференции Биотехнология новых материалов - окружающая среда - качество жизни. - Красноярск, СФУ. - 2017. - С.78-80.

36. Изменение белков плотных контактов церебральных эндотелиоцитов в онтогенезе в (пато)физиологических условиях / А.Б. Салмина, Н.В. Кувачева, **А.В. Моргу****н**, Е.Д. Хилажева, Я.В. Горина, Е.Б. Бойцова, Е.А. Пожиленкова, Н.А. Малиновская, Е.Л. Жуков // Химическая наука и образование Красноярья: материалы VIII Межрегиональной научно-практической конференции. - Красноярск, КГПУ им. В.П. Астафьева. - 2015. - С.78-82.

37. Alterations of blood-brain barrier development induced by perinatal hypoxia and early life stress / N.V. Kuvacheva, **А.В. Моргу****н**, E.D. Khilazheva, E.A. Pozhilenkova, Ya.V. Gorina, N.A. Malinovskaya, Yu.K. Komleva, O.L. Lopatina, Yu.A. Panina, A.B. Salmina // 2nd Zing Barriers of The CNS Conference. - Oropesa, Spain, The Bury Stow-Cum-Quy. - 2015. - P.67.

38. Perinatal brain injury is associated with alterations in SLC superfamily protein expression in neurovascular unit / **А.В. Моргу****н**, N.V. Kuvacheva, Yu.K. Komleva, E.D. Khilazheva, E.A. Pozhilenkova, Ya.V. Gorina, N.A. Malinovskaya, O.L. Lopatina, Yu.A. Panina, A. Tohidpour, A.B. Salmina // Learning, memory, and brain plasticity: Implications for psychopathology. Abstracts of the Symposium of Collaborative Research Center 636. November 4-6, 2015. - Schwetzingen, University Heidelberg, Germany. - 2015. - P.41

39. Изучение прогениторных клеток головного мозга крыс in vitro / Н. В. Кувачева, **А. В. Моргу****н**, Ю. К. Комлева, А. Б. Салмина, Е. Д. Хилажева, О. С. Окунева, А. И. Дробушевская, И. А. Кутищева, Я. В. Горина // Научная дискуссия : инновации в современном мире : материалы XIII междунар. заочной науч.-практ. конф. - Москва, 2013.- С.140-146.

40. Модели ишемии головного мозга на клеточных культурах / **А. В. Моргу****н**, Н. А. Малиновская, О. С. Окунева, А. И. Дробушевская, И. А. Кутищева // Актуальные вопросы

- современной медицины : материалы междунар. заочной науч.-практ. конф. - Новосибирск, 2013. - С.164-171.
41. Опыт дифференцировки прогениторных клеток ЦНС крыс / **А. В. Моргун**, Н. В. Кувачева, Ю. К. Комлева, И. А. Кутищева, О. С. Окунева, А. И. Дробушевская, Е. Д. Хилажева, А. Б. Салмина // Приоритетные направления развития науки и технологий : тезисы докл. XII Всеросс. науч.-технич. конф. - Тула, 2012. - С.37-40.
42. Культивирование и дифференцировка прогениторных клеток головного мозга эмбрионов крыс / **А. В. Моргун**, О. С. Окунева, И. А. Кутищева, А. И. Дробушевская // Теория и практика современной науки : сб. тр. междунар. науч. конф - Москва, НИИЦ «Институт Стратегических Исследований».- 2012.- С.1-4.
43. Способ выделения и культивирования прогениторных клеток из мозга эмбрионов крыс / Н. В. Кувачева, Н. А. Малиновская, **А. В. Моргун**, Е. А. Пожиленкова, Ю. К. Комлева, А. Б. Салмина // Современные проблемы и пути их решения в науке, транспорте, производстве и образовании 2012 : сб. тр. интернет-конф. - Москва, 2012. - С. 39-42.
44. Способ выделения и культивирования прогениторных клеток головного мозга крыс / **А.В. Моргун**, Н.В. Кувачева, Ю.К. Комлева, Е.А. Пожиленкова, Н.А. Малиновская, А.Б. Салмина // Тенденции и перспективы развития современного научного знания : сб. тр. V Международной науч.-практ. конф. - Москва, 2012. - С. 372-374.
45. Changes in the neuronal P-glycoprotein expression in ischemic-hypoxic brain damage / A. B. Salmina, A. V. Morgun, O. V. Frolova, D. I. Laletin, I. A. Kutischeva, O. S. Okuneva // Фундаментальная медицина: От скальпеля к геному, липидому и протеому : сб. тезисов междунар. интернет конф. - Казань, 2011. - P.109-110.
46. Neuron-Glia Interactions In Ischemic Brain Injury And Neurodegeneration / A. B. Salmina, N. A. Malinovskaya, O. S. Okuneva, A. V. Morgun, A. I. Inzhutova, O. V. Frolova, D. I. Laletin, M. M. Petrova, T. E. Taranushenko, S. V. Prokopenko, A. A. Fursov // BITs 2nd Annual World Congress of NeuroTalk. - Dalian, China, 2011. - P. 63.
47. Диагностическое значение уровня белков нейрональной и глиальной природы в крови при гипоксически-ишемическом поражении головного мозга у новорожденных / **А. В. Моргун**, О. С. Окунева, А. Б. Салмина, Т. Е. Таранушенко // Актуальные проблемы педиатрии : сб. материалов XV Конгресса педиатров России с междунар. Участием. - Москва, 2011. - С. 593.
48. Изменение экспрессии белка лекарственной устойчивости на астроцитах головного мозга при перинатальном ишемически-гипоксическом повреждении / **А. В. Моргун**, О. В. Фролова, Д. И. Лалетин, С. И. Устинова, А. Б. Салмина // Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии : сб. X Росс. Конгресса и II Конгресса детских врачей союзного государства. - Москва, 2011.- С.174-175.
49. Оценка проницаемости гематоэнцефалического барьера in vitro / Н. А. Малиновская, **А. В. Моргун**, Г. А. Киричкова, Ю. А. Панина, Ю. К. Комлева // III Съезд физиологов СНГ : сб. тр. - Ялта, 2011. - С. 66.
50. Пилотное исследование по созданию моделей гематоэнцефалического барьера in vitro / Н. А. Малиновская, **А. В. Моргун**, Г. А. Морозова, А. Б. Салмина, Т. Е. Таранушенко, М. М. Петрова, С. В. Прокопенко, Ю. К. Комлева, Ю. А. Панина // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии : сб. тр. междунар. интернет-конф. - Казань, 2011. - С. 8-10.
51. Создание молекулярно-клеточной модели гематоэнцефалического барьера in vitro / **А. В. Моргун**, Н. А. Малиновская, А. Б. Салмина, Е. А. Пожиленкова, Н. В. Кувачева, Е. С. Гагарина // Приоритетные направления развития науки и технологий : тезисы докл. X Всеросс. науч.-технич. конф. - Тула, 2011. - С. 114-115.
52. Соэкспрессия CD38 и Pgp на клетках нейроваскулярной единицы при фокальной ишемии головного мозга крыс / Г. А. Киричкова, Н. А. Малиновская, **А. В. Моргун**, А. Б. Салмина, С. В. Прокопенко, Л. Д. Зыкова, М. М. Петрова, Д. И. Лалетин, О. В. Фролова // III Съезд физиологов СНГ : сб. тр. - Ялта, 2011. - С. 46.

53. Экспрессия Р-гликопротеина в клетках нейроваскулярной единицы при перинатальной гипоксии-ишемии мозга в остром периоде / **А. В. Моргу́н**, Н. А. Малиновская, О. С. Окунева, С. И. Устинова, Л. Н. Карпова, А. Б. Салмина, Е. А. Пожиленкова, Д. И. Лалетин, О. В. Фролова, И. А. Кутищева // Приоритетные направления развития науки и технологий: тезисы докл. X Всеросс. науч.-технич. конф. - Тула, 2011. - С. 115-116.
54. Markers of neuronal and glial cells in perinatal hypoxic-ischemic brain injury / O. S. Okuneva, T. E. Taranushenko, A. B. Salmina, I. M. Demyanova., A. V. Morgun // Proceedings of the III World Asthma and COPD Forum, World Forum of Pediatrics Advances in allergy, asthma and immunology: from basic science to clinical management. Dubai, 2010. - P.163-166.
55. Modulation of CD38 and Cx43 in astrocytes as new neuroprotective strategy at perinatal hypoxic-ischemic brain damage / O. S. Okuneva, O. V. Frolova, N. A. Malinovskaya, D. I. Laletin, A. V. Morgun, A. B. Salmina // International Journal of Developmental Neuroscience. - 2010. - V. 23, № 8. - P.664.
56. Role of ADP-ribosyl cyclase in dysregulation of energy metabolism in neuronal and glial cells at perinatal hypoxia-ischemia brain injury / O. S. Okuneva, O. V. Frolova, A. V. Morgun, N. A. Malinovskaya, D. I. Laletin, A. B. Salmina // International Journal of Developmental Neuroscience. - 2010. - V. 23, № 8. - P.696.
57. Динамика изменения активности АДФ-рибозилциклазы в клетках головного мозга в раннем постнатальном периоде / А. Б. Салмина, О. С. Окунева, Н. А. Малиновская, **А. В. Моргу́н**, А. А. Фурсов, Л. Д. Зыкова, Е. В. Большакова, С. В. Михуткина // Актуальные вопросы функциональной межполушарной асимметрии и нейропластичности : материалы всеросс. конф. с междунар. участием. - Москва, 2008. - С. 630-634.

Список сокращений

АТФ	- аденозинтрифосфат;
ГИП	- гипоксически-ишемическое поражение;
ГМ	- головной мозг;
ГЭБ	- гематоэнцефалический барьер;
ЕААТ	- excitatory amino acid transporter / транспортер возбуждающих аминокислот
ИВЛ	- искусственная вентиляция легких;
МГц	- мегагерц;
мкМ	- микромоль;
мл	- миллилитр;
мм	- миллиметр;
НАД	- никотинамидадениндинуклеотид
НАДН	- восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида;
НВЕ	- нейроваскулярная единица;
нг	- нанограмм;
НСБ	- нейроспецифические белки;
НСГ	- нейросонографическое исследование;
ПВП	- перивентрикулярное пространство;
Р	- день постнатального развития;
Сх	- connexin / коннексин;
ЦИ	- церебральная ишемия;
ЦНС	- центральная нервная система;
FITC	- fluorescein isothiocyanate (флюоресцеинизотиоционат);
GFAP	- glial fibrillary acidic protein/глиальный фибриллярный кислый белок;
NMDA	- N-methyl-D-aspartic acid/ N-метил-D-аспартат;
NSE	- neuron specific enolase/нейрон-специфическая енолаза;
NSS	- Neurological Severity Score / шкала оценки степени неврологического повреждения;
Pgp	- P-glycoprotein/Р-гликопротеин;
SLC	- solute-linked carrier / транспортеры нейтральных аминокислот;

sPECAM-1 - soluble platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 / растворимая форма молекулы
клеточной адгезии тромбоцитов / эндотелиоцитов;
TRITC - tetramethyl-rhodamine isothiocyanate / тетраметилродамин изотиоцианат.