

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ПРОФЕССОРА
В.Ф.ВОЙНО-ЯСЕНЕЦКОГО" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

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 (медицинские науки)

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научные консультанты:

д-р мед. наук, профессор

Салмина Алла Борисовна

д-р мед. наук, профессор

Таранушенко Татьяна Евгеньевна

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА I.....	19
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	19
1.1 Современные представления о развитии головного мозга и барьерогенезе.....	19
1.2 Структура и развитие нейроваскулярной единицы.....	24
1.3 Патофизиология нейроваскулярной единицы и гематоэнцефалического барьера.....	32
1.4 Перинатальное ишемическое повреждение головного мозга: этиология, патогенез, распространенность. Современные протоколы ведения пациентов: достоинства и недостатки.....	40
1.5 Ключевые механизмы патогенеза ишемического повреждения клеток нейроваскулярной единицы головного мозга.....	51
1.6. Изменения энергетического метаболизма развивающегося головного мозга при ишемии.....	67
1.7. Развитие феномена эксайтотоксичности.....	72
1.8. Перспективы лекарственной терапии гипоксически-ишемического повреждения у новорожденных.....	82
1.9 Модели нейроваскулярной единицы и гематоэнцефалического барьера.....	85
ГЛАВА II. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	92
2.1. Объект и методы экспериментальной части исследования.....	92
2.2. Клиническая часть исследования.....	110
2.3. Математико-статистическая обработка результатов.....	114

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	116
3.1. Результаты комплексной оценки состояния НВЕ <i>in vivo</i>	116
3.1.1 Неврологический статус животных при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС.....	116
3.1.2 Экспрессия белков плотных контактов церебральных эндотелиоцитов и маркеров пролиферативной активности в пато(физио)логических условиях <i>in vivo</i>	120
3.1.3 Особенности экспрессии CD38 и коннексина-43 в клетках НВЕ экспериментальных животных	124
3.1.4 Особенности экспрессии белков, транспортирующих глутамин, глутамат, гидрофобные молекулы, монокарбоксилатных транспортеров (MCT1, MCT4) и транспортера глюкозы (GLUT4) в клетках НВЕ <i>in vivo</i>	137
3.1.5 Изменения транспорта и продукции лактата в НВЕ <i>in vivo</i>	144
3.1.6 Оценка проницаемости гематоэнцефалического барьера <i>in vivo</i>	151
3.2 Результаты комплексной оценки состояния НВЕ <i>in vitro</i>	155
3.2.1 Разработка и применение моделей НВЕ/ГЭБ <i>in vitro</i>	155
3.2.2 Роль Sx43 в регуляции функционирования НВЕ <i>in vitro</i> при гипоксическом повреждении	159
3.2.3 Особенности экспрессии монокарбоксилатных транспортеров в клетках НВЕ <i>in vitro</i>	163
3.2.4 Изменение концентрации лактата и глутамата в НВЕ <i>in vitro</i>	164
3.2.5 Особенности пролиферативной активности клеток НВЕ <i>in vitro</i>	166
ГЛАВА IV	171
КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕЙ С ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ.....	171

4.1. Особенности течения антенатального периода	171
4.2. Особенности интранатального периода новорожденных с церебральной ишемией.....	173
4.3. Клинические особенности новорожденных детей с церебральной ишемией при рождении	174
4.4. Особенности неонатального периода пациентов с церебральной ишемией	176
4.5 Особенности неврологической симптоматики пациентов с церебральной ишемией.....	177
4.6 Нейросонографическая характеристика	180
4.7 Содержание белков NSE, GFAP, sPECAM-1, лактата и глутамата в сыворотке крови пациентов с церебральной ишемией	186
ГЛАВА V. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	203
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	257
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	264

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Перинатальная заболеваемость, а также ее последствия, существенно влияют на здоровье будущего поколения. Патология периода новорожденности имеет существенное медико-социальное значение, что актуализирует изучение новых механизмов ее формирования для разработки эффективных методов профилактики, диагностики и терапии. Однако по-прежнему не решенными остаются вопросы, связанные с клеточно-молекулярными механизмами развития патологических изменений в органах и тканях, а также оценкой восстановительного потенциала развивающегося организма при перенесенном перинатальном повреждении.

Отдельное место в перинатальной заболеваемости принадлежит патологии центральной нервной системы (ЦНС). Это обстоятельство связано с тем, что повреждения мозга, развивающиеся в периоде новорожденности, составляют значительную долю (до 70%) в структуре всей неврологической патологии детского возраста. Согласно литературе, в мировой практике гипоксически-ишемическая энцефалопатия в период новорожденности выставляется, как диагноз в 1,8 – 25 на 1000 новорожденных, в СНГ - 10 – 13 случаев на 1000 новорожденных, а в отдельных регионах данный диагноз устанавливается более чем у 700 пациентов из 1000 новорожденных [76, 541, 548].

С 2000 г. на территории РФ действует, разработанная Российской ассоциацией специалистов перинатальной медицины, «Классификация перинатальных поражений нервной системы у новорождённых». В этом документе учтены критерии МКБ-10. Однако проблемы постановки диагноза сохраняются до настоящего времени. Очень часто, диагноз выставляется лишь на основании осмотра и субъективного мнения лечащего врача. Имеет место гипердиагностика вследствие неправильной дифференциальной оценки таких проявлений, как нарушение сознания и мышечного тонуса, а

также судорожного синдрома и симптомов угнетения со вздрагиваниями, реакцией на осмотр, состоянием ребенка (сон или бодрствование, сытый ребенок или голодный, спокойный или плачущий) [18].

Кроме того, сохраняющиеся актуальность и медико-социальная значимость перинатального поражения ЦНС гипоксически-ишемического генеза в педиатрической практике обусловлены рядом дополнительных обстоятельств. К ним можно отнести высокую заболеваемость, нечеткость критериев для дифференцировки физиологических процессов адаптации и патологии, сложности однозначной оценки тяжести клинических симптомов, существующие пограничные и переходные состояния и, безусловно, высокий риск летальных исходов [32, 45, 83]. Клинические последствия перинатальных поражений ЦНС являются серьезной проблемой для неонатологов, неврологов и педиатров на протяжении многих лет. Так, у детей, перенесших гипоксически-ишемическое поражение ЦНС, в дальнейшем, формируется серьезная инвалидизирующая патология: детский церебральный паралич (ДЦП), слепота, глухота, симптоматическая эпилепсия, задержка умственного развития, гидроцефалия.

Однако в настоящее время в практической медицине существует серьезная проблема недостаточного понимания фундаментальных патологических процессов, происходящих при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении головного мозга. Например, в клинической практике часто не учитываются молекулярные механизмы патогенеза повреждения развивающейся ЦНС, которые и приводят к прогрессированию заболевания или участвуют в формировании сопутствующей патологии и осложнений [8, 71]. Одновременно с этим известно, что основные механизмы, которые являются участниками гипоксического повреждения, реализуются в ходе целого каскада различных процессов на субклеточном уровне, результатом чего является клеточная гибель [66]. При этом влияние неблагоприятных факторов в пренатальном или раннем постнатальном периоде существенным образом влияет на развитие головного мозга, путем

нарушения механизмов сопряжения таких процессов, как синаптогенез, пролиферация, дифференцировка и миграция клеток головного мозга, обеспечивающих нейропластичность и определяющих способность к восстановлению утраченных функций.

Нейроваскулярная единица (НВЕ) головного мозга, включающая в себя клетки церебрального эндотелия, периваскулярные астроциты, перициты, нейроны [244, 286], является «плацдармом» для реализации многих механизмов нейропластичности. Кроме того, структурным компонентом НВЕ является гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), который обеспечивает контролируемую избирательную проницаемость [378]. Межклеточные взаимодействия обеспечиваются в НВЕ/ГЭБ скоординированной работой белков плотных, щелевых и адгезионных контактов (например, ZO-1, CLDN5, коннексинов, JAM), белков-транспортёров (например, Pgp, EAAT, MCT), экзоферментов (например, CD38) и иных молекул, вовлеченных в механизмы продукции, транспорта и рецепции сигнальных молекул, транмиттеров и метаболитов [65, 132].

Важно упомянуть о том, что до сих пор дискуссионным является вопрос о завершенности формирования ГЭБ (т.н. барьерогенез) в раннем постнатальном периоде у млекопитающих [279]. Кроме того, молекулярные механизмы поддержания структурно-функциональной целостности ГЭБ и нарушения проницаемости при повреждении головного мозга остаются недостаточно изученными. Так, известно, что любые нарушения межклеточной коммуникации внутри НВЕ вызывают снижение эффективности функционирования головного мозга.

Нарушения, которые развиваются в пределах НВЕ при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении головного мозга, являются ключевыми в развитии патологических изменений. Вместе с тем, в этом контексте роль межклеточных взаимодействий в НВЕ/ГЭБ, например, астроцит-эндотелиальных, остается практически не изученной. Однако именно вследствие нарушения межклеточных взаимодействий НВЕ

наблюдается первичное изменение проницаемости ГЭБ, формирование отека ткани головного мозга, появление в крови и ликворе белков-маркеров повреждения и метаболитов клеток НВЕ, чья диагностическая значимость пока изучена недостаточно [37, 51, 352]. Очевидно, что определение в сыворотке (плазме) крови и ликворе маркеров дисфункции и гибели эндотелиальных клеток (sPECAM-1), нейрональной и астроглиальной природы (NSE, GFAP), метаболитов и нейротрансмиттеров с последующим сопоставлением результатов с данными, полученными при оценке вклада межклеточных взаимодействий в НВЕ в патогенез повреждения головного мозга, позволит идентифицировать новые молекулы-мишени для патогенетической терапии и молекулы-маркеры, применимые в реальной клинической практике.

Современные технологии позволяют исследовать патогенез перинатального гипоксически-ишемического поражения головного мозга на экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro* [86, 112, 152, 331, 401, 434, 470]. Разработанные модели ГЭБ *in vitro* разнообразны (статические, динамические, двух- и трехкомпонентные и пр.) и позволяют оценить некоторые важные механизмы межклеточных взаимодействий [422, 433, 508, 537, 555]. Вместе с тем, разработка новых моделей НВЕ и ГЭБ, в том числе учитывающих самые ранние этапы развития головного мозга и барьерогенеза – одна из актуальных задач современной нейробиологии, физиологии и патофизиологии. Решение этой задачи обеспечит прогресс в биоинженерных подходах, касающихся создания микрофизиологических систем с участием ГЭБ в формате *on-chip*, важных для изучения клеточно-молекулярных механизмов развития широкого круга заболеваний головного мозга, тестирования лекарств-кандидатов.

В целом, ключевыми задачами специалистов, которые занимаются проблемами перинатальной патологии ЦНС, являются [63]:

1. изучение молекулярно-клеточных механизмов повреждения, репарации и функционального восстановления при перинатальном ГИП ЦНС;

2. разработка и внедрение в практическую медицину более информативных методов диагностики;
3. применение современной медикаментозной нейропротекции с доказанной эффективностью;
4. разработка новых методик, применяемых для прогнозирования исходов и развития психической и моторной функции ребенка;
5. широкое внедрение высокоэффективных комплексных программ для нейрореабилитации на основе системного подхода.

Знания о молекулярных механизмах межклеточных взаимодействий в пределах НВЕ, а также идентификация событий, приводящих к нарушениям нейрон-астроглиальной и глио-васкулярной коммуникации в пато(физио)логических условиях, определяют прогресс в разработке новых, высокоэффективных методов диагностики, терапии и нейропротекции при заболеваниях головного мозга у детей [146].

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

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 клинико-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 aberrантного 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, Cx43, 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.

Личный вклад соискателя

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); 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.

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.

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.

Внедрения 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»).

Апробация работы

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 опубликованы 57 печатных работы: 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 р_сибирь_a), Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (9398р/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/>).

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные представления о развитии головного мозга и барьерогенезе

При развитии головного мозга проходит три основных процесса: нейральная индукция с формированием нейроэктодермы; образование нервной пластинки и нервной трубки; региональная специализация. Для нейрогенеза в период внутриутробного развития характерна высокая клеточная пролиферация и активная миграция клеток во всех областях мозга. Из стволовых клеток образуются клетки глии и нейроны [258, 267, 288, 473].

В постнатальный период нейрогенез можно наблюдать в обонятельных луковицах, гиппокампе (субгранулярная зона), боковых желудочках (субвентрикулярная зона) [70].

Собственно на нейрогенез влияют различные эндогенные и экзогенные факторы: нейротрансмиттеры, гормоны, факторы роста, физические факторы, химические соединения, биологические агенты. Причем, влияние указанных факторов наблюдается как в эмбриональном, так и постнатальном периоде жизни.

Закладка ЦНС начинается достаточно рано. На самых ранних этапах нейруляции происходит закладка головного мозга, который развивается из дорсальных отделов передних мозговых пузырей. На одиннадцатый день эмбриогенеза формируется нервная пластинка, которая в течение 10 дней замыкается в трубку. За счет неравномерного роста стенок нервной трубки формируются дорсальные отделы передних мозговых пузырей [188, 391].

В ходе четвертой недели внутриутробного развития из переднего мозгового пузыря развиваются обонятельный эпителий, обонятельные луковицы, сетчатка, зрительные нервы, проводящие пути [35], начинается образование полушарий [53]. При этом начинается дифференцировка клеток

эктодермы в нейроэктодерму, а также пролиферация нейроэктодермальных клеток.

Все указанные процессы происходят очень быстро и, к первому месяцу эмбрионального развития человека, заканчивается закладка основных структур головного мозга. Любые нарушения в этот период приводят к гибели плода или грубым порокам развития ЦНС [177, 437, 492].

На пятой неделе заканчивается формирование изгибов головного мозга и начинается формирование боковых, третьего и четвертого желудочков.

На шестой неделе развиваются оболочки мозга и кора, на поверхности полушарий образуются извилины, борозды и щели. Происходит деление полушарий на доли. В желудочках формируются центральный отдел и рога. Из задней части переднего пузыря происходит формирование промежуточного мозга, таламуса, Сильвиева водопровода. Одновременно с этим происходит развитие мозжечка и продолговатого мозга [114, 168].

В период с 14 по 20 неделю эмбриогенеза формируются центральная и сильвиева извилины. С 25 недели начинается образование борозд, вторичных извилин, рост субвентрикулярной зоны, продуцирующей нейроны и глиальные клетки, и формирование ромбовидной ямки и закладка двигательных ядер черепных нервов и парасимпатических ядер вегетативной нервной системы [404].

Формирование зон коры головного мозга обусловлено воздействием, в первую, но не единственную, очередь, афферентных влияний со стороны таламуса и мигрирующих из других зон головного мозга прогениторных клеток [161, 322, 527, 533]. Например, зрительная кора формируется под действием поступающей зрительной информации из ядер таламуса. Но в тоже время имеются убедительные доказательства того, что морфофункциональная детерминация корковых зон и областей происходит намного раньше, еще до момента проникновения афферентных волокон в кору из вентрикулярной зоны [159, 160, 325, 416, 220, 517].

Формирование неокортекса происходит за счет мигрирующих нейронов [3, 241, 347]. Миграция нейронов начинается, с момента выхода первых прогениторных клеток из вентрикулярной зоны – первый пик миграции. Второй пик миграции нейронов зафиксирован на 5-8 неделе эмбрионального развития [333, 443, 525, 561].

В период с 8 по 20 неделю гестации происходит нейрональная пролиферация и активная миграция клеток. При этом существуют определенные особенности пролиферативной активности клеток ЦНС. В вентрикулярном слое около 80% клеток делятся асимметрично - появляется одна клетка глии и одна клетка, которая является предшественницей нейрона (прогениторная клетка). Прогениторные клетки мигрируют в субвентрикулярную зону, где делятся симметрично - появляются два нейрона [487].

Согласно Caviness V. S. et al., в настоящее время выделяют четыре стадии миграции нейронов [161]:

1. Миграция нейронов из вентрикулярной зоны в субвентрикулярную.
2. Образование многочисленных отростков и миграция в пределах субвентрикулярного слоя.
3. Обратная миграция нервных клеток к вентрикулярной поверхности и утрата отростков (формирование биполярных клеток).
4. Миграция нейронов в неокортекс.

Доказано, что радиальная глия и нейроны являются производными одних и тех же прогениторных клеток. То есть, радиальная глия может служить источником клеток-предшественников нейронов и, кроме этого, способна трансформироваться в нейроны [265]. Помимо трансформации в нейроны, доказано, что при завершении кортикогенеза радиальная глия является источником астроцитов, эпендимоцитов и олигодендроцитов [321, 456, 457, 359]. Указанные особенности глиальных клеток обуславливают регенераторный потенциал после развития поражения ЦНС.

Клетки радиальной глии первыми начинают взаимодействовать с эмбриональными эндотелиоцитами. Экспрессия глиальными клетками на своей поверхности глутамат-аспартатный транспортер (GLAST) и коннексина-43 доказывает участие радиальной глии в метаболическом сопряжении клеток головного мозга и реализации паракринного и аутокринного сигналинга активно пролиферирующих клеток [246].

После рождения активность радиальной глии несколько уменьшается, но в отдельных областях головного мозга сохраняет черты, характерные для эмбриогенеза. В нейрогенных нишах не все клетки радиальной глии трансформируются в астроциты и сохраняют способность к превращению в нейроны.

Еще одним доказательством участия клеток-предшественниц, в частности астроглии, в постнатальном и репаративном нейрогенезе является обнаружение клеток, которые экспрессируют гиппокампальный хрящевой гликопротеин (YKL). В эмбриональный период эти прогениторные клетки в большом количестве регистрируются при активации ангиогенеза. Клетки, экспрессирующие YKL обнаружены и в зрелом мозге. Особенно много YKL-иммунопозитивных клеток зафиксировано при развитии нейровоспаления и нейродегенеративных заболеваний.

После рождения онтогенез нервной системы человека не прекращается, но претерпевает значительные изменения. Практически полностью останавливается образование новых нейронов, но происходит увеличение их размеров и количества отростков. Активно идут процессы миелинизации. В совокупности эти процессы обуславливают увеличение размеров и массы головного мозга.

При влиянии ряда факторов на не зрелый мозг, наблюдаются эффекты, отсроченные по времени, которые приводят к нарушению формирования или функционирования головного мозга. Например, при гипоксическом воздействии в неонатальном периоде у экспериментальных животных зафиксировали увеличение пролиферативной активности клеток в отдельных

областях головного мозга, но позднее у этих животных чаще развивалась шизофрения [305]. В случаях нарушения нейрогенеза в области гиппокампа наблюдается отсроченное развитие депрессии [342]. Доказаны влияния на нейрогенез в антенатальном периоде иммунной системой. Существуют доказательства, что при развитии иммунного ответа, реализуемого посредством TLR3-механизмов, происходит изменение пролиферативной активности клеток незрелого мозга [446].

Нарушения регуляции нейрогенеза в развивающейся ЦНС играют значительную роль в инициации, поддержании и прогрессировании процессов нейродегенерации, дисфункции памяти, расстройств настроения и социального поведения. Изменения, зафиксированные в самом начале нейродегенеративных заболеваний, демонстрируют, что управляемое влияние на нейрогенез представляет собой одну из потенциальных терапевтических стратегий для применения в практической медицине.

Принимая во внимание этапы развития головного мозга в целом и нейрогенеза, в частности, можно оценить и учесть влияние перинатального повреждения на ЦНС. Учитывая высокий потенциал незрелой ЦНС к репарации, можно изменить клинические подходы к пациентам с перинатальной патологией ЦНС и разработать новые стратегии нейропротекции и нейрореабилитации [176, 191].

В настоящее время ни одна из современных теорий развития мозга не дает четкого ответа на вопрос о возможности прогнозирования и не способна в полной мере объяснить широкий спектр возможных исходов повреждения ЦНС, перенесенного в антенатальном и/или раннем постнатальном периодах [110, 390].

Влияние различных патологических факторов, нарушающих эмбриогенез головного мозга, в антенатальном периоде являются причиной тяжелых врожденных аномалий, гибели плода, выраженных нарушений социализации человека. Кроме этого, нарушения нормального формирования

ЦНС лежат в основе нарушений запоминания и долговременной памяти, повышенной тревожности и агрессии, развитии депрессии [223].

В настоящее время многие исследователи подчеркивают, что основные патофизиологические события, развивающиеся при различной патологии ЦНС, в том числе и при перинатальном поражении, происходят в пределах нейроваскулярной единицы.

1.2 Структура и развитие нейроваскулярной единицы

В научной литературе термином «нейроваскулярная единица (НВЕ)» обозначается совокупность клеток ЦНС и церебральных сосудов, которой достаточно для обеспечения их собственной функциональной активности. Основными клетками, которые входят в состав НВЕ являются нейроны, астроциты и эндотелиоциты головного мозга. Но в настоящее время вопросы о клеточном составе НВЕ остаются открытыми, к структурным элементам относят так же перициты и гладкомышечные клетки [87, 286]. Считается, что НВЕ контролирует проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и осуществляет локальный глиоваскулярный контроль. Клетки НВЕ осуществляют регуляцию нейрогенеза, апоптоза и синаптогенеза, активно участвуют в индукции нейровоспаления и ангиогенеза. С точки зрения практической медицины, НВЕ можно расценивать как мишень для терапевтического воздействия при некоторой патологии ЦНС. Помимо прочего, НВЕ, по своей функциональной роли, рассматривают как основную составляющую ГЭБ.

Известно, что ГЭБ активно поддерживает гомеостаз головного мозга, регулируя проникновение из системного кровотока питательных веществ, газов и токсинов в ЦНС. Кроме этого через гематоэнцефалический барьер из ткани мозга в кровоток выводятся метаболиты.

Физиологическая проницаемость ГЭБ нарушается при различных заболеваниях ЦНС. Патологически повышенная проницаемость

зафиксирована при ишемии, гипоксии, травмах и опухолях головного мозга, воспалительных и нейродегенеративных заболеваниях. Так как изменения проницаемости могут быть избирательными для отдельных соединений и метаболитов, то при наличии патологических изменений ГЭБ, фармакотерапия может оказаться малоэффективной [139, 141, 144, 378]. Учитывая, что НВЕ является частным примером гематоэнцефалического барьера, то изменения проницаемости ГЭБ можно рассматривать в контексте нарушений межклеточных взаимодействий между клетками-компонентами НВЕ.

Основная роль в формировании барьерной функции ГЭБ/НВЕ и управлении его проницаемостью принадлежит эндотелиальным клеткам головного мозга. Эндотелиоциты капилляров ЦНС имеют ряд характерных отличий по сравнению с эндотелиоцитами других органов и тканей.

В эндотелиальных клетках, входящих в состав НВЕ, обнаружено большое количество митохондрий, в разы превышающее количество в эндотелии других органов и систем [109, 415]. В капиллярах головного мозга отсутствуют фенестрации между эндотелиоцитами [240, 509], практически полностью отсутствует пиноцитоз, но при этом существуют специфические плотные, щелевые и адгезивные контакты, а также белки, обеспечивающие функционирование этих контактов. Отличительной чертой церебрального эндотелия является высокое электрическое сопротивление [80, 315, 331, 534].

Кроме этого эндотелиальные клетки ЦНС обладают уникальным набором рецепторов, транспортных систем и эффлюксных помп [136, 138, 139, 354], а также секретируют регуляторы функциональной активности прогениторных клеток ЦНС. К таким регуляторам можно отнести нейротрофический фактор мозга (BDNF), факторы роста сосудов (VEGF) и фибробластов (FGF), лейкемия-ингибирующий фактор (LIF), костный морфоген (BMP) [544].

Контроль барьерной и транспортной функций в НВЕ осуществляют клетки астроглии [93], которые отростками плотно охватывают сосудистую

стенку и образуют непосредственный контакт с эндотелиальными клетками [563] и определяют основные свойства этих клеток [92]. Именно астроциты обеспечивают формирование межэндотелиальных плотных контактов, характерных для ЦНС [344]. Например, доказано, что активная экструзия эндотелиальными клетками различных химических веществ из ткани мозга максимально реализуется в присутствии астроцитов [534].

Кроме непосредственного регулирующего влияния на эндотелиоциты, астроциты реализуют сигналинг от нейронов к клеткам сосудов, являясь своеобразными посредниками [229]. Такая передача регулирующих сигналов осуществляется через кальций-опосредованные и пуринергические взаимодействия [559].

Влияние астроцитов на эндотелиальные клетки достаточно широко и разнообразно. Астроглиальные клетки подавляют пролиферацию эндотелиоцитов, а также участвуют в регуляции экспрессии, локализации и функциональной активности различных транспортных белков, что является важным при развитии патологии ЦНС [515]. Астроцитами синтезируются целый спектр веществ, обладающих нейроактивными свойствами и регулирующих взаимодействия клеток в пределах НВЕ. В качестве примеров таких нейроактивных веществ можно назвать глиальный нейротрофический фактор (GDNF), фактор роста сосудов (VEGF), трансформирующий ростовой фактор альфа (TGF- α), нейропептиды, эйкозаноиды, стероидные гормоны [406]. Результатом таких регуляторных влияний является формирование и дальнейшее поддержание межэндотелиоцитарных плотных контактов, которое обеспечивается влияниями TGF- α и GDNF астроцитарного происхождения [534].

Нейроны, входящие в состав НВЕ оказывают норадренергическое, серотонинергическое, холинергическое и ГАМК-ергическое влияние на капилляры ЦНС и функции ГЭБ в целом [286]. Именно нейроны индуцируют экспрессию эндотелиоцитами ГЭБ-ассоциированных белков, участвуют в регуляции диаметра мозговых сосудов и проницаемости ГЭБ [92, 536, 552].

Нейроны, астроциты и эндотелиоциты, формирующие нейроваскулярную единицу, находятся в тесной анатомической и функциональной взаимосвязи между собой, оказывают взаиморегулирующее действие, что обеспечивает уникальные свойства гематоэнцефалического барьера (рисунок 1).

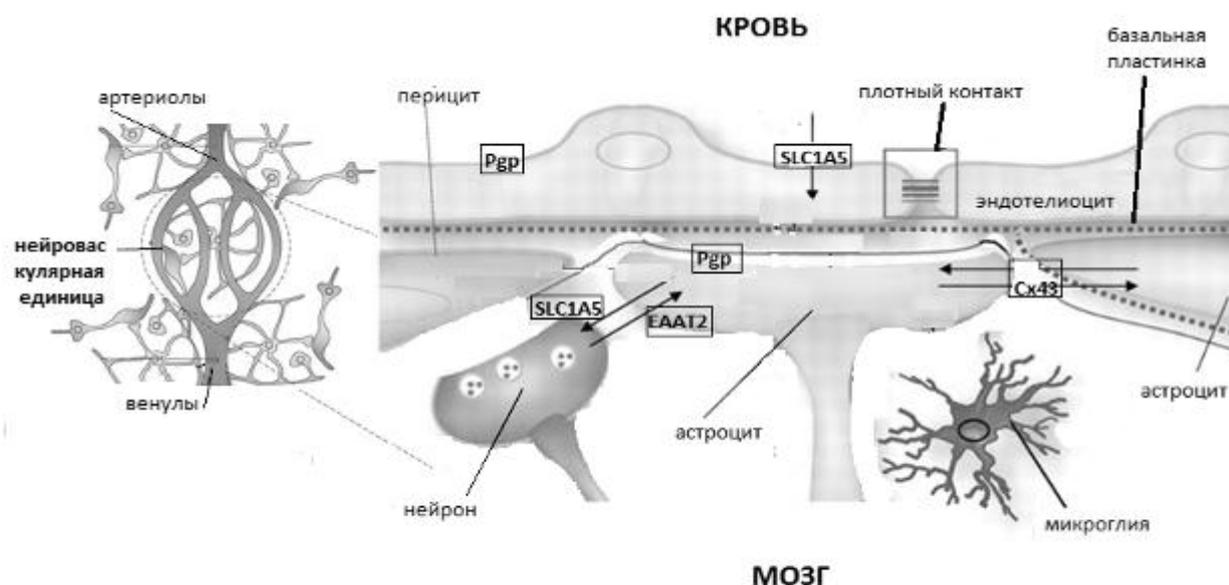


Рисунок 1 – Строение нейроваскулярной единицы [77]

Непосредственное формирование НВЕ и ГЭБ начинается внутриутробно. После рождения этот процесс продолжается и происходит становление функции ГЭБ. Развитие ГЭБ носит термин – барьерогенез. Согласно Brasch J. с соавторами, выделяют несколько этапов барьерогенеза [510]:

1. Васкуляризация и ангиогенез - формирование периневрального сосудистого сплетения с последующим ростом кровеносных сосудов.
2. Дифференцировка компонентов ГЭБ.
3. Созревание клеточных компонентов барьера.

Этап васкуляризации и ангиогенеза начинается с проникновения клеток ангиобластов в краниальную область. Позже, в краниальной области из ангиобластов формируется периневральное сосудистое сплетение.

Периневральное сосудистое сплетение является источником кровеносных сосудов. В нейроэктодермальной ткани сосуды, исходящие из сосудистого сплетения растут радиально и формируют большое количество мелких отростков, которые анастомозируют с такими же отростками соседних сосудов. Так развивается капиллярная сеть в перивентрикулярных областях. Во время гестации наблюдается достаточно интенсивная васкуляризация головного мозга с формированием зрелой пространственной структуры. Но пик активности ангиогенеза наблюдается сразу после рождения в течение нескольких недель [331].

Эмбриональные сосуды и капилляры, которые растут внутри нейроэктодермы, имеют неправильную форму и большой просвет. Эндотелиальный слой этих сосудов рыхлый, плотные контакты между эндотелиоцитами отсутствуют. В клетках обнаруживается большое количество фенестраций и везикул [231]. По мере развития эмбриона, в сосудах головного мозга исчезают фенестрации, диаметр уменьшается, стенки становятся тоньше, а форма правильной [346, 489].

Окончание барьерогенеза представляет собой сопряжение процессов нейрогенеза и ангиогенеза с формированием НВЕ. Основным регулятором при этом является сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF). Кроме этого ключевыми регуляторами считаются рецепторы суперсемейства фактора некроза опухоли (DR6, TROY), компоненты Wnt-сигнального каскада, а также хемокины, протеазы, компоненты внеклеточного матрикса, молекулы клеточной адгезии и факторы роста [116, 180, 201, 556].

Во время процесса ангиогенеза формируются контакты между эндотелиоцитами с нейронами и нейробластами, нейронами и клетками глии, глией и эндотелиоцитами, таким образом, формируется НВЕ. Сами клетки нейроэктодермальной природы индуцируют экспрессию ГЭБ-ассоциированных белков церебральными эндотелиоцитами, что приводит к формированию функциональной зрелости ГЭБ. Согласно Kerr A. L. с соавторами, главная роль в реализации ключевых когнитивных функций

принадлежит ангиогенезу, а не нейрогенезу [111], что свидетельствует о важной роли процессов барьерогенеза при формировании сложных форм поведения и роли ГЭБ в их реализации [224].

После рождения созревание ГЭБ определяется формированием устойчивых связей между клетками-компонентами НВЕ. Формирование межклеточных связей, начавшееся внутриутробно, заканчивается в постнатальном периоде.

Собственно дифференцировка и дальнейшее созревание клеток НВЕ регулируется гуморальными факторами: гормонами, цитокинами, нейропептидами и нейротрансмиттерами. В качестве примера может служить скоординированная экспрессия трех типов рецепторов сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGFR), который детерминирует развитие эндотелиальных клеток и их ближайшего микроокружения. Такие молекулы, как трансмембранный рецептор нейропиплин-1 (NRP1), оказывают многофункциональное действие, являясь одновременно корецепторами для сосудисто-эндотелиального фактора роста и белков, которые стимулируют рост нейрональных аксонов [284].

Интересно, что во время барьерогенеза значительную роль приобретают межклеточные взаимодействия и метаболическое сопряжение в пределах НВЕ. Убедительно доказано, что эндотелиальные клетки могут оказывать воздействие на дифференцировку астроглиальных клеток. Указанное влияние реализуется через синтез и секрецию Notch-лигандов и лейкоингибирующего фактора [550]. Одновременно с этим астроциты секретируют VEGF, оказывая регулирующее влияние на пролиферацию и созревание эндотелиоцитов [210, 266].

Активный ангиогенез и процесс созревания глиальных клеток обеспечивают формирование нейрогенных ниш. Считается, что нейрогенные ниши осуществляют контроль над пролиферацией стволовых клеток и дифференцировкой прогениторных клеток ЦНС, в том числе и в постнатальном периоде жизни. В большинстве случаев интенсивность

ангиогенеза пропорциональна нейрогенезу, что обеспечивает формирование стабильных нейрон-астроглиальных взаимоотношений, в том числе за счет саморегулирующих влияний, путем секреции различных факторов роста (VEGF, TGF β , LIF, EGF, ИЛ-8 и др.) [552]. Аналогичные реципрокные взаимодействия эндотелиоцитов с нейронами и астроглией зарегистрированы в постнатальный период в зрелом мозге [278, 314].

По мере созревания сосудистой сети ЦНС, клетки, входящие в состав НВЕ начинают экспрессировать специфические для нее маркеры. К ним можно отнести транспортеры глюкозы GLUT1 и GLUT4 [192], трансферриновые рецепторы [236], транспортеры монокарбоксилатов (МСТ) и др. На астроцитах и эндотелиальных клетках достаточно рано начинает экспрессироваться белок лекарственной устойчивости Pgp (Р-гликопротеин), но в минимальных количествах [537]. А в постнатальный период экспрессия белков лекарственной устойчивости значительно увеличивается [94].

Экспрессия молекул клеточной адгезии ICAM-1 и PECAM-1 эндотелиальными клетками начинается достаточно рано и намного опережает структурное созревание ГЭБ. Но с момента рождения регистрируется постепенное уменьшение экспрессии молекул адгезии клеток [234, 232]. Таким образом, можно сказать, что функционирование НВЕ единицы начинается внутриутробно и динамически меняется в ходе развития организма.

Нарушения процессов формирования ГЭБ и, как следствие, изменения его функций происходит под действием разнообразных факторов. Например, показано, что при развитии патологически протекающей беременности возможно нарушение васкулогенеза. Кроме этого патология беременности может привести и к нарушению нейрогенеза. Повышенное содержание в крови плода гормонов стресса, нейропептидов, интерлейкинов вызывает дисфункцию эндотелиоцитов и приводит к нарушению формирования ГЭБ/НВЕ и их дисфункции [279]. При внутриутробном инфицировании, а также гипоксии-ишемии плода, происходит повышенная активация

астроглиальных и микроглиальных клеток. Развивается нейровоспаление, прямое повреждение нейронов и патологически повышается проницаемость гематоэнцефалического барьера. Особенно отчетливо указанные изменения регистрируются у недоношенных детей [211, 389, 420]. Интересно, что системное воспаление, перенесенное внутриутробно или в раннем постнатальном периоде, может вызвать стойкие нарушения нейрогенеза и барьерогенеза, вследствие чего наблюдается патологическая проницаемость ГЭБ в зрелом возрасте. Доказано, что указанные изменения происходят под влиянием провоспалительных цитокинов [224].

Несмотря на то, что достаточно хорошо известны основные этиологические факторы, которые вызывают нарушения нейро-, синапто- и барьерогенеза, остаются не до конца изученными механизмы, посредством которых, происходит индукция или прогрессирование патологических изменений на клеточном и субклеточном уровнях; что именно приводит к появлению раннего или отсроченного неврологического дефицита.

Серьезным вопросом для исследователей является идентификация основных причинно-следственных связей при нарушениях развития и функционирования НВЕ и патологией ЦНС, развивающейся в результате гипоксически-ишемического, токсического или воспалительного процессов.

Это обусловлено тем, что практически любое повреждение ЦНС вне зависимости от основного фактора воздействия приводит к развитию нейровоспаления. Различные повреждающие влияния, вызванные инфекционными агентами, токсинами, травматическими и гипоксическими влияниями, нейродегенеративные процессы вызывают однотипные реакции в ткани головного мозга. Исходя из этого, нейровоспаление и нарушение межклеточных взаимодействий можно считать, типичной реакцией на целый спектр этиологических факторов [392, 412].

Научные исследования последних лет позволили расшифровать молекулярно-клеточные события, лежащие в основе функционирования ГЭБ/НВЕ, обозначили новые потенциальные молекулы-мишени для

фармакологического воздействия на управление проницаемости ГЭБ. Например, подавление активности фермента JNK-киназы эндотелиоцитов приводит к снижению избыточной проницаемости ГЭБ и патологических процессов в головном мозге у детей при перинатальном ГИП ЦНС [420]. При гипоксически-ишемическом поражении головного мозга обнаружена высокая активность тканевого активатора плазминогена, который увеличивает проницаемость ГЭБ [439]. Инсулиноподобный фактора роста-1 (IGF-1) и сигнальный каскад, обусловленный им, участвуют в развитии нейровоспаления и, как следствие, приводят к нарушению проницаемости ГЭБ [299]. Еще одними индукторами патологической проницаемости ГЭБ являются кальпаины, каспазы, молекулы клеточной адгезии и NMDA-рецепторы, которые участвуют в патогенезе повреждения ЦНС при гипоксии-ишемии и нейровоспалении [410, 514]. Активными регуляторами проницаемости ГЭБ, в первую очередь за счет эндотелиальных клеток, являются кальциевые каналы, белки-транспортеры семейств Pgp и SLC, а также белки щелевых клеточных контактов (коннексин-43) [93, 519].

1.3 Патопфизиология нейроваскулярной единицы и гематоэнцефалического барьера

Обозначив НВЕ как основную точку пато(физио)логических процессов, и мишень для терапевтического воздействия при повреждении ЦНС, можно объединить ряд функций рассматриваемой структуры следующим образом:

1. Участие в локальной регуляции кровотоком ликворообразования в головном мозге.
2. Осуществление защитной функции при воздействии нейротоксических веществ.
3. Реализация метаболического обеспечения нейронов и синапсов.

НВЕ активно участвует в ликворообразовании и регуляции ликвородинамики посредством аквапоринов (AQP). Аквапорины

обнаружены в мембране клеток и формируют в них поры. Поры, образованные аквапоринами, избирательно пропускают молекулы воды, но при этом препятствуют току ионов. У млекопитающих обнаружено 13 видов аквапоринов, которым присвоены цифровые обозначения от 0 до 12 (AQP0 - AQP12). Учитывая строение и субстратную селективность, все семейство аквапоринов делится на два подсемейства. Первая группа – собственно аквапорины селективно пропускают только воду. Вторая группа - акваглицеропорины, проницаемы для аммиака, мочевины, углекислого газа.

Основным аквапорином ЦНС является AQP4. Клетками, экспрессирующими AQP4 считаются астроциты, однако есть работы, указывающие, что эндотелиальные клетки тоже могут экспрессировать AQP4.

Tang Z. с соавторами доказали, что при развитии глюкозо-кислородной депривации очень быстро (через 8 часов) происходит повышение экспрессии и активности AQP4. В свою очередь усиление экспрессии AQP4 приводит к повышенной продукции ликвора и сопровождается отеком и развитием реактивного астроглиоза [481].

Согласно последним исследованиям повышенную активность и/или экспрессию AQP4 связывают с развитием субарахноидальных кровоизлияний и гипонатриемией, влиянием на миграцию астроглии [424].

Доказано участие AQP4 в метаболизме глутамата [115], обеспечении взаимодействий астроцитов с микроглией [387].

Усиление экспрессии AQP4 астроцитами при гипоксически-ишемическом повреждении ЦНС и кислородно-глюкозной депривации обусловлено влиянием фактора роста фибробластов-2 (FGF2) [259], фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1) [295] и астроцитарными протеинкиназами [318].

Однако аквапорины являются не единственными регуляторами ликворопroduкции. Например, описан эффект BDNF на продукцию ликвора, при некоторой патологии ЦНС.

При развитии рассеянного склероза, менингита, энцефалита и болезни Паркинсона установлено повышение содержания BDNF, который экспрессируется нейронами и астроцитами, что сопровождается усилением продукции ликвора [62, 255, 356, 487].

Таким образом, становится очевидной ликворообразующая роль НВЕ и становится понятным интерес исследователей в области направленного воздействия на клетки НВЕ с целью управления продукцией и динамикой ликвора при патологии ЦНС.

Реализация защитной функции НВЕ осуществляется благодаря следующим особенностям: наличие клеточного, ферментативного барьеров и системы белков-транспортеров.

1). Клеточный барьер формируется эндотелиоцитами, астроцитами и нейронами НВЕ. Можно предположить, что в формировании такого физического барьера принимают участие и перициты, и гладкомышечные клетки. Основная роль этого барьера заключается в ограничении транспорта водорастворимых веществ, снижении активности эндоцитоза и трансцитоза. Безусловно, что основная роль при формировании клеточного барьера принадлежит церебральным эндотелиоцитам. Особенности межэндотелиальных контактов, а также описанные выше особенности клеток обуславливают важность эндотелия в формировании защитной роли клеточного барьера [80]. Так как наличие плотных контактов ограничивает свободный транспорт большинства молекул и соединений, то увеличивается роль транспортировки через саму клетку, что осуществляется посредством многочисленных транспортных систем. Активное участие транспортных белков обуславливает в значительной степени избирательную проницаемость ГЭБ.

Межэндотелиальные плотные контакты сформированы высокоспециализированными специфичными белками церебральных эндотелиоцитов. Указанные белки носят название – белки плотных контактов. Условно, все известные белки плотных контактов, в зависимости

от их локализации в клетки разделяют на трансмембранные и внутриклеточные.

Основными и наиболее часто упоминающимися в научной литературе трансмембранными белками являются окклюдины [534], соединительные молекулы адгезии [500] и клаудины [260]. Церебральный эндотелий экспрессирует различные клаудины. В большей степени клаудин-5 (CLDN5) [230], намного реже клаудины -1, -3, -10 и некоторые другие [382]. Поэтому одним из основных клаудинов ГЭБ/НВЕ считают клаудин-5 и JAM [199, 235]. При этом белок JAM, помимо обеспечения структурной целостности эндотелиального слоя, регулирует полярность эндотелиоцитов [228, 524].

Внутриклеточные белки плотных контактов, обеспечивают взаимодействие белков цитоскелета с трансмембранными белками, напрямую соединяя их. Наиболее хорошо изученными представителями внутриклеточных белков являются ZO1, ZO2 (белки zonula occludens) [169], цингулин [261] и парацингулин [175].

Белок ZO1 является регулирующим и обеспечивает «заякоривание» белков CLDN5 и JAM к белкам цитоскелета. В настоящее время известно, что снижение экспрессии белка ZO1 приводит к увеличению проницаемости гематоэнцефалического барьера [419, 502]. Также существует предположение, что ZO1 участвует в регуляции пролиферации клеток эндотелия головного мозга [178, 560].

В гематоэнцефалическом барьере кроме плотных контактов присутствует еще один вариант межэндотелиальных контактов, который называется контакты сцепления. Считается, что именно такой вид контактов обуславливает адгезию клеток между собой. Еще одна важная роль контактов сцепления заключается в обеспечении контактного торможения во время роста клеток и регуляции электрического заряда эндотелиальных клеток.

Контакты сцепления образуются при взаимодействии кадгеринов и катенинов с белками цитоскелета [510]. Кадгерины являются

трансмембранными белками, а катенины – внутриклеточными. Кроме наличия указанных межклеточных контактов доказано, что контакты сцепления и плотные контакты между собой контактируют. При этом связующими белками между двумя видами межэндотелиальных контактов считаются белки ZO1, которые напрямую взаимодействуют с катенинами [319].

Огромное влияние на развитие сосудов и особенности эндотелиальных клеток оказывают клетки астроглии. Астроциты обуславливают способность церебральных эндотелиоцитов к усиленной экстррузии ксенобиотиков и формирование плотных контактов. Исследования, проведенные *in vitro*, подтвердили влияние астроцитов на формирование специфических свойств церебрального эндотелия. Экспериментально доказано, что совместное культивирование астроцитов и эндотелиальных вызывает резкое уменьшение проницаемости ГЭБ [506].

Временное угнетение функциональной активности эндотелиоцитов, которое сопровождалось, повышенной проницаемостью ГЭБ зарегистрировано при локальном повреждении астроцитов. При этом нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера сопровождалось накоплением токсических веществ в ткани головного мозга. Последующее восстановление астроцитов сопровождалось восстановлению функционирования эндотелия и нормализацией проницаемости ГЭБ [469].

Влияние астроглии на церебральные эндотелиоциты объясняется секретлируемыми астроглией ростовыми факторами - TGF- α , VEGF, GDNF. Есть четкие доказательства, что указанные ростовые факторы играют ведущую роль в формировании межэндотелиальных плотных контактов, а также их нормальном функционировании [92].

Учитывая влияние астроглии на сосуды, эндотелий, высокую потребность нейронов в энергетическом субстрате, особенности взаимодействий между астроцитами и нейронами, становится понятной высокая концентрация астроцитов в периваскулярном пространстве. На

астроцитах зарегистрировано большое количество транспортеров глюкозы. Кроме этого именно в астроцитах происходит метаболизм глюкозы до лактата, который транспортируется к нейронам и используется ими как энергетический субстрат [122].

2). Ферментный барьер представлен большим количеством ферментных систем. Клетки НВЕ содержат ферменты, которые обеспечивают метаболизм ксенобиотиков, лекарственных препаратов, естественных метаболитов. В качестве примеров можно привести такие ферменты, как ацетилхолинэстераза, гамма-глутамилтранспептидаза, щелочная фосфатаза, моноаминоксидаза. Нельзя сказать, что указанные ферменты присутствуют только в клетках НВЕ, но их участие в защите ЦНС неоспоримо.

3). Система транспортных белков.

Регуляция проницаемости ГЭБ связана с функциональной активностью транспортных систем. В последние годы идентифицировано несколько видов эффлюксных транспортных белков и систем в ГЭБ. Основными, в разрезе изучения проницаемости ГЭБ, называются суперсемейство ABC-транспортеров и SLC-транспортеров.

Благодаря ABC-транспортерам развивается лекарственная устойчивость. В литературе часто описывается как «мультилекарственная резистентность». Интересно, что для работы представителей этого суперсемейства необходима энергия. То есть они являются АТФ-зависимыми. В настоящее время выделяют 7 подсемейств и более 40 различных представителей. Основными представителями ABC-белков, которые экспрессируются клетками НВЕ являются Р-гликопротеин и BCR-протеин. На экспрессию церебральным эндотелием эффлюксных белков оказывают прямое влияние другие клетки НВЕ. Например, совместное культивирование глиальных клеток и эндотелиоцитов привело к увеличению экспрессии и активности Р-гликопротеина и некоторых других ABC-белков

эндотелиальными клетками. При этом, как и ожидалось, зарегистрировали уменьшение проницаемости ГЭБ [151].

P-гликопротеин, часто, обозначают как «белок лекарственной устойчивости». Это связано с тем, что впервые его идентифицировали в экспериментах, посвященных изучению феномена лекарственной резистентности, который наблюдался при терапии опухолевых заболеваний. Позднее Pgp был обнаружен не только в опухолевой ткани, однако название его не стали изменять. Pgp локализуется в мембране эндотелиоцитов со стороны просвета сосудов. Этот белок можно назвать первым транспортным барьером, который препятствует проникновению в мозг различных веществ. При этом субстраты к P-гликопротеину проникают внутрь эндотелиоцитов, после чего захватываются Pgp и выводятся в просвет сосудов [138].

Кроме энергетически зависимых транспортеров в ЦНС присутствуют и энергетически независимых транспортные системы. Одним из наиболее хорошо изученных представителей является суперсемейство SLC-транспортеров. Суперсемейство SLC насчитывает 48 семейств, а общее число белков насчитывает около 350 представителей. Биологическая роль SLC-переносчиков заключается в транспорте гидрофильных и ионизированных веществ.

Основными SLC-транспортерами, которые более других изучены при патологии ЦНС, считаются переносчики глутамина и глутамата (SLC1), глюкозы (SLC2), олигопептидов (SLC15), монокарбоксилатов (SLC16), ионов (SLC22) [94]. Кроме этого доказано участие транспортеров SLC при метаболизме и абсорбции лекарственных веществ, что определяет распределение последних в ЦНС, а также влияет на механизмы фармакокинетики [463]. Но, несмотря на достаточно большое количество исследований, посвященных роли SLC-транспортеров их участие в регуляции проницаемости ГЭБ при патологии ЦНС еще не окончательно выяснена, но, безусловно, существенна.

В клетках с высокой экспрессией или функциональной активностью эффлюксных белков (Pgp, SLC) регистрируется пониженное накопление веществ, которые являются субстратами для этих белков. Кроме этого эти субстраты намного быстрее высвобождаются из клеток, которые экспрессируют Pgp и SLC. Одновременно с этим ингибиторы и блокаторы белков-транспортеров вызывают замедление экстррузии субстратов из клеток.

Гиперэкспрессия белков-транспортеров приводит к возникновению лекарственной резистентности не только при онкологических заболеваниях, но и при бронхиальной астме, артериальной гипертензии, ВИЧ-инфекции [26, 46, 82, 252, 505, 542].

Биодоступность многих метаболитов и веществ для клеток ЦНС обусловлена уровнем экспрессии белков-транспортеров эндотелиоцитов. Интересна роль Pgp в элиминации А β при болезни Альцгеймера [363].

Однако роль эффлюксных белков (Pgp и SLC) в ЦНС при развитии гипоксически-ишемической энцефалопатии не до конца изучена. С одной стороны, белки-транспортеры снижают негативное влияние цитокинов в ЦНС, но одновременно с этим снижают терапевтический эффект препаратов, т.к. препятствуют их проникновению в ткань головного мозга [304].

Подводя итог, можно сделать вывод, что функционирование гематоэнцефалического барьера приводит к уменьшению проникновения из крови в мозг токсинов и метаболитов, с одновременным их выведением из ЦНС, но сохранением транспорта газов и питательных веществ, необходимых для жизнедеятельности. Именно особенности функциональной активности ГЭБ определяют эффективность препаратов при лечении заболеваний ЦНС. Наблюдаемые при развитии патологических состояний изменения проницаемости ГЭБ невозможно трактовать однозначно. При гипоксии-ишемии, нейродегенеративных, заболеваниях, опухолях и травмах ЦНС наблюдается увеличение проницаемости ГЭБ. Одновременно с этим многие лекарственные вещества не проникают в ткань головного мозга в

терапевтических концентрациях из-за сохраняющейся активности клеток ГЭБ. То есть защитная функция ГЭБ становится одним из препятствий для успешной терапии заболеваний ЦНС.

1.4 Перинатальное ишемическое повреждение головного мозга: этиология, патогенез, распространенность. Современные протоколы ведения пациентов: достоинства и недостатки

Часто термин «перинатальное поражение ЦНС», объединяет разные патологические состояния, которые возникают при воздействии на ЦНС повреждающих факторов. Воздействие повреждающих факторов может произойти на любом этапе внутриутробного развития или после рождения. В настоящее время считается, что гипоксический фактор является ведущим – зафиксирован, практически, в 70% патологии ЦНС. Второе место принадлежит порокам развития ЦНС - 10-15%. Травматические и инфекционные поражения составляют оставшиеся 15% [17].

Перинатальное гипоксически-ишемическое поражение ЦНС остается серьезной проблемой медицинского и социального характера. В России диагноз, в котором звучат перинатальные поражения головного мозга, встречается часто, но, зачастую, неправомерно. Это обусловлено нечеткостью критериев неврологической нормы и патологии в период новорожденности, не всегда правильной оценкой пограничных состояний у новорожденных детей и субъективностью мнения врачей [58, 83].

Примером сказанного служит то, что частота встречаемости и выявляемости перинатальной гипоксически-ишемической патологии ЦНС в разы отличаются в Российской Федерации и за рубежом [57, 61]. В иностранной литературе авторы приводят информацию о перинатальной патологии ЦНС многократно меньшей, чем в России - до 25:1000 [17, 440, 549]. Согласно отечественным источникам подобный диагноз встречается более чем у 700 пациентов на 1000 новорожденных [57].

Патология, развивающаяся при гипоксически-ишемическом поражении ЦНС, носит разнообразные названия, в зависимости от классификаций перинатальных поражений нервной системы. Например, неонатальная гипоксия-ишемия [388], постаноксическая патология головного мозга [488]. Достаточно часто используется термин гипоксически-ишемическая патология ЦНС, перинатальная аноксическая, гипоксически пораженный головной мозг [57, 58].

В настоящее время, достаточно широко используется термин «перинатальная гипоксически-ишемическая энцефалопатия (ГИЭ)». Терминологическое преимущество данного термина заключается в том, что в нем полноценно обозначена суть заболевания. Указан орган-мишень – головной мозг, главный этиопатогенетический фактор - гипоксия, а также главные события, происходящие в ЦНС – ишемия.

На долю младенческой смертности, где ведущим фактором выступает перинатальная гипоксия, приходится до 50% случаев. Таким образом, гипоксия остается главной причиной младенческой смертности. Кроме этого сохраняется высокая инвалидизация, которая обусловлена перинатальными факторами. По данным некоторых источников, инвалидизация как итог перинатального поражения ЦНС развивается в почти 40 % случаев [13, 36, 547, 548]. Среди доношенных новорожденных - в 20-25% случаев, а у недоношенных, с учетом детей, которые родились с массой тела менее 999 грамм (экстремально низкая масса тела), в 40–60% [429, 431].

Диагностические мероприятия перинатальной гипоксически-ишемической энцефалопатии включают изучение факторов риска - выявление патологии матери во время беременности и родов, которая могла привести к нарушению гемодинамики плода или системы плацента-плод, хронической гипоксии плода; клиническое обследование – использование стандартных неврологических шкал и тестов; изучение метаболических показателей новорожденных; дополнительные методы исследования - нейросонографическое, доплерографическое исследования, компьютерная

томография, МРТ, ПЭТ, электроэнцефалографическое, полиграфическое, электромиографическое исследования, диагностические пункции.

В отдельных случаях, к сожалению, достаточно редких, используются биохимические исследования. В качестве биохимических показателей гипоксического поражения ЦНС предлагается определять концентрацию гипоксантина, ферментов креатининфосфокиназы и аминопептидазы, гормонов (эритропоэтина), специфических белков (нейронспецифическая енолаза; глиофибрилярный кислый белок) [57, 64, 74].

Гипоксия ЦНС может развиваться в антенатальный, интранатальный или ранний постнатальный период. Кроме этого возможно влияние гипоксии и во время антенатального, и интранатального периодов либо во время антенатального, интранатального и постнатального периодов гипоксии. Таким образом, можно говорить не только о перинатальной гипоксии плода, но и о развитии гипоксии новорожденного ребенка [51, 52, 67].

Одним из ведущих механизмов патогенеза при развитии ГИЭ считается нарушение церебрального кровотока. Нарушение мозгового кровотока приводит к дефициту кислорода и запускает целый каскад последующих патофизиологических процессов. В ходе этих процессов нарушается метаболизм клеток, который и можно обозначить, как собственно повреждающий фактор, приводящий к развитию цереброваскулярных расстройств и нарушению в механизмах, регулирующих мозговое кровообращение.

Упрощенную последовательность нарушений, развивающихся при ГИЭ можно описать следующим образом. Кислородная депривация вызывает изменения метаболизма глюкозы, липидов и нуклеиновых кислот. Это сопровождается нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера и накоплением лактата. Повышение концентрации лактата в периартериальном пространстве приводит к изменению кислотности и повышению парциального давления углекислого газа. В свою очередь в ответ на повышение кислотности и содержания углекислого газа происходит

понижение артериального давления - скорость кровотока в головном мозге уменьшается. Уменьшение скорости церебрального кровотока способствует дальнейшему накоплению молочной и жирных кислот, нарушению гомеостаза кальция. В итоге наблюдается повреждение клеток головного мозга и нарушение саморегуляции церебрального кровотока [155, 165, 301, 350, 467].

При развитии ГИЭ страдает не только головной мозг. Патологические процессы запускаются во всех органах организма. В совокупности, такие изменения функций организма могут привести к летальному исходу или развитию соматических, психических, неврологических нарушений [4, 68].

Согласно В.И. Кулакову, можно выделить три основные группы среди факторов риска развития гипоксического состояния новорожденных [36].

1. Патологические состояния и заболевания беременных, которые приводят к недостатку кислорода у плода, либо избыток углекислого газа: сердечно-сосудистые заболевания [23], артериальная гипертензия [20]. При этом развивается сужение, а затем и облитерация сосудов у плода, что приводит к развитию субкомпенсированного ацидоза. К этим же факторам можно отнести железодефицитную анемию беременных [56] и некоторые эндокринопатии [359, 381], прием матерью медикаментов, алкоголя, наркотиков, табачных изделий, профессиональные и экологические вредности [119, 345, 360].

2. Нарушения кровообращения плода, а также нарушения кровообращения в системе плацента-плод: истинные узлы и аномалии развития пуповины [530], обвитие пуповиной или сдавление пуповины [212, 222], преждевременная отслойка плаценты [504], поздний гестоз [6, 38, 23], раннее излитие околоплодных вод, длительный безводный промежуток, затяжные, быстрые и стремительные роды [5, 6, 30].

3. Патология плода или новорожденного: выраженный гемолиз эритроцитов плода при гемолитической болезни, который приводит в последующем к уменьшению кислородной емкости крови, внутриутробное

инфицирование, аномалии развития сосудов (мальформации), тромбозы [36, 54, 226].

Особенности основных клинических проявлений могут зависеть от степени зрелости ЦНС к моменту родов, тяжести повреждения, наличия сопутствующей патологии и периода заболевания. В острый период заболевания, когда формируется неврологический дефект, характерно развитие синдромов церебральной возбудимости или депрессии, дистонии, гипертензионного, судорожного. Наблюдаются и вегето-висцеральные нарушения [18].

Для восстановительного периода (3-12 месяцев) характерно отставание в психомоторном и речевом развитии. Очень часто развиваются нарушения в эмоционально-поведенческой сфере, симптоматическая гидроцефалия, судорожный синдром.

Компенсаторные возможности ЦНС новорожденного достаточно велики. Исходами ГИЭ может быть полное выздоровление, легкие остаточные явления или глубокие неврологические нарушения с очаговой или генерализованной симптоматикой, выраженными двигательными, психическими расстройствами, прогрессирующей гидроцефалией [57]. При этом последствия перенесенного перинатального поражения могут быть отдаленными во времени. В основном это различные особенности психического развития, которые являются основой для формирования синдрома дефицита внимания и гиперактивности или соматических заболеваний [15, 33, 55]. Частично это можно объяснить тем, что максимальные повреждения регистрируются в коре и подкорковых ганглиях [133].

Достаточно часто сохраняется мнение, что после перенесенных повреждений в ЦНС почти не возможны процессы регенерации и восстановления. Однако результаты современных исследований, убедительно показывают, что в детском возрасте, после повреждения ЦНС наблюдается частичная, а в некоторых случаях и полная компенсация неврологических

функций. Авторы объясняют такое восстановление функций ЦНС тем, что ответной реакцией на воздействие повреждающих факторов является, активация компенсаторно-приспособительных механизмов. Такие механизмы обеспечивают регенерацию нервных связей, межклеточных взаимодействий и сохранение, в первую очередь, функциональной целостности и организации ЦНС [58, 102, 393].

Несмотря на большой арсенал возможностей в плане обследования новорожденных детей, до сих пор в неонатологии наблюдаются значительные затруднения в области диагностики, прогнозирования исходов и терапии ГИЭ у новорожденных. Использование существующих принципов диагностики церебральной ишемии предоставляет специалистам ограниченную информацию, особенно в контексте выявления ранних и отсроченных изменений метаболизма.

Например, использование стандартных неврологических методов обследования, позволяющих установить нормальный или измененный неврологический статус ребенка, эффективны, в контексте прогностической оценки, лишь в 15-20%. Использование нейросонографического исследования позволяет увеличить прогностическую ценность до 60% [16].

Наличие современных методов визуализации, позволяет обнаружить структурные повреждения ЦНС. Однако, из-за достаточно высокой пластичности и компенсаторного потенциала мозга новорожденных, развивающиеся неврологические нарушения, не всегда соответствуют выраженности структурных нарушений, которые фиксируются различными методами нейровизуализации. Одновременно с этим возможности лабораторного подтверждения поражения ЦНС достаточно ограничены. Такое положение дел требует разработки лабораторных диагностических критериев, которые могли бы подтвердить глубину и выраженность поражения ЦНС, а также коррелировали с клиническими и параклиническими показателями.

С помощью использования нейровизуализирующих и нейрофизиологических исследований определяют не только локализацию структурных нарушений, но и динамические изменения на фоне проводимой терапии. При этом диагностическая значимость разных методов исследования существенно различается, достигая 60-80%, что объясняется и субъективностью специалиста, проводящего исследование [1, 31, 44].

У широко используемого нейросонографического исследования (НСГ) имеется ряд существенных преимуществ. В первую очередь это преимущества экономического аспекта. Кроме этого НСГ достаточно информативно и при этом портативно. В основе НСГ лежит определение эхоплотности мозга по сравнению с нормальной эхогенностью с учетом возраста пациентов. При тяжелом поражении наблюдается типичная картина, характерная для острого отека мозговой ткани - повышение эхогенности отдельных областей головного мозга [7, 36].

Однако информация о конвекситальной поверхности мозга, мозжечка, задней черепной ямке недостаточна и практически недоступна для объективного определения тяжести поражения. Также есть трудности при визуализации мелких некрозов, определении выраженности глиоза и демиелинизации, визуализации парасагитального повреждения головного мозга. Указанные обстоятельства, в целом, снижают диагностическую ценность НСГ.

Использование компьютерной томографии находит широкое применение в неонатологической практике. Растущая чувствительность этого метода, относительная техническая простота и скорость проведения исследования являются неоспоримыми преимуществами данного метода. Однако возможность дифференцировки анатомических структур у новорожденных остается еще недостаточной.

Использование магнитно-резонансной томографии является более сложной и дорогой процедурой, по сравнению с компьютерной томографией. Этот метод нейровизуализации, требует дополнительного аппаратного

обеспечения и оборудования для проведения обследования у новорожденных, а использование седативных средств - необходимость присутствия анестезиологов, что ограничивает применение этого исследования [158].

Электроэнцефалография (ЭЭГ) считается одним из самых распространенных методов ранней функциональной оценки головного мозга при патологии различного генеза, в том числе гипоксически-ишемического [10, 34, 47, 48]. Электроэнцефалографию предлагается использовать для прогноза формирования ДЦП. Есть работы, показывающие, что раннее выявление определенных патологических изменений при ЭЭГ коррелирует с развитием ДЦП [68].

Использование в практической медицине современных методов лабораторных исследований позволило улучшить диагностику поражений ЦНС, оценить эффективность проводимых лечебных мероприятий и проводить прогнозирование исходов у детей. Определение молекулярных маркеров поражения ЦНС в крови и ликворе привело к расширению диагностических возможностей. В настоящее время используют высокочувствительные специфичные тесты с целью определения концентрации углекислого газа в крови пуповины, факторов плазменного гемостаза, активности процессов окисления липидов, различных нейроспецифических белков [3, 57, 74].

Нейроспецифические белки (НСБ) – это группа белков, которые являются специфическими для клеток ЦНС. Нейроспецифическим белкам отводится важная роль в координации внутриклеточных процессов и межклеточных взаимодействий, регуляции функционального созревания и морфологического развития ЦНС. Регистрируя содержание нейроспецифических белков в биологических образцах, можно оценить факт поражения ЦНС, и определить выраженность такого повреждения.

Идентифицировано несколько десятков таких белков: глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) и белок S-100 β – экспрессирующиеся

астроглией; альфа2-глобулин мозга – маркер олигодендроглии; клатрин – внутриклеточный белок, участвующий в эндоцитозе клеток НВЕ; тубулин из которого построены микротрубочки клеток; кальмодулин – внутриклеточный кальций-связывающий белок; ассоциированный с микротрубочками белок 2 (MAP2), нейронспецифическая енолаза (NSE) и ядерный белок NeuN – маркеры нейронов; нейрогранин и нейромодулин – маркеры повреждения синапсов; эндотелиальный барьерный антиген (ЕВА), sPECAM1 – маркеры эндотелиоцитов микрососудов [3, 8, 10, 21, 25, 41-43, 51, 52, 73].

Возрастающая в клинической практике популярность применения методов регистрации нейроспецифических белков обусловлена достаточно высокой эффективностью, специфичностью и чувствительностью, использованием малых объемов сыворотки и/или ликвора необходимыми для исследования [32, 145]. А также с развитием методов лабораторной диагностики [24, 25, 39 348, 353, 512]. Лимитирующим фактором может выступать относительно высокая стоимость исследования, особенно с учетом необходимости проведения динамических исследований [10]. При этом содержание нейроспецифических белков в биологических образцах может зависеть от характера и тяжести повреждения ЦНС, гестационного возраста, степени зрелости новорожденного, наличия сопутствующей инфекционной и неинфекционной патологии [43, 77].

До настоящего времени сохраняются определенные трудности при интерпретации результатов исследования уровня большинства НСБ, что обусловлено отсутствием общепринятых нормативных показателей содержания в различных биологических образцах [145, 323, 352, 442].

Неоспоримым преимуществом исследования содержания НСБ является возможность оценки морфофункционального состояния клеток ЦНС в динамике развития патологических изменений в острый, подострый и восстановительный периоды. Таким образом, результаты регистрации содержания маркеров повреждения ЦНС в совокупности с клиническими и

параклиническими методами обследования пациентов позволяют назначить адекватную терапию и корректировать ее в случае необходимости.

Нейропротективные и терапевтические фармакологические подходы к перинатальной патологии ЦНС до настоящего момента являются предметом многочисленных исследований, дискуссий и крайне противоположных мнений и рекомендаций.

Например, существуют предложения полного отказа от применения лекарственных препаратов, и использование только охранительного режима и физиотерапевтических процедур. Либо, наоборот, предлагается использование большого перечня медикаментозных препаратов, что приводит к полипрагмазии. Достаточно часто рекомендуются ноотропные и сосудодобивные препараты, гормоны и ростовые факторы, блокаторы NMDA-рецепторов, антибиотики и антагонисты кальция. Отдельным новым направлением можно считать применение клеточных технологий при терапии патологии ЦНС, в том числе и перинатальной ГИЭ [105, 284, 290, 413, 493, 441].

Одним из важных и не всегда легких вопросов является выбор момента начала применения фармакотерапевтической терапии [435]. Дело в том, что в зависимости от периода заболевания меняется цель терапевтических воздействий. Например, в ранний период повреждения ЦНС, целью лечения можно обозначить активацию и поддержание собственных репаративных процессов, обеспечение адекватного кровообращения и обмена веществ в ЦНС. В восстановительный период цель терапии - оптимизация функциональной активности сохранившихся структур мозга [268, 317, 475].

В целом, терапия перинатальной гипоксически-ишемической патологии включает целый ряд мероприятий, направленных на основные этиопатогенетические механизмы, а также коррекцию возникших нарушений [78]. Эти мероприятия включают в себя обеспечение адекватной вентиляции легких и перфузии мозга, поддержание адекватного кровообращения, охранительный режим, использование глюкозы и ноотропных препаратов

для улучшения энергетического обеспечения ЦНС. Проводится нейропротекция и профилактика таких осложнений, как геморрагический синдром, отека мозга, судороги [63, 68].

Имеющиеся в распоряжении неврологов, неонатологов и педиатров протоколы ведения перинатальной ГИЭ не всегда удовлетворяют существующие интересы и потребности, что можно видеть по высокой распространенности патологии и ее последствий [22]. Таким образом, поиск и разработка новых перспективных направлений в лечении перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС является актуальной целью многих исследователей.

В основе поиска новых эффективных нейропротекторных стратегий лекарственных препаратов, может лежать идентификация и изучение основных механизмов развития в незрелом мозге нарушений вследствие перенесенной гипоксии-ишемии. Особенностью незрелой ЦНС является, то, что ответ и реакция на медикаментозную терапию происходит иначе, по сравнению со зрелой.

Фармакотерапевтические препараты, которые достаточно эффективно используются для терапии и коррекции патологии ЦНС у взрослых, очень часто оказываются не эффективными или даже приводят к ухудшению состояния у новорожденных. Это связано с активацией апоптоза, некроза клеток, либо с нарушениями обеспечения клеток мозга субстратами и энергией. Примером могут служить антагонисты глутамата, которые достаточно эффективно используются при лечении инсультов во взрослой практике [101, 399]. При этом, именно незрелость ЦНС обеспечивает нейропротективный эффект препаратов, действующих за счет ингибирования апоптоза и активации нейрогенеза [312, 545].

1.5 Ключевые механизмы патогенеза ишемического повреждения клеток нейроваскулярной единицы головного мозга

Выделяют два периода или фазы при развитии гипоксически-ишемического повреждения ЦНС. Первая фаза носит название - фаза ишемии. В ишемическую фазу в областях головного мозга, которые подверглись ишемии, преобладают процессы некротической гибели клеток. Вторую фазу называют реперфузионной. В это время, в областях, выходящих за пределы зоны поражения, наблюдается выраженный апоптоз клеток. Фаза реперфузии начинается через 1,5-2 часа после развития гипоксии-ишемии. Именно это время характеризует наличие терапевтического окна, когда происходящие в ткани головного мозга изменения могут быть полностью компенсированы [28, 72, 204].

Фаза ишемии

Гипоксически-ишемические влияния вызывают запуск цепной реакции, в результате которой превалирует анаэробный тип гликолиза, развивается дефицит внутриклеточного АТФ и метаболический ацидоз. Снижение концентрации АТФ внутри клеток НВЕ, является причиной дисфункции АТФаз, что вызывает деполяризацию мембран, и способствует избыточному проникновению в цитоплазму ионов натрия. Вслед за ионами натрия внутрь клеток устремляется вода. Развивается цитотоксический отек и лизис клеток. В первую очередь, описанные события происходят с нейронами.

Впоследствии развиваются нейровоспалительные реакции и «глутаматный удар». Влияние глутамата на ионотропные рецепторы приводит к повреждению нейронов и изменению экспрессии коннексинов астроцитами. Коннексины участвуют в обеспечении межклеточного взаимодействия в пределах НВЕ. Кроме этого они опосредуют ответные клеточные реакции при гипоксическом воздействии.

Собственно нейровоспалительные реакции наблюдаются вследствие того, что внутри клеток начинается формирование специфических белковых олигомерных структур – инфламмасом. Инфламмасы стимулируют секрецию клетками провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-18, ИЛ-33), что и запускает нейровоспаление. Кроме этого инфламмасы участвуют в регуляции феномена аутофагии и апоптотической гибели клеток.

В области развившегося нейровоспаления запускается ферментативный каскад с повреждением нейрофиламентов клеток и появлением разрывов клеточной мембраны. В итоге этих процессов на мембранах клеток образуются вздутия - развивается блеббинг. Наблюдается высвобождение мембранных микрочастиц, которые обладают высоким антигенным и прокоагулянтным действием.

Активация фосфолипазы приводит к гидролизу фосфолипидов мембран, секреции арахидоновой кислоты и продукции сосудорасширяющих простагландинов. Расширение сосудов микроциркуляции, в итоге, усиливает реперфузию и вызывает отек головного мозга.

Изменения экспрессии клетками различных белков имеет большое значение в патогенезе повреждения НВЕ. Установлено, что астроциты экспрессируют два типа транспортеров глутамата, относящихся к SLC1-семейству (SLC1A3/EAAT-1 и SLC1A2/EAAT-2). SLC1 транспортеры отвечают за уменьшение во внеклеточном пространстве глутамата и обеспечивают его транспорт через ГЭБ и тем самым проявляют свое нейропротективное действие [147, 251].

В самом начале ишемической стадии транспортер SLC1A2 захватывает глутамат в межклеточном пространстве, транспортирует его внутрь астроцитов и оказывает нейрон-протективный эффект. Позже было установлено, что при длительной ишемии происходит переключение работы транспортных систем на выведение глутамата из астроцитов и усиление нейротоксического эффекта [96]. В незрелой ЦНС число рецепторов к

глутамату больше, чем в зрелой, а высокая активность NMDA-рецепторов обладает нейропротективным эффектом, в отличие от зрелого мозга.

Преобладание процессов некроза над апоптозом в ишемической фазе объясняют резким уменьшением внутриклеточных энергетических запасов, а также запуском окислительно-восстановительных реакций и изменением активности каспаз, что в совокупности усиливает выраженность некроза клеток.

В клетках, которые находятся на периферии эпицентра очага повреждения, уже в этой стадии регистрируется начальный апоптоз. Ранний старт апоптотической гибели клеток вызван повреждением митохондриального аппарата и влияниями цитокинов с провоспалительной активностью.

В момент повреждения клеток из них высвобождается АТФ и НАД⁺, что вызывает активацию пуриnergических механизмов и НАД⁺-конвертирующих ферментов – наблюдается изменение энергетического метаболизма в клетках НВЕ.

Взаимодействия между клетками НВЕ, находящимися в очаге гипоксии-ишемии претерпевают ряд изменений. Особенно интересными можно назвать взаимодействия между клетками, осуществляемые пуриnergическими P2X7 рецепторами и коннексинами. В начале ишемической фазы, во время повышения внутриклеточного содержания АТФ происходит многократное увеличение активности P2X7 рецепторов, а также их гиперэкспрессия клетками. При этом наблюдается развитие апоптоза нейронов и нейровоспаления [126, 300].

В своей работе Heinrich A. с соавторами, установил, что P2X7 рецепторы принимают участие при активации NLRP2 инфламмасом [328]. При этом триггером для сборки инфламмасом служит избыток внутриклеточного АТФ. Это происходит за счет избыточной секреции клетками НВЕ ИЛ-1 и ИЛ-18 [374].

Активированные астроциты определенное время являются источником повышенного синтеза АТФ, который высвобождается во внеклеточное пространство. Также активация астроцитов сопровождается открытием коннексиновых каналов. Таким образом, секреция астроцитами АТФ имеет черты «самоподдерживающегося» процесса за счет работы P2X7-рецепторов и коннексинов.

В присутствии глутамата, а также активированной микроглии этот процесс многократно усиливается и ускоряется. Итогом реализации такого механизма межклеточных взаимодействий является повреждение и последующая гибель нейронов [184]. В таком случае P2X7 рецепторы можно обозначить в качестве молекул-мишеней для терапевтического воздействия. Доказано, что использование блокаторов P2X7 рецепторов способно уменьшить клеточную гибель при гипоксически-ишемическом повреждении ЦНС [421].

Итак, в патогенезе повреждения НВЕ можно обозначить основные механизмы и мишени для терапевтического воздействия:

- Механизмы транспорта и метаболизма глутамата;
- Внутриклеточные сигнальные пути, опосредующие клеточные реакции при гипоксическом воздействии;
- Механизмы нейровоспаления, окислительно-восстановительные реакции и цитолиз [43, 60, 147].

Фаза реперфузии

В фазу реперфузии происходит частичное восстановление кровоснабжения пораженной области головного мозга. При этом может произойти усугубление патологических изменений, то есть прогрессирование повреждения. Прогрессирование повреждения связано с увеличением продукции активных форм кислорода и резким повышением содержания ионов кальция. Развитие реперфузии вызывает каскад молекулярных реакций, развивающихся в определенном порядке.

1. Избыток кальция и синтез свободных радикалов.

Избыточная генерация активных форм кислорода развивается, в основном, при восстановлении транспорта кислорода в поврежденные клетки на при сохраняющейся дисфункции электрон-транспортной цепи в митохондриях. В сочетании с развившимся в предыдущую фазу дефицитом энергетических субстратов, кислород индуцирует активность кальциевых каналов. Увеличивается поступление ионов кальция, что приводит к секреции глутамата из клеток. Концентрация глутамата во внеклеточном пространстве увеличивается и активируются NMDA-каналы. Вследствие активации последних внутри цитозоля клеток происходит дальнейшее повышение концентрации кальция в цитозоле и усиливается синтез свободных радикалов. Результатом происходящих событий является активация кальций-зависимых ферментных систем.

2. Повышение концентрации свободного железа.

Изменение кислотно-основного баланса, которое произошло еще во время гипоксической фазы, приводит к освобождению внутриклеточного железа, которое в физиологических условиях связано с белками клеток НВЕ. Во время реперфузии, когда увеличивается приток кислорода в ткани, свободное железо индуцирует реакцию Фентона. Вследствие этого дополнительно синтезируются свободные радикалы [204].

3. Активация NO-синтазы.

Один из свободных радикалов - оксид азота, является продуктом ферментативных реакций опосредованных ферментом - синтазой оксида азота (NOS). Известно, что в организме синтаза оксида азота присутствует в нескольких формах. В зависимости от тех клеток, в которых ее обнаружили, выделяют нейрональную, астроцитарную и эндотелиоцитарную. Клетки микроглии способны активировать NOS, что наблюдается при избытке ионов кальция внутри клеток.

Доказано, что эндотелиальная форма фермента (eNOS) обладает нейропротективным эффектом. Нейропротективное действие eNOS, связано с усилением кровообращения [400, 405].

Однако при избытке NOS, которое характерно для реоксигенации после перенесенной перинатальной гипоксии-ишемии происходит резкое увеличение продукции оксида азота. Такое избыточное содержание NO связано именно с активностью эндотелиальной изоформы фермента и поддерживается активированными лейкоцитами, которые активно мигрируют через поврежденный ГЭБ из крови в паренхиму головного мозга. Кроме этого, как было указано ранее, собственная активированная микроглия способствует стимуляции eNOS [174]. Избыточное содержание NO способствует образованию токсичного пероксинитрита и продолжающемуся повреждению ЦНС [40, 256].

4. Развитие нейровоспаления.

Через 3-12 часов после восстановления реоксигенации можно наблюдать старт воспалительных изменений. Воспалительная реакция индуцируется образовавшимися ранее свободными радикалами. Сохраняется избыточная концентрация глутамата. Происходит увеличение активности и содержания цитокинов с провоспалительной активностью. Чаще других указываются интерлейкины [1, 6, 8, 10] и ФНО [217, 345].

Однако, есть указания, что в начале развития нейровоспаления преобладают противовоспалительные цитокины и, как следствие, реализуемый им противовоспалительный эффект. В ситуации тяжелой гипоксии-ишемии или в случае длительного гипоксического воздействия проявляются эффекты провоспалительных цитокинов. Провоспалительные цитокины совместно с ионами кальция, свободными радикалами, глутаматом, FasL, FasR, DR5 стимулируют клеточную гибель [41].

Продукты деградации внутриклеточных белков дополнительно активируют инфламмосомы и вызывают усиление и прогрессирование начавшихся воспалительных реакций. Некоторые исследователи установили,

что процессы нейровоспаления могут сохраняться в областях головного мозга после гипоксии-ишемии в течение длительного времени - несколько месяцев. Указанное обстоятельство способствует обширному поражению ткани мозга, утяжеляет общее состояние, обуславливает отсроченное развитие неврологического дефицита [166, 349, 518].

5. Активация апоптоза.

Как было сказано выше, индукция апоптоза происходит уже в ишемическую фазу. После реоксигенации и реперфузии процессы апоптоза продолжают. Учитывая особенности незрелого мозга, заключающиеся в более высокой чувствительности к апоптозу по сравнению со зрелым, происходит дополнительное повреждение клеток ЦНС [436]. При этом апоптоз индуцируется различными механизмами.

Например, для апоптоза нейронов характерно первичное повреждение синаптических связей и контактов. Это приводит к изменению ионного гомеостаза и нарушением рецепции различных нейротрансмиттеров. В итоге усиливается разобщение взаимодействий между клетками [50].

В последние годы, как индуктор апоптоза, активно изучается гипоксия-индуцибельный фактор (HIF-1). При этом роль указанного фактора не однозначна в патогенезе гипоксически-ишемического поражения. HIF-1 считается одним из главных регуляторов клеточного ответа, который развивается при гипоксии. В условиях нормоксии HIF-1 принимает участие в энергетическом метаболизме. Под влиянием HIF-1 зафиксировано усиление активности и экспрессии на клетках транспортеров глюкозы. В цитоплазме увеличивается содержание ферментов гликолиза. Так как HIF-1 способствует усилению экспрессии VEGF, то становится несомненной роль фактора в ангиогенезе. Доказано стимулирующее влияние на продукцию эритропоэтина. В целом, можно сказать, о нейропротективном действии HIF-1 в физиологических условиях.

Но при этом доказано наличие и нейротоксического эффекта у HIF-1. Избыточная активность или повышенная концентрация HIF-1 в незрелой

ЦНС приводит к повреждению клеток ЦНС. Нейротоксический эффект обусловлен влияниями фактора на p53. Доказано что p53 стабилизируется и активируется под влиянием HIF-1. Установлено угнетение продукции трофических факторов, и пролиферативной активности клеток. Следствие таких влияний - усиление апоптоза [449].

HIF-1 участвует не только в реализации апоптоза, но и индуцирует некротическую гибель клеток. Усиление некротических изменений происходит за счет повышения внутриклеточной концентрации кальция и нарастания отека мозга [140, 436].

Непосредственная активность HIF-1 контролируется NAD^+ -зависимыми ферментами, которые могут менять его активность. Интересно, что сам фактор является объектом воздействия деацетилазной активности сиртуинов SIRT1 и SIRT6, которые способствуют инактивации HIF-1 [310, 496, 522, 523].

Учитывая опосредованную зависимость активности HIF-1 от NAD^+ можно предположить о сопряжение HIF-1 и щелевых каналов и полуканалов. В качестве примера можно обозначить коннексин-43, который участвует в транспорте NAD^+ . Вполне очевидным становится еще один из возможных механизмов межклеточной коммуникации в пределах НВЕ, опосредованный HIF-1. Доказательством такой точки зрения может служить факт того, что HIF-1 усиливает экспрессию фермента никотинамидмононуклеотидаденилилтрансферазы (NMNAT), который является ключевым ферментом синтеза NAD^+ в клетках ЦНС [227, 242].

Резюмируя изложенную информацию, логично предположить, что для развития повреждения ЦНС после гипоксически-ишемического воздействия характерны определенные особенности гибели нейронов, которая реализуется через апоптоз и некроз. В короткий временной интервал (до 12 часов) после повреждающего воздействия начинается апоптоз, но при этом исследователи зафиксировали небольшое число клеток вступивших в апоптоз. Однако можно выдвинуть предположение, что не очень

выраженные апоптотические изменения могут быть объяснены торможением процесса апоптоза и доминированием некротических изменений.

Через 12 часов от повреждения происходит усиление апоптотических изменений. Такой факт объясняется достаточно просто – происходит уменьшение внутриклеточного содержания энергетических субстратов [29, 50]. Безусловно, как самые чувствительные к энергетическому дефициту, первыми страдают нейроны. Нарушения жизнедеятельности астроцитов тоже наблюдается, но в значительно меньшей мере.

6. Изменение активности факторов роста

Многие патогенетические события идут одновременно и параллельно. После перенесенной гипоксии-ишемии, помимо повышения концентрации АФК и запуска нейровоспалительных реакций наблюдается уменьшение активности нейротрофических факторов, а также их экспрессии. В целом это вызывает угнетение процессов нейрогенеза.

Репаративные возможности незрелой ЦНС могут зависеть как от количества, так и активности нейротрофических факторов роста. Снижение продукции, наряду с угнетением активности таких факторов вносит значительный вклад в развитие патогенетических изменений перинатального гипоксически-ишемического повреждения головного мозга. Причем недостаток факторов роста или нейротрофических факторов может поддерживать патологические изменения в ЦНС несколько недель и быть причиной развития отдаленных последствий [209, 297, 375, 526].

Известно несколько трофических факторов, имеющих большое значение в патогенезе гипоксически-ишемического повреждения. Наиболее часто называют VEGF, BDNF и CNTF.

Основная роль названных выше факторов в ЦНС заключается в регуляции функциональной активности клеток нейрональной и астроглиальной природы. Они обеспечивают особенности нейро-астроглиального взаимодействия и трофику нейронов. Доказано

стимулирующее влияние на миграцию прогениторных клеток, а также на процессы дифференцировки и созревание нейронов и астроглии [12].

Безусловно, что в фазу реперфузии происходит и репарация повреждения. Активируются процессы нейрогенеза и синаптогенеза. Зафиксировано усиление ангиогенеза. Эти процессы начинаются под воздействием клеток локального микроокружения. Эти клетки активно продуцируют факторы роста, цитокины, гормоны, которые модулируют процессы пролиферации и миграции клеток. А впоследствии способствуют дифференцировке и созреванию клеток.

В результате исследования Shruster A. с соавторами, показано, что в фазу реперфузии наблюдается индуцирование Wnt-сигналинга. Wnt-сигналинг участвует в регулировании процессов пролиферации и миграции клеток-предшественниц в головном мозге. Обсуждается возможность влияния Wnt сигнального пути на дифференцировку клеток после перенесенной гипоксии-ишемии [98, 556, 561]. В целом доказано прямое усиливающее влияние Wnt-сигналинга на репаративный нейрогенез.

Стимуляция ангиогенеза, наряду с увеличением пролиферативной активности клеток и ускорением созревания эндотелиоцитов и за счет Notch-сигналинга убедительно показана некоторыми исследователями [103, 484].

Таким образом, Wnt- и Notch-сигнальные пути могут рассматриваться как потенциальные мишени и для исследования механизмов репарации ЦНС и уменьшения последствий перенесенной гипоксически-ишемической патологии ЦНС.

Кроме этого, для высокоэффективной фармакологической коррекции нарушений, происходящих в фазу реперфузии, можно обозначить нормализацию содержания внутриклеточного кальция, восстановление митохондриальных функций, борьба с окислительным стрессом и активными свободными радикалами, управление апоптозом клеток, уменьшение реакций нейровоспаления и, безусловно, стимуляцию процессов репарации ЦНС.

Все вышеперечисленные события проходят на уровне НВЕ. При этом наблюдается несколько характерных процессов.

1. Повреждение базальной пластинки.

В результате развития гипоксии наблюдается разрушение базальной пластинки и экстрацеллюлярного матрикса. В клетках НВЕ происходит изменение конформация молекул адгезии. Итогом перечисленных процессов является появление локальных отеков. Возможно развитие кровоизлияний в месте повреждения, что и обуславливает частое сочетание гипоксического и геморрагического повреждения ЦНС [170, 264, 484, 564]. Указанные изменения начинаются в фазу ишемии и продолжаются в фазу реперфузии. Однако для фазы реперфузии характерно усиление деградации базальной пластинки. К усугублению деградации приводят дополнительные факторы, например, повышенная активность ферментов класса протеаз – матриксных металлопротеиназ (ММП) [341, 361].

При активации или усилении экспрессии ММП-9 происходит деградация экстрацеллюлярного матрикса и базальной мембраны. Это связано с тем, что ламинин, входящий в их состав является субстратом для желатиназ. Взаимодействие коллагеназ с коллагеном IV типа приводит к его деградации и вызывает увеличение области повреждения, изменению проницаемости ГЭБ. Итогом указанных процессов является отек головного мозга [172, 402, 430, 549].

2. Изменения взаимодействий между нейронами и астроцитами.

Несмотря на то, что нейроны считаются первыми клетками, которые повреждаются при ГИЭ, имеются достаточные доказательства того, что самыми первыми клетками, реагирующими на патологический процесс, являются астроциты. Реакция церебральных эндотелиоцитов и нейронов начинается несколько позднее. При этом астроглиальные клетки, достаточно долго не испытывают повреждения, по сравнению с нейронами.

Гипоксически-ишемические влияния на клетки астроглиального происхождения вызывают разный эффект, отличающийся от фазы

заболевания. В фазу ишемии можно наблюдать очень быструю и массивную гибель зрелых клеток, за счет некротических процессов, с одновременным ускорением пролиферативной активности молодых клеток и их быстрой дифференцировкой. Такая картина наблюдается очень долго, несколько недель.

В это же время астроциты усиленно экспрессируют транспортеры глутамата и монокарбоксилатные транспортеры, белки лекарственной резистентности и фермент глутамин-синтазу. Указанные транспортные белки проявляют защитное действие по отношению к нейронам, защищая их от эксайтотоксических эффектов, в том числе отсроченных, и уменьшают проникновение из крови в мозг различных токсинов и метаболитов [84, 124, 131, 445].

Особенностью астроцитов является более высокая устойчивость к гипоксически-ишемическим влияниям, по сравнению с другими клетками НВЕ. Такая резистентность связана с особенностями астроцитарного энергетического метаболизма, а именно преобладанием гликолитической активности. Еще один механизм связан с особенностями экспрессии молекулы CD38 и молекул, которые участвуют в транспорте НАД⁺, например, астроцитарный коннексин-43 [60].

Именно коннексины обеспечивают сопряжение астроцитов между собой. Щелевые контакты являются способом взаимодействия астроцитов между собой. Им отводится большая роль в передаче между астроцитами ионов металлов, молекул воды, глутамата, НАД⁺ и АТФ. А коннексины регулируют активность щелевых контактов. В астроцитах основными коннексинами считаются, коннексин-30 и коннексин-43.

Роль коннексинов в патогенезе перинатальной гипоксии-ишемии достаточно важна. Ряд исследователей доказал, что при гипоксическом воздействии и/или ишемическом поражении наблюдается усиление экспрессии коннексинов. У животных, нокаутных по коннексину-43, выраженность апоптотических изменений и проявления воспалительных

изменений значительно выше [183, 185, 291, 369, 423]. Подавление функциональной активности коннексинов (например, блокаторами) вызывает неблагоприятные исходы при ишемии ЦНС [205].

Таким образом, особенности межклеточных астроцит-астроцитарных взаимодействий, опосредованные коннексинами обеспечивает более высокую устойчивость астроглиальных клеток к гипоксически-ишемическим влияниям.

Однако есть альтернативная точка зрения, постулирующая, что активность коннексинов способна привести к усилению повреждения клеток, удаленных от эпицентра повреждения, т.е. увеличить зону поражения. При этом блокада коннексинов способна проявить нейропротективный эффект. Так, в исследовании Giaume C. с соавторами показано, что блокада щелевых контактов или коннексинов, привела к протективному эффекту в ситуации ишемии головного мозга [126, 357]. Этот факт можно объяснить тем, что щелевые полуконтакты способствуют распространению проапоптотических сигналов и ионов кальция между астроцитами.

Изменения активности астроцитов при гипоксии-ишемии связаны и с изменениями метаболизма самих клеток. Ускорение пролиферативной активности незрелых астроцитов, как было указано выше, длится несколько недель. Но при продолжающемся дефиците субстратов энергии и кислорода в клетках выраженность пролиферативной активности нивелируется [117, 270]. А в сочетании с гиперпродукцией избытка АФК, высокой концентрацией глутамата и кальция отмечается индукция апоптоза [397, 521, 271]. Начало апоптоза вызывает дополнительную секрецию глутамата в межклеточное пространство. Один из механизмов повышения секреции глутамата астроцитами связан с гиперэкспрессией коннексинов [29, 50, 60, 491]. Глутамат, как было описано ранее, интенсифицирует эксайтотоксичность и цитотоксичность, вызывает повышение концентрации кальция внутри клеток. В свою очередь, кальций индуцирует активацию внутриклеточной NOS. Как указывалось выше, активность NOS считается

основной причиной гиперпродукции пероксинитрита и продуктов перекисного окисления.

Свободнорадикальные соединения активно взаимодействуют с мембраной клеток, в том числе и мембраной митохондрий, инициируют апоптоза. Постепенно развивается снижение, а в последующем полное истощение НАД⁺. Результатом развившегося дефицита НАД⁺ является дисфункция фермента полиАДФ-рибозилполимеразы НАД-зависимых белков сиртуинов. Фермент PARP контролирует репарацию ДНК. Роль НАД-зависимых сиртуинов заключается в регуляции ацетилирования белков. В целом, уменьшение содержания НАД⁺ вызывает нарушения работы внутриклеточных репаративных ферментных систем, для работы которых необходима НАД⁺.

3. Изменения эндотелиальных клеток.

Начальные патологические эволюции церебрального эндотелия регистрируются достаточно рано – в течение первого часа после гипоксии-ишемии. В эндотелиоцитах инициируется апоптоз из-за активации каспазного каскада и фрагментации ДНК.

Через 8 часов нарушается межклеточное взаимодействие эндотелиоцитов между собой, вследствие деградации белков плотных контактов. К концу вторых суток наблюдается пик указанных событий [160]. Это сопровождается патологическим изменением проницаемости ГЭБ. Кроме деградации белков плотных контактов к нарушению целостности эндотелиального слоя приводит и непосредственная деструкция эндотелиальных клеток. В совокупности эти события увеличивают проницаемость ГЭБ. Все происходящие с эндотелиоцитами изменения связаны с перечисленными выше событиями: избытком ионов железа и кальция, действием свободных радикалов и активностью матриксных металлопротеиназ различных классов [215, 320, 558].

Наряду с происходящими деструктивными изменениями эндотелиоцитов, происходит гиперэкспрессия и усиление активности

отдельных транспортных систем. В первую очередь это касается транспортеров, которые обеспечивают экструзию токсинов - Pgp и SLC-белков. В связи с тем, что функционирование некоторых транспортеров зависит от доступности источников энергии, то при длительной кислородно-энергетической депривации цитопротективные эффекты быстро истощаются.

В результате повреждения эндотелиальных клеток происходит высвобождение внутриклеточных ферментов, биологически активных веществ и молекул. Эти молекулы и вещества, например, NO и цитокины, оказывают на астроцитарные коннексины модулирующий эффект, индуцируют апоптоз астроглии, вызывают нарушения метаболического сопряжения нейронов и астроцитов [269, 385].

Для многих исследователей интерес представляет ситуация, связанная с избыточно высокой активностью, в условиях гипоксии-ишемии, малых ГТФаз эндотелиальных клеток, в частности Ras1. В условиях нормоксии Ras1 проявляет положительное влияние на поддержание плотных межэндотелиальных контактов, а также контактов между эндотелием и внеклеточным матриксом. То есть активность Ras1 ограничивает проницаемость ГЭБ. При развитии гипоксически-ишемического повреждения ЦНС Ras1 проявляет совсем другие эффекты - негативные. Например, Ras1 избыточно активизирует NOS, инициирует и потенцирует апоптоз клеток. Доказано, что в условиях недостатка кислорода и энергии Ras1 ответственна за снижение активности нейротрофических факторов, а также уменьшает их синтез клетками. В такой ситуации вещества-ингибиторы Ras1 проявили себя как нейропротекторы. При их применении зафиксировали повышение концентрации нейротрофических факторов и уменьшение проявлений апоптоза [482, 528, 454].

Можно заключить, что все компоненты нейроваскулярной единицы находятся в плотном анатомическом контакте и сложных функциональных взаимоотношениях. Изменения, происходящие в результате гипоксически-ишемического влияния, затрагивают всю НВЕ целиком. Внутриклеточные

могут иметь одновременный или отсроченный старт. Но в любом случае, даже при асинхронном характере развития повреждения, клетки НВЕ реагируют на действие патогенного фактора, что найдет отражение в изменении функционирования других клеток ГЭБ/НВЕ и головного мозга в целом.

Основные механизмы межклеточной метаболической коммуникации представлены на рисунке 2.

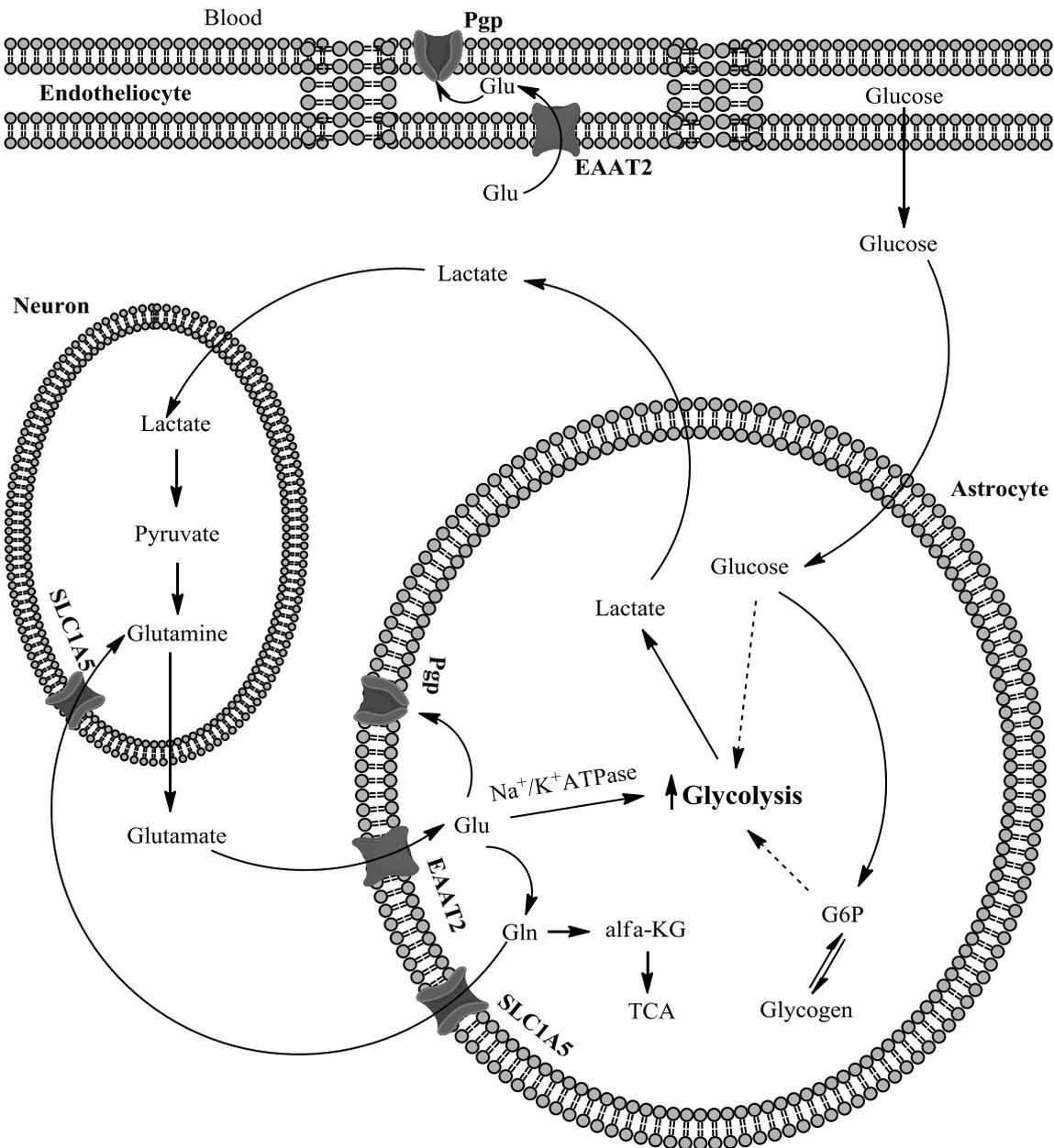


Рисунок 2 – Глутамин-глутаматный цикл НВЕ (Alfa-KG – α -кетоглутарат, ТСА – цикл трикарбоновых кислот, G6P – глюкоза-6-фосфат)

Особенности строения и межклеточной коммуникации между компонентами нейроваскулярной единицы вызывает повышенный интерес к особенностям функционирования гематоэнцефалического барьера в физиологических и патологических условиях со стороны биологов, физиологов, патофизиологов, провизоров, клиницистов, специалистов по клеточным технологиям. В настоящее время существует широкий спектр возможностей изучения молекулярно-клеточных особенностей патогенеза заболеваний ЦНС.

1.6. Изменения энергетического метаболизма развивающегося головного мозга при ишемии

Под энергетическим метаболизмом мозга понимают активность митохондрий, а также внемитохондриальных механизмов продукции энергии в клетках НВЕ (преимущественно митохондриальная генерация АТФ в нейронах и церебральных эндотелиоцитах, гликолитическая – в астроглии). Так, интенсивность гликолиза зависит от активности функционально сопряженных с астроглией нейронов, либо наличия патологических процессов (гипоксия, гипогликемия, воспаление). Интересно, что интенсивность гликолиза в астроцитах контролируется синаптической активностью, так как нейроны способны использовать лактат астроцитов в качестве дополнительного энергетического субстрата (т.н. нейрон-астроглиальное метаболическое сопряжение) [142, 336].

Метаболизм глюкозы в ЦНС в период новорожденности имеет некоторые принципиальные отличия от взрослых людей. Доказано, что активность синапсов в развивающемся мозге напрямую регулирует интенсивность энергетического метаболизма. Кроме этого уровень метаболических процессов отличается в различных отделах головного мозга и зависит от степени этих отделов. Кроме этого, энергетическим субстратом для нейронов у новорожденных, помимо глюкозы, является молочная

кислота, а также кетоновые тела. Основными белками, транспортирующими глюкозу и кетоновые тела в ЦНС, являются интегральные мембранные белки семейств GLUT и MCT. При этом наблюдается интересная ситуация, заключающаяся в том, что в раннем перинатальном периоде снижена утилизация глюкозы в пользу потребления мозгом лактата и, отчасти, кетоновых тел [135, 337]. Например, у крыс в период новорожденности, утилизация глюкозы клетками ЦНС достигает всего 10% от такового у взрослых особей. При этом экспрессия GLUT-транспортеров клетками очень низкая. Но при этом недостатка энергии не наблюдается. Это связано с тем, что дефицит утилизации глюкозы в первые недели компенсируется повышенной утилизацией кетоновых тел. Это доказывается и высокой экспрессией клетками ГЭБ транспортера кетоновых тел - MCT1. В первые две недели MCT1 обнаруживается в большом количестве и на других клетках нервной ткани. Интересно, что транспортер MCT2 обнаружен только на клетках нейрональной природы [226, 516]. В отличие от зрелого мозга, в незрелом обнаружена возможность транспорта лактата через ГЭБ в прямом и обратном направлении. То же самое можно сказать и о кетоновых телах. Иными словами, лактат, который интенсивно образуется в клетках ЦНС при гипоксии, достаточно быстро может быть утилизирован в раннюю стадию реперфузии. Наблюдается достаточно интересная ситуация, когда даже незначительная гиперкетонемия, развивающаяся, например, при проведении инъекций, постановке катетеров или осмотре, способствует защите ЦНС при гипоксически-ишемическом воздействии, путем обеспечения дополнительного поступления энергосубстратов (кетоновых тел) в клетки мозга. Так как астроциты могут изменять GLUT1 эндотелиальными клетками, то можно сделать заключение о регуляторной роли астроглии на транспорт глюкозы из крови в мозг через ГЭБ [137].

С использованием экспериментальной модели поражения ЦНС гипоксически-ишемического генеза на лабораторных животных доказано значительное увеличение мРНК GLUT1, которое было зафиксировано уже

через 1 час после инсульта. Интересно, что при у крыс при унилатеральном поражении головного мозга через 4 часа зафиксировано увеличение транспортеров GLUT1 и GLUT3 на 20%, в обоих полушариях. Одновременно с этим наблюдалось повышение концентрации глюкозы в обоих полушариях головного мозга [225]. Известно, что у новорожденных животных при гипоксически-ишемическом поражении гипергликемия является защитным механизмом и обеспечивает нейропротекцию. Такая ситуация абсолютно не характерна для зрелого мозга взрослых животных, когда гипергликемия способствует дополнительному повреждению [418, 548].

Резюмируя указанные особенности, можно констатировать, что для ЦНС новорожденных характерна относительная недостаточность механизмов, ответственных за транспорт глюкозы, с компенсаторным увеличением потребления лактата и кетоновых тел. То есть повышение лактата, до определенного момента, можно рассматривать в контексте компенсаторных процессов.

Особенности энергетических потребностей нейронов и клеток астроглии определяют разную чувствительность этих клеток к патологическому влиянию гипоксии-ишемии. Астроциты являются клетками, которые более устойчивы к развитию гипоксии по сравнению с нейронами, но их повреждение, а также повреждение олигодендроцитов, можно зафиксировать в самом начале ишемического повреждения. При этом астроциты достаточно долго находятся в компенсированном состоянии, что связано с энергетического обмена и функционированием митохондрий. Выраженность снижения дыхательной цепи в митохондриях астроглии значительно меньше, чем в нейронах [308, 538].

Весьма интересной представляется роль митохондрий в механизмах нарушений энергетического обмена в астроцитах и нейронах при гипоксии-ишемии. Интересной является исследование, которое доказало, что активность митохондрий в нейронах влияет на особенности активности синапсов, а также на процессы нейропластичности [365, 535]. В

эксперименте *in vitro*, выделенные из клеток мозга митохондрии, продемонстрировали свою гетерогенность при реакции на действие модуляторов МРТ-мегаканалов митохондрий. Так, циклоспорин А блокирует МРТ-мегаканалы только в астроцитах, при этом не обладает влиянием на нейрональные. Активность МРТ-мегаканалов при развивающемся нарушении аэробной продукции АТФ регулирует энергетически зависимые процессы астроглии. Например, может наблюдаться уменьшение использования энергии или наоборот, резкое повышение, что приведет к ионному дисбалансу, избытку свободных радикалов, нарушению гомеостаза кальция и гибели клеток [186, 460]. Учитывая особенности нейрон-астроцитарного лактатного транспорта, можно констатировать, что при открытых МРТ-мегаканалах преобладает цикл Кребса, а не гликолитический синтез АТФ и происходит снижение захвата нейронами лактата. В ситуации избыточной активности МРТ-каналов наблюдается набухание митохондрий, происходит экструзия цитохрома *c* во внутриклеточное пространство, запускается апоптоз, усиливается анаэробный гликолиз и продукция активных форм кислорода, а также развивается метаболический ацидоз. Учитывая эти особенности, можно сделать вывод, что при перинатальном повреждении ЦНС возможно развитие отсроченного нарушения энергетического обмена. В экспериментах на 7-дневных крысятах установлено, что в основе такого феномена лежит первичная деструкция клеток, вызывающая в последствие дефицит энергии в мозге [507].

Одновременно с этим известно, области головного мозга, где наблюдается усиленный метаболизм, являются наиболее чувствительные к гипоксии-ишемии. Именно в этих областях и наблюдаются самые первые патологические изменения - кора головного мозга, базальные ганглии. То есть при повышении метаболизма в указанных областях в условиях гипоксии-ишемии, впоследствии у детей наблюдался неврологический дефицит. Среди детей, с благоприятными исходами гипоксически-

ишемической энцефалопатии подобных особенностей обмена глюкозы и усиления локального метаболизма не наблюдалось [156].

В экспериментах на животных были получены подобные результаты. Участки усиленного метаболизма глюкозы обнаружены у новорожденных крысят при экспериментальной гипоксии-ишемии. Выдвинута теория, что уровень метаболизма глюкозы напрямую ассоциирован с активностью глутаматергических синапсов. Это доказывается тем, что рецепция и транспорт астроцитами глутамата связан с ко-транспортом натрия. Уменьшение накопления и захвата натрия клетками обеспечивается за счет энергии гликолиза. Лактат, образующийся в процессе гликолиза захватывается нейронами и используется как субстрат энергии [338].

Подобные процессы наблюдаются в перисинаптических астроцитах, в которых при анаэробном гликолизе синтезируется АТФ. АТФ расходуется для захвата астроцитами глутамата из синапса. После проникновения глутамата в астроцит происходит его конверсия в глутамин.

Помимо всего прочего в высоких концентрациях глутамат может выступать в качестве дополнительного энергетического субстрата.

В ситуации развития перинатальной гипоксически-ишемической энцефалопатии локальное усиление метаболизма глюкозы в ЦНС могут указывать на повышение высвобождения глутамата в синапсы в участках ЦНС с гиперметаболизмом [499].

Известно, что активность ферментов глутаматдегидрогеназы и аминотрансфераз, которые участвуют в конверсии глутамата в 2-оксоглутарат, для дальнего участия в цикле Кребса, достаточна для замены глутаматом глюкозы, как субстрата в клетках астроглии. В случае умеренной концентрации глутамата в астроцитах, в пределах 0,01-0,1 ммоль/л, происходит метаболизм глутамата до глутамина. В случае высокого содержания глутамата в клетках, он метаболизируется в цикле Кребса, т.е. является энергетическим субстратом [478, 499]. Однако до настоящего времени не четко обозначены особенности транспорта глутамата клетками

астроглиальной в областях мозга, подвергшихся гипоксическому повреждению, связанные с феноменом эксайтотоксичности.

1.7. Развитие феномена эксайтотоксичности

Ряд авторов считает, что механизм эксайтотоксичности является критичным для незрелого мозга. Это связано с тем, что в физиологическом состоянии процессы модулированной возбуждающей стимуляции нейронов оказывают выраженный трофический эффект. Эффект эксайтотоксичности реализуется за счет избыточной глутаматергической нейротрансмиссии, которая вызывает гибель клетки. С использованием модели асфиксии *in vivo* у свиней было доказано, развитие ранней дегенерации транспортера GLUT 1 астроцитами стриатума и, впоследствии, развитию нейродегенеративного процесса [507]. При асфиксии в ситуации, когда глутамат избыточно накапливается и превышает критический уровень, происходит гиперактивация NMDA-рецепторов, что способствует повышению содержания кальция в цитоплазме клеток и запускает кальций-зависимые механизмы дегенерации клеток.

Собственно NMDA-рецепторы участвуют в регуляции морфофункционального становления пластичности ЦНС, стимулируя пролиферативную активность и миграцию прогениторных клеток, а также развитие синапсов нейронов. Клетки астроглии принимают участие в глутаматергической сигнализации за счет нескольких видов рецепторов. Это ионотропные, метаботропные рецепторы и транспортеры глутамата [263, 564]. Примечательно, что строение NMDA-рецепторов у новорожденных имеет некоторые отличия от взрослых. Например, в NMDA-рецепторах присутствует несколько субъединиц. NR1 субъединица отвечает за формирование функциональных лиганд-зависимого ионных каналов. NR2 субъединица определяет фармакологические качества рецептора, а субъединица NR3 за биофизические. Постепенно, в процессе созревания головного мозга наблюдается изменение экспрессии субъединицы NR2, а

также ее структуры. Наблюдается постепенное снижение, в течение 2 недель, уровня субтипа 2B в NR2 субъединице и повышение субтипа 2A, что соответствует строению рецептора взрослого типа. Такое изменение соотношения субтипов 2A:2B в субъединице NR2 соответствует изменению свойств рецептора. И, частично, объясняет более высокую чувствительность незрелого мозга к гипоксически-ишемическому повреждению, когда наблюдается повышение тока ионов Ca^{2+} , во время активации глутаматом NMDA-рецепторов [128, 147, 198].

Непосредственно функциональная активность NMDA-рецепторов обеспечивается процессом фосфорилирования субъединиц рецептора. Например, активация ионного канала регулируется фосфорилированием аминокислоты тирозина, что приводит к изменению взаимодействий аминокислоты с белками постсинаптической мембраны, а также молекулами, ингибирующими сигналинг. При созревании мозга в физиологических условиях наблюдается повышение активности фермента тирозинкиназы синапсов, что соответствует увеличению фосфорилирования остатков тирозина в рецепторах. В условиях гипоксии-ишемии зафиксировано повышение экспрессии и активности тирозинкиназ постсинаптической мембраны, что можно представить как раннюю ответную реакцию ткани зрелого мозга на повреждение.

У крыс в возрасте 1 недели при гипоксически-ишемическом воздействии наблюдалось изолированное снижение экспрессии NR2A субъединиц, без изменения экспрессии и активности субъединицы NR2B. Однако на ранней стадии реперфузии наблюдалась активация фосфорилирования именно субъединицы NR2B. В более старшем возрасте (21 сутки постнатального развития) наблюдалось увеличение фосфорилирования тирозина в обеих NR2 и NR2B субъединицах во время гипоксии-ишемии. При этом отсутствовало снижение уровня субъединицы NR2A, но произошло снижение экспрессии NR2B субъединицы после реперфузии.

Именно указанные взаимоотношения и особенности экспрессии NR субъединиц и особенности изменений их фосфорилирования лежат в основе свойств NMDA-каналов и определяют суть комплексного механизма развития феномена эксайтотоксичности в условиях развития гипоксии-ишемии. Особенности строения NMDA-рецепторов, в целом, определяют чувствительность незрелой ЦНС к избытку глутамата и глутаматергической стимуляции рецепторов [101].

Известна роль глутаматных рецепторов в развитии повреждения белого вещества головного мозга у недоношенных детей. Такое повреждение объясняют наличием NMDA-рецепторов на незрелых олигодендроцитах белого вещества. В настоящее время, олигодендроциты, экспрессирующие NMDA-рецепторы, рассматривают, как клетки-мишени для разработок новых терапевтических подходов при лечении перивентрикулярной лейкомаляции [239, 276].

Интересно, что кортикальные астроциты в функционально активных NMDA-рецепторах экспрессируют субъединицу NR3, что обуславливает аккумуляцию внутриклеточного кальция этими клетками. Накопление цитоплазматического кальция является необходимым для регуляции активности синапсов близлежащих нейронов. Кроме этого кортикальные NR3 иммунопозитивные астроциты принимают участие в дегенерации олигодендроцитов и белого вещества мозга при гипоксии [280, 425]. Одновременная экспрессия этими клетками AMPA-рецепторов позволяет сделать вывод о том, что они активируются, преимущественно, при воздействии повышенных концентраций внеклеточного глутамата, а это, в свою очередь, имеет особое значение при развитии феномена эксайтотоксичности гипоксически-ишемического генеза [125, 221, 410]. Принимая во внимание факт того, что экспрессия клетками астроглии глутаматных рецепторов имеет регионспецифический характер, то невозможно до конца установить механизмов регуляции активности

нейронов и нейрон-астроцитарных взаимодействий в патогенезе поражения зрелого и развивающегося головного мозга.

Кроме рецепторов глутамата, клетки астроглии экспрессируют транспортеры глутамата (EAAT). На астроцитах обнаружены два подтипа транспортеров. В различных отделах головного мозга обнаружен разный уровень экспрессии глутаматных транспортеров, что и обуславливает разную чувствительность к ишемическому поражению [219, 222]. Интересно, что в эксперименте с использованием экспериментальных грызунов, нокаутных по транспортеру EAAT3, преобладали нейродегенеративные процессы [499]. В эксперименте по угнетению активности астроцитарного EAAT2 транспортера зафиксировано негативное влияние на размеры пораженной области мозга при ишемии у животных экспериментальной группы. При этом установлена четкая корреляция размеров участка поражения с клиническими проявлениями неврологического дефицита. При этом авторы убедительно объясняют эффекты глутамата. В самом начале астроцитарный EAAT2 связывается с внеклеточным глутаматом и транспортирует его внутрь клетки. То есть реализуется нейропротективный эффект. Однако в ситуации продолжающейся ишемии происходит реверсия глутаматного транспорта. Повышается выделение глутамата астроцитами во внеклеточное пространство, и реализуется эффект нейротоксичности [219, 222]. Выдвинуто предложение, что рецепция, захват и метаболизм глутамата астроцитами могут рассматриваться, как патогенетически обоснованные точки приложения при разработке нейропротективной стратегии [405, 436]. Однако остаются вопросы, связанные с ролью различных подтипов транспортеров глутамата нейронов и астроцитов в патогенезе гипоксически-ишемического повреждения головного мозга.

Известно, что на глутаматергическую нейротрансмиссию непосредственно влияет изменение нейрон-астроцитарного транспорта лактата. Накопление молочной кислоты во внеклеточном пространстве способно усиливать эксайтотоксичность [135]. Так как при активации

нейронов происходит усиление захвата и метаболизма лактата, продуцируемого нейронами, клетками астроглии, то именно на сохранении возможности астроцитов в постишемическом периоде, по сравнению с нейронами, лежит основная роль в развитии нарушений межклеточных взаимодействий. Таким образом, дисбаланс между продукцией лактата нейронами и утилизацией его астроцитами лежит в основе дизрегуляции глутаматергической сигнализации.

Внутри клеток под воздействием активированных рецепторов глутамата, происходит выброс кальция из клеточных депо и активация нейрональной NO-синтазы (nNOS) с последующим образованием свободных радикалов, развитием митохондриальной дисфункции и высвобождением белков с проапоптотической активностью в цитоплазму из матрикса митохондрий.

В целом, механизмы нейродегенерации, обусловленные нарастанием «глутаматной волны» в незрелой ЦНС, однотипны со зрелой. Особенностью незрелой ЦНС является присутствие нейронов, которые активно продуцируют оксид азота и при этом являются устойчивыми к гипоксии-ишемии и эксайтотоксичности. По мере созревания ткани мозга такие нейроны утрачивают резистентность к таким воздействиям. В областях головного мозга, где экспрессируется большое количество NMDA-рецепторов, обнаружено избыточное число нейронов, экспрессирующих nNOS. Учитывая этот факт, можно объяснить различную чувствительность отдельных областей ЦНС в определенные возрастные периоды. То есть соотношение количества NMDA-рецепторов и nNOS- иммунопозитивных клеток отвечает за особенности чувствительности ткани мозга к патологическим воздействиям. Например, в ситуации, когда перед гипоксически-ишемическим воздействием в незрелой ткани мозга экспериментально вызывали разрушение nNOS-иммунопозитивных нейронов и постсинаптического комплекса, т.е. уменьшали синтез NO, произошло уменьшение объема ишемического очага и уменьшение тяжести исходов.

При этом астроциты и нейроны по-разному реагируют на эффекты NO. Это можно объяснить протективным действием АТФ, которая генерируется в астроцитах при гликолизе и отсутствует в нейронах [275, 343].

Важным компонентом эксайтотоксичности является накопление кальция внутри клеток. Избыток кальция вызывает дисфункцию нейрональных митохондрий и нарушение метаболизма астроцитарного глутамата. Доказано, что в незрелом мозге избыток кальция в цитоплазме клеток является основным повреждающим фактором [250, 426]. Транспорт ионов кальция внутрь астроцитов реализуется через натрий-кальциевый обмен и активностью коннексинов. Коннексиновые каналы способствуют транспорту ионов кальция, калия и глутамата между астроцитами. Известно, что при отсутствии коннексинов в астроцитах, выраженность апоптоза и воспалительной реакции значительно выше [184].

Основным коннексином астроцитов является коннексин-43 (Cx43). Этот коннексин в мембранах некоторых астроглии вступает во взаимодействие с эктоферментом CD38, который обладает НАД⁺-гликогидролазной и цАДФР-синтазной активностью.

Под действием этого фермента из НАД⁺ синтезируется вторичный посредник – цАДФР, происходит мобилизация кальция из депо и активируются каналы эндоплазматического ретикулума, сопряженные с рианодиновыми рецепторами [197, 207]. Рианодиновые рецепторы играют существенную роль в реализации процесса миграции астроцитов, в том числе при патологии ЦНС [333, 417]. В экспериментах, в которых производили функциональное разобщение CD38 с коннексинами, в клетках, экспрессирующих CD38⁺ зафиксировали снижение внутриклеточной концентрации кальция. Найденный феномен можно объяснить снижением межклеточной передачи НАД⁺. Согласно такой модели, у НАД⁺ прослеживается гормоноподобная функция, реализующаяся после высвобождения из клеток через коннексиновые «полуканалы». При этом происходит стимуляция активности CD38, так как НАД⁺ является

субстратом этого фермента. Установлено, что под действием протеинкиназы С происходит фосфорилирование коннексина-43, который теряет НАД⁺-транспортную активность. Указанное свойство дополняет механизм ауторегуляции коннексинов. Увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме активирует кальций-зависимую протеинкиназу С, что приводит к фосфорилированию коннексина-43 и нивелирует его транспортную функцию относительно молекулы НАД⁺. Такая ауторегуляция позволяет снизить потери НАД⁺ клетками и избежать истощения внутриклеточного НАД⁺ вследствие чрезмерной активности CD38, а также повышения концентрации кальция до цитотоксического уровня [89, 466]. Кроме того, известно, что истощение внутриклеточного НАД⁺ вызывает дисфункцию митохондрий и апоптоз клеток [494]. Можно сделать предположение, что активация НАД⁺-конвертирующих ферментов в клетках, например, поли(АДФ-рибозил)полимеразы или АДФ-рибозилциклазы/CD38 может быть ограничивающим фактором при регуляции электровозбудимости нейронов и способствует сохранению жизнеспособности клеток головного мозга.

Принимая во внимание эти данные, можно представить, что одновременное сокультивирование астроцитов с нейронами способствует повышению экспрессии молекулы CD38 на плазматической мембране астроцитов, а также внутриклеточно. Эту особенность можно объяснить действием на астроциты глутамата, который высвобождается активированными нейронами [466]. С другой стороны, повышение содержания внутриклеточного кальция в астроцитарных клетках вызывает выход из них глутамата. Астроцитарный глутамат, попавший в межклеточное пространство, может вызывать модуляцию синаптической передачи сигналов между нейронами [338]. Еще одним интересным феноменом, который наблюдается при увеличении цитоплазматической концентрации кальция в астроцитах, является то, что кальций опосредует регуляцию локальной микроциркуляции [213, 486]. Изменение локальной

микроциркуляции является значимым компонентом патогенеза развивающихся при гипоксии-ишемии гемодинамических нарушений.

Если учесть факт того, что экспрессия коннексинов в различных тканях организма меняется в ходе онтогенеза [261], то можно предположить наличие коннексин-опосредованного трансклеточного переноса низкомолекулярных соединений, ионов и метаболитов в ЦНС, которое может иметь уникальные особенности в период морфофункционального становления головного мозга.

Дисфункция митохондрий, которая приводит к развитию энергетической недостаточности в условиях гипоксически-ишемического состояния, напрямую связана повышенной продукцией активных форм кислорода, феноменом эксайтотоксичности и аккумуляцией кальция в цитоплазме клеток. Эти события оказываются еще более выраженными в фазу реперфузии и имеют определенные особенности при перинатальном поражении ЦНС. В первую очередь это связано с тем, что в незрелой ЦНС прогениторные клетки, из которых впоследствии образуются преолигодендроциты и олигодендроциты очень чувствительны к кислородному голоданию и окислительному стрессу. Этот факт находит свое клиническое отражение в том, что у недоношенных новорожденных в большей степени повреждается белое вещество мозга. Во-вторых, в условиях перинатальной гипоксии-ишемии имеет место несовершенство метаболизма глутатиона. Об этом может свидетельствовать факт того, что гиперэкспрессия фермента супероксиддисмутазы приводит к более выраженному повреждению клеток головного мозга. Роль астроцитов в метаболизме глутатиона заключается в том, что уровень этого трипептида в нейронах поддерживается функциональной активностью клеток астроглии. А в астроцитах, при ишемии, нарушается синтез глутатиона, т.е. нарушается механизм обеспечения нейронов глутатионом. Кроме этого, уровень астроцитарного глутатиона необходим для снижения токсичности NO по отношению к нейрональным клеткам [243, 394]. Известно, что «глутаматный

каскад» индуцирует дисметаболизм глутатиона в нейронах и клетках астроглии. Так при увеличении концентрации внутриклеточного глутамата происходит угнетение захвата цистеина. Так как цистеин является компонентом глутатиона, то при уменьшении захвата его клетками происходит снижение биосинтеза глутатиона.

Помимо вышеперечисленных особенностей, феномен эксайтотоксичности коррелирует с развитием таких процессов, как некроз и апоптоз клеток. Вариант развития некроза или апоптоза определяется, в определенной степени, сохранностью функций митохондрий в поврежденных клетках. Нейрональный апоптоз инициируется разрушением синаптических ансамблей, нейрон-астроглиальных взаимоотношений, нарушением рецепции нейротрансмиттеров. При этом наблюдается нарушение гомеостаза внутриклеточных ионов [294]. Была продемонстрирована эффективность нейропротекции при подавлении NMDA-опосредованной сигнализации. Авторы использовали ингибиторы каспазы-3 в целях угнетения NMDA-опосредованной сигнализации, что привело к уменьшению гибели клеток головного мозга при гипоксии-ишемии у 7-дневных крысят [147].

Нарушение функции митохондрий и энергетического обмена в клетках НВЕ влияют на характер развивающейся нейродегенерации. Глубокие нарушения функции митохондрий и абсолютный дефицит энергии приводят к развитию некроза. В случаях, когда сохраняется часть митохондриальных процессов, то возможно завершения программы апоптоза клеток. Исследования гипоксически-ишемического поражения *in vivo* на новорожденных кроликах выявили, что в коре и базальных ганглиях, находится максимально количество клеток в состоянии апоптоза. Такая особенность наблюдалась на протяжении недели после воздействия. У 7-дневных крысят, подвергшихся гипоксически-ишемическому влиянию, клетки в состоянии апоптоза были зафиксированы во всех областях ЦНС, в отдельных регионах более половины клеток с признаками нейродегенерации

имели признаки апоптоза. В большинстве регионов головного мозга были обнаружены клетки в состоянии апоптоза и некроза. Для этих клеток характерной чертой являлось одновременное наличие морфологических признаков некроза и апоптоза. Подобные клетки были обнаружены также после введения лабораторным животным эксайтотоксинов и в экспериментах по изучению травматического воздействия на незрелую ЦНС новорожденных кроликов. Появления клеток с признаками одновременного апоптоза и некроза может быть итогом эксайтотоксичного каскада [106, 514].

В экспериментальной модели гипоксии-ишемии *in vivo* на 7-суточных крысах доказано, что максимальные проявления апоптоза характерны для зоны СА3, таламуса, зубчатой извилины, эпиталамуса. Пик изменений приходится на первые – третьи сутки после патологического воздействия, после чего выраженность изменений постепенно уменьшается. Однако в коре головного мозга, базальном ганглии проявления апоптоза увеличивалась намного раньше - через 12 ч. В этих же регионах ЦНС изменения сохранялись на высоком уровне намного дольше – одну неделю [324].

Обнаруженную гетерогенность изменений можно объяснить асинхронностью старта апоптоза клеток, особенностями астроцит-нейрональных и астроцит-эндотелиальных взаимодействий в различных областях головного мозга.

Гипоксически-ишемическое воздействие, приводящее к развитию апоптоза, а не некроза в незрелом мозге имеет ряд особенностей. Во-первых, в незрелой нервной системе максимально интенсивно протекают процессы физиологической гибели клеток. Например, от 20 до 80% всех нейрональных клеток, которые появились в ходе эмбриогенеза, погибают к моменту достижения организмом зрелости [248, 486]. Учитывая эту информацию, интерпретация данных об интенсивности апоптотической гибели нейронов и астроцитов при гипоксически-ишемическом поражении требует большой доли осторожности. Во-вторых, наличие существенной разницы в метаболизме астроглии и нейронов обеспечивает и объясняет разную

чувствительность клеток к влиянию проапоптотических стимулов: более высокая характерна для нейронов и низкая для астроцитов. Примером разницы метаболизма нейронов и астроцитов является, преобладание продукции АТФ в результате гликолиза в последних.

Особенности нейрон-астроглиального сопряжения, митохондриальных процессов, энергетического обмена, в целом, определяют реализацию феномена эксайтотоксичности в незрелом мозге.

1.8. Перспективы лекарственной терапии гипоксически-ишемического повреждения у новорожденных

Одна из задач раннего старта интенсивной терапии перинатальной гипоксически-ишемической энцефалопатии заключается в обеспечении максимально быстрого начала и последующего доминирования репаративных процессов и ограничении зоны поражения. Эффективность компенсаторных процессов зависит не только от новых средств лекарственной терапии, в том числе и новых, но и, в определенной мере, от момента времени ее применения [290]. Эксперименты с использованием лабораторных животных продемонстрировали, что нельзя напрямую переносить результаты исследований, посвященных эффективности лекарственных препаратов у зрелых людей в педиатрическую практику. Незрелая ЦНС иным образом реагирует и отвечает на медикаментозную терапию. Терапия, применяемая у взрослых с целью уменьшения выраженности и объема повреждения головного мозга, зачастую показывает обратный эффект у новорожденных, потенцируя апоптоз и гибель клеток. Доказано, что блокаторы NMDA- или ГАМК-рецепторов вызывают индукцию апоптоза в мозге новорожденных кроликов. Одновременно с этим существуют данные, что при блокаде ионных каналов, активность которых связана NMDA-рецепторами, в случаях применения их превентивно или в ближайшее время после инсульта способствуют нейропротекции.

Экспериментальным путем доказано, что «терапевтическое окно» для эффективной терапии ограничено двумя, максимум шестью часами после перенесенной гипоксии-ишемии. Более позднее применение блокаторов NMDA-рецепторов оказывается неэффективным.

Некоторые препараты, например мидокалм, закись азота, изофлуран, применяемые в неонатальный период с целью анальгезии, вызывают стойкое снижение способности к обучению, что убедительно доказали эксперименты, в которых их использовали у 7-дневных крыс. Аллопуринол, дефероксамин, иминобиотин, применяемые сразу после развития инсульта, оказывали положительное действие, прерывая патологический процесс в ЦНС, вызванный свободными радикалами. Назначение топирамата в комбинации с гипотермией блокирует эффект эксайтотоксичности и благоприятно влияет на последствия перинатального поражения ЦНС гипоксического генеза у кроликов. Лекарственная терапия, назначаемая с учетом степени зрелости ЦНС, а также ее чувствительности к окислительному стрессу, индукции апоптоза позволит оптимально защитить мозг новорожденных [548].

Выяснение молекулярных механизмов развития клеточной гибели в развивающемся мозге после перенесенной гипоксии-ишемии может стать отправной точкой для разработки и внедрения в педиатрическую практику новых нейропротекторов. Вполне вероятно, что сочетание антагонистов NMDA-рецепторов с ингибиторами каспаз может обеспечить эффективное и продолжительное терапевтическое влияние на патологический процесс. Отдельным направлением терапевтической практики можно рассматривать ростовые и стимулирующие факторы, которые имеют доказанное протективное воздействие при перинатальной гипоксически-ишемической энцефалопатии. Такое протективное влияние реализуется за счет ингибирования апоптоза и стимуляции нейро- и ангиогенеза. Доказано благоприятное влияние эритропоэтина и нейротрофического факторов, которые участвуют в восстановлении поврежденной нервной ткани [255].

Описан нейропротективный эффект после применения глюкокортикоидов при поражении ЦНС. Но еще более выраженный нейропротективный эффект проявляется при предварительном применении глюкокортикоидов, т.е. до развития гипоксически-ишемического поражения. Также известно, что в условиях гипотермии эксайтотоксичный каскад значительно замедляется или даже прерывается, приостанавливается развитие апоптоза, снижается синтез токсических метаболитов. Механизм такого влияния гипотермии связан с замедлением энергетического метаболизма в клетках [493]. В исследования на *in vivo* установлено, что применение гипотермии в течение ближайших 2 часов после гипоксии-ишемии оказывает максимально выраженный нейропротективный эффект. Это же касается и профилактики функциональных расстройств ЦНС. Кроме этого зафиксировано увеличение «терапевтического окна». Однако общая продолжительность гипотермии должна составлять не менее 24 часов. Еще один терапевтический подход связан с эффектом прекондиционирования гипоксией. При этом наблюдается уменьшение выраженности повреждения ЦНС, за счет запуска эндогенных нейропротективных механизмов.

Итак, в настоящее время существуют возможности для разработки и использования стратегии нейропротекции при перинатальном гипоксически-ишемическом повреждении ЦНС на основе целенаправленного изменения активности механизмов, участвующих в обеспечении метаболического сопряжения и межклеточной коммуникации в пределах НВЕ [66, 171, 216]. Изучение механизмов функционирования НВЕ, определение роли белков, участвующих в межклеточной коммуникации (например, CD38, Cx43, EAAT2) и повреждении эндотелиальных клеток, нейронов и астроцитов при перинатальном гипоксически-ишемическом повреждении ЦНС является одной из основных задач, стоящих перед исследователями. Решение указанной задачи имеет как фундаментальное, так прикладное значение и позволит использовать принципиально новые подходы к нейропротекции и последующей коррекции процесса нейродегенерации. В практической

медицине, а именно, в педиатрической практике очень важно найти ответы на вопросы, связанные с изменением и управлением проницаемостью ГЭБ при различных заболеваниях: нейроинфекциях, ишемии головного мозга, токсическом поражении, нарушениях развития головного мозга, опухолях. Помимо развития патологической проницаемости, стоит проблема проникновения через ГЭБ из крови в ткань головного мозга фармакологических препаратов, которые назначаются с терапевтической целью [9, 37].

Очевидно, что новые фундаментальные знания о молекулярных особенностях функционирования ГЭБ (НВЕ) могут помочь разработать более эффективные клинические протоколы ведения беременных и новорожденных, а также модифицировать существующие протоколы доклинических исследований нейротропных лекарственных средств [10, 134, 422].

1.9 Модели нейроваскулярной единицы и гематоэнцефалического барьера

На протяжении десятков лет с целью исследования механизмов проницаемости ГЭБ, особенностей межклеточных взаимодействий и внутриклеточных процессов традиционно использовались животные [358, 364, 414, 551]. В настоящее время существуют четкие регламенты и достаточно жесткие ограничения для использования экспериментальных животных. Все более широкое применение находит применение клеточных культур, воспроизводящих ГЭБ/НВЕ *in vitro*.

Клеточные модели нейроваскулярной единицы *in vitro*

Современные модели *in vitro* представляют собой клеточные культуры клеток, входящих в состав НВЕ. Как правило, используют совместное культивирование астроглиальных и эндотелиальных клеток, так называемые

мультиклеточные модели. Но достаточно широко, в зависимости от цели исследования, могут применяться моноклеточные модели, где культивируется один вид клеток. В качестве исходного материала для формирования моделей *in vitro* предлагаются клетки церебрального происхождения и/или немозгового. Возможно сочетание клеток различного происхождения и даже от разных животных – комбинированные модели.

Благодаря развитию микрофлюидной технологии, в последние годы созданы клеточные модели ГЭБ/НВЕ с имитацией кровотока – динамические модели.

Моделирование НВЕ с использованием клеток немозгового происхождения может рассматриваться, как один из исторических этапов развития исследований ГЭБ. Как правило, указанные модели содержали монокультуру клеток эпителия или эндотелия [316]. Причем источником клеток служила не ЦНС, а другие органы и ткани, например, почки собак [225, 249, 386, 427]. Несколько позднее было предложено использовать клетки человека. При этом считается, что использование эндотелиоцитов пуповины человека (HUVEC) достаточно точно воспроизводит особенности эндотелиального слоя церебральных сосудов [495].

Со временем стало ясно, что использование клеток ЦНС намного лучше отвечает задачам исследователей. Поэтому появление протоколов выделения клеток головного мозга, в первую очередь эндотелиоцитов позволило повысить качество используемых моделей [85]. В восьмидесятых годах прошлого столетия появилась информация о роли астроцитов на формирование ГЭБ и функционирование эндотелиальных клеток [118, 202]. С этого времени очень широко стали использовать модели *in vitro*, в которых совместно культивировали церебральные эндотелиоциты и астроциты [118].

В настоящее время очень часто применяются клетки, полученные от животных [433], несколько реже клетки человека [245, 247].

Кроме непосредственного использования первично выделенных линий клеток используются и перевиваемые клеточные линии. Преимущество таких

линий заключается в возможности длительного их применения, быстрой пролиферации и относительной стандартизации по чистоте культуры и количеству клеток [167]. В качестве примеров можно привести линии крысиного церебрального эндотелия - RBE4 [383, 465, 554, 555], GP8 [513], а также эндотелиальных клеток человека - hСМЕС/D3 [94, 151, 200, 289, 460].

Совместное культивирование астроцитов и эндотелиоцитов считается оптимальной моделью *in vitro*, так как сочетает относительную простоту и высокую результативность большинства исследований [90, 93, 97, 438]. Одним из правил моделирования НВЕ *in vitro* является обеспечения межклеточных взаимодействий различных клеток [121, 189, 214, 287, 540, 565].

С появлением доказательств регуляторного влияния нейронов на функционирование НВЕ были разработаны модели с эндотелиоцитами, астроцитами и нейронами. В настоящее время в научной литературе можно найти информацию об использовании в составе модели *in vitro* перицитов, то есть четырехклеточных моделей.

Дальнейшее развитие клеточного моделирования НВЕ пошло по направлению использования в качестве исходного материала клеток-предшественников [377], а также индуцированных плюрипотентных клеток [244].

Использование клеток-предшественниц позволяет воспроизвести и изучить *in vitro* нейрогенез и ангиогенез, определить и охарактеризовать основные клеточные процессы, ответственные за формирование функций ГЭБ. Сам процесс формирования ГЭБ и регуляция его функций зависит от множества факторов: Wnt- и Notch- сигналинга, влияния катенинов, сиртуинов, трофических факторов, гормонов. Изучение влияние этих факторов способствует более глубокому пониманию особенностей патогенеза и репаративных процессов на уровне НВЕ при перинатальной патологии гипоксически-ишемического генеза [455, 464, 503, 553, 562]. Поэтому развитие клеточных моделей НВЕ *in vitro* направлено на облегчение

достижения поставленных исследователями задач и более точных результатов.

Доказано, что сокультивирование клеток-предшественников нейронов и церебральных эндотелиоцитов приводит к возникновению специфических функций последних и появлению барьерных свойств ГЭБ [80, 108, 298, 552]. В работе П. М. с соавторами продемонстрирована возможность использования клеток-предшественниц для изучения особенностей нейрогенеза и ангиогенеза [182].

Интересным предложением для получения всех клеток ЦНС является разработка протоколов на основе нейрональных прогениторных и плюрипотентных стволовых клеток [150].

Доказано, что примерно 5% нейрональных стволовых клеток способны трансформироваться в эндотелиальные [163, 453, 546]. Зная эти особенности можно использовать направленную дифференцировку стволовых клеток нейрональной природы нейроны, астроциты и эндотелиоциты. Но в настоящее время это еще сложная методологическая задача. Главным ограничивающим фактором является подбор оптимального состава культуральных сред, которые могли бы подойти для разных клеток. Еще одна проблема заключается в недостаточном знании об особенностях реализации межклеточных взаимодействий в подобных сокультурах *in vitro*.

Так как перед исследователями стоит задача формирования клеточной модели *in vitro* максимально соответствующей естественным условиям, воспроизводящей особенности межклеточного взаимодействия, учитывающей особенности взаимного влияния клеток НВЕ и эффектов гуморальных агентов, то перспективной является технология использования прогениторных клеток и клеток-предшественниц. С использованием моделей на основе указанных клеток возможно воспроизвести процессы барьерогенеза, уточнить влияние на свойства ГЭБ/НВЕ разнообразных гуморальных факторов и фармакологических модуляторов [282, 495, 458]. Также открывается перспектива разработки оптимальных условий

сокультивирования клеток НВЕ и получения клеточной модели с фенотипом и свойствами идентичных *in vivo* [381, 490].

Можно сказать, что методики выделения индуцированных плюрипотентных клеток обозначили новый этап развития науки в области неврологии и фармакологии, открыли новые подходы к развитию персонафицированного скрининга и изучения индивидуальных особенностей патологии ЦНС, разработке фармпрепаратов для терапии.

Очевидно, что «идеальная» модель НВЕ/ГЭБ *in vitro* должна удовлетворять нескольким важным критериям:

1. использование в рамках модели нескольких типов клеток, входящих в состав НВЕ и ГЭБ (например, церебральный эндотелий, астроглия, перициты, либо эндотелий, перициты);
2. возможность использования в составе модели клеток, полученных от животных или человека, с разным потенциалом к пролиферации и дифференцировке, на разных этапах онтогенеза;
3. легкость (пусть и относительная) воспроизведения модели (сборка модели из клеток-компонентов по своей сложности и затрате ресурсов должна быть сопоставимой с ожидаемыми результатами использования модели в эксперименте);
4. возможность регистрации ключевых параметров структурно-функциональной целостности ГЭБ *in vitro* (например, трансэндотелиального электрического сопротивления, допустимым уровнем которого в моделях *in vitro* считается 100 и более Ом*см², проницаемости барьера для веществ и комплексов с разной молекулярной массой (желтый люцифер, декстраны, липосомы и пр.);
5. возможность реализации модели в нескольких технологических вариантах (на чашке, на вставке с полупроницаемой мембраной, в микрофлюидной камере, с разными скаффолдами и пр.);
6. применимость модели для тестирования проникновения лекарственных средств и носителей через ГЭБ, для оценки клеточно-молекулярных

механизмов функционирования НВЕ и ГЭБ в (пато)физиологических условиях;

7. воспроизводимость модели (получение сопоставимых параметров функциональной активности клеток НВЕ/ГЭБ в каждой последующей серии).

Таким образом, создание новых моделей НВЕ/ГЭБ *in vitro* – одна из актуальных задач в современной патофизиологии и медицинской биоинженерии.

Заключение

Таким образом, выполненный анализ литературы по проблематике исследования указывает на важность проблемы перинатального поражения ЦНС в связи с высокой заболеваемостью, размытостью диагностических критериев нормы и патологии, существующими пограничными состояниями у новорожденных. Сама проблема перинатальной патологии ЦНС является медицинской и социальной проблемой, в том числе и по причине высокой инвалидизации детей. Все это убеждает в необходимости продолжения как клинических, так и экспериментальных исследований, направленных на понимание механизмов межклеточной коммуникации и энергетического сопряжения клеток НВЕ в условиях перинатального гипоксически-ишемического поражения. Фундаментальные исследования позволят прояснить механизмы отдельных метаболических событий в норме и патологии. Результаты таких фундаментальных исследований необходимо максимально быстро транслировать в лечебно-реабилитационные протоколы, создавая новые программы по сохранению здоровья и реабилитации пациентов. Патогенез ишемических повреждений в головном мозге новорожденного отличается от зрелого организма, что объясняет особые требования к выбору тактики ведения и лечения новорожденных.

Существует парадокс в том, что в последние годы повреждение мозга обсуждается на междисциплинарном уровне, но при этом сохраняется огромная пропасть между достижениями в области нейронаук, с одной

стороны, и их внедрением в клиническую практику у педиатров, неврологов, нейрофармакологов, реабилитологов. На сегодняшнем этапе развития фундаментальной и клинической медицины решение проблемы лежит в сфере развития исследований, базирующихся на оценке доклинических молекулярных событий и ориентированных на определение молекул-маркеров ранних нарушений развития головного мозга и молекул-мишеней для терапевтического развития. При этом огромный массив результатов исследований молекулярных событий, участвующих за развитие ЦНС в пато(физио)логических условиях, получен с использованием моделей *in vivo* и *in vitro*. Сам факт использования моделей не позволяет полностью переносить все результаты на человека. В любом случае нейрохимические, нейробиологические и поведенческие процессы человека более сложные и многогранные. Дополнить результаты, полученные на моделях, позволяют методы визуализации и оценки функциональной активности мозга [224], а также моделирование заболеваний *ex vivo* [444].

Расшифровка основных молекулярных и биохимических механизмов нарушения метаболизма, энергетического сопряжения и взаимодействий между клетками нейроваскулярной единицы при перинатальной гипоксически-ишемической энцефалопатии может обозначить перспективы разработки новых фармакотерапевтических методов нейропротекции и лечения нейрорегенерации. Новые знания о патофизиологии и эволюции гипоксически-ишемического повреждения мозга делает возможным разработку новых мероприятий по улучшению клинических исходов для новорожденных. В целом, исследования особенностей взаимодействия нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов в развивающемся головном мозге являются перспективными, интересными и востребованными направлениями нейрохимии, нейрофармакологии и неонатологии.

ГЛАВА II. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование состоит из экспериментальной и клинической частей.

Работа выполнена в ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (ректор – д.м.н., профессор И.П. Артюхов) на кафедре биохимии с курсом медицинской химии и НИИ молекулярной медицины и патобиохимии (заведующая кафедрой и руководитель НИИ – д. м. н., профессор А.Б. Салмина) совместно с кафедрой педиатрии института последипломного образования (заведующая кафедрой д.м.н., профессор Т.Е. Таранушенко). Клиническая часть исследования проводилась в КГБУЗ «ККК ЦОМД» (главный врач – врач высшей категории А.В. Павлов).

2.1. Объект и методы экспериментальной части исследования

В экспериментальной части научного исследования работа осуществлялась с использованием экспериментальных животных (модели *in vivo*) и клеточных сокультур астроцитов, нейронов и эндотелиальных клеток (модель *in vitro*).

Объект исследования *in vivo* - белые беспородные крысы мужского и женского пола (n=120), в возрасте 7-28 суток постнатальной жизни. Использование экспериментальных животных было одобрено биоэтической комиссией Локального этического комитета КрасГМУ (протокол №7 от «12» декабря 2011 г). Работы с использованием животных осуществлялись в соответствии с приказом Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977г. №755 (приложение «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных»), 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». Животные содержались в стандартных условиях при 12-часовом световом цикле в

специальном отапливаемом помещении с вентиляцией и освещением. Животные имели свободный доступ к корму и воде.

Методы исследования включали оценку неврологического статуса животных, микроскопические и иммуногистохимические исследования (таблица 1).

Таблица 1 – Методы экспериментальной части исследования.

Метод исследования	Количество обследованных животных	
	Опытная группа	Контрольная группа
Когнитивный тренинг и оценка нейроповеденческих функций: (неврологического статуса животных по шкале NSS; двигательной активности тестом «Открытое поле»; когнитивной функции тестом «Водный лабиринт Морриса»; тревожности и эмоциональности тестом «Приподнятый крестообразный лабиринт»).	80	40
Фенотипирование клеток НВБ с помощью маркеров клеток нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы	80	40
Иммуногистохимическая регистрация экспрессии CD38 клетками головного мозга	80	40
Иммуногистохимическая регистрация экспрессии коннексина-43 (Cx43) клетками головного мозга	80	40
Иммуногистохимическая регистрация экспрессии глиофибрилярного кислого белка (GFAP) клетками головного мозга	80	40
Иммуногистохимическая регистрация экспрессии нейронспецифической енолазы (NSE) клетками головного мозга	80	40
Иммуногистохимическая	80	40

регистрация экспрессии Р-гликопротеина (Pgp) клетками головного мозга		
Иммуногистохимическая регистрация экспрессии SLC1A5 клетками головного мозга	80	40

В опытной группе (n=80) были крысы с моделью перинатального гипоксически-ишемического поражения головного мозга. В дальнейшем было сформировано 5 экспериментальных подгрупп по 16 крыс в каждой.

Подгруппа P7' - головной мозг извлекался через 4 часа после гипоксически-ишемического воздействия.

Подгруппа P7 - головной мозг извлекался через 8 часов после гипоксически-ишемического воздействия.

Подгруппа P10 - головной мозг извлекался через 72 часа после гипоксически-ишемического воздействия.

Подгруппа P17 - головной мозг извлекался через 10 суток после гипоксически-ишемического воздействия.

Подгруппа P28 - головной мозг извлекался через 3 недели после гипоксически-ишемического воздействия.

Литерой «Р» обозначаются сутки жизни животного после рождения.

В контрольную группу вошли крысы с ложной операцией. Общее количество - 40 животных. Суть ложной операции заключалась в проведении хирургического доступа, с последующим закрытием раны, без моделирования перинатального гипоксически-ишемического воздействия. Также, как и в опытной группе было сформированы подгруппы- P7', P7, P10, P17, P28. В каждой группе было по 8 лабораторных животных.

Дизайн экспериментальной части исследования представлен на рисунке 3.

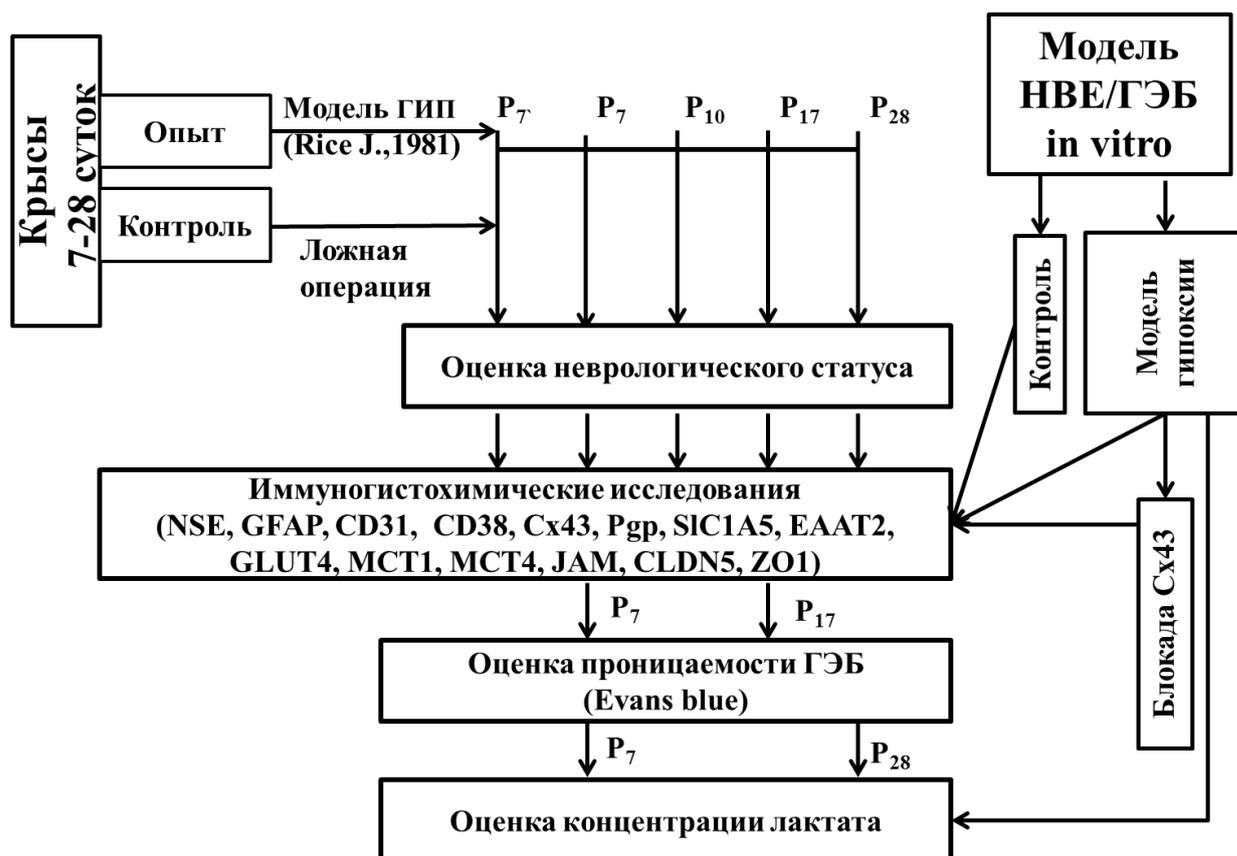


Рисунок 3 – Дизайн экспериментальной части исследования

2.1.1. Воспроизведение модели перинатального повреждения головного мозга гипоксически-ишемического генеза *in vivo*

В настоящем исследовании моделирование перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС *in vivo* осуществлялось в соответствии с протоколом предложенным J.Rice.

Объектом исследования стали 7-28-дневные крысята, поскольку принято считать, что гистологическое строение ткани мозга у животных указанного возраста соответствует с 32–34 неделям гестации у плода человека (P7 крысы) до 10-12 месяцев постнатального развития (P28 крысы) у детей [474].

Экспериментальным животным в возрасте 7 суток, после проведения анестезии проводилась экстравазальная окклюзия общей сонной артерии справа [470]. Все манипуляции проводились с соблюдением правил асептики

и антисептики. На операционном столе через срединный шейный разрез выделяли правую общую сонную артерию и проводили экстравазальную окклюзию. После формирования окклюзии производили закрытие операционной раны путем зашивания. Впоследствии крысы содержались в атмосфере с 8% содержанием кислорода при температуре 30°C в течение 60 минут. По истечении 1 часа животных возвращали к кормящей самке.

Крысам из контрольной группы после анестезии, проводили срединный шейный разрез с выделением правой общей сонной артерии и закрытие операционной раны. После чего животных возвращались к кормящей самке.

Через 4, 8, 72 часа, 10 и 21 день после гипоксически-ишемического воздействия в опытной и контрольной группах осуществлялся забор головного мозга для последующих исследований. Извлечение головного мозга проводилось путем декапитации после того, как крысы подвергались воздействию наркоза.

Для приготовления срезов выделенный головной мозг помещался в 40% раствор формальдегида, после чего готовились препараты тонких срезов.

2.1.2. Оценка неврологического статуса животных

Оценка симптомов неврологических нарушений у крыс проводилась на основе специализированной шкалы Neurological Severity Score (NSS), которая рекомендуется для тестирования и определения тяжести поражения ЦНС у лабораторных животных (таблица 2). Дополнительно, в возрасте 28 суток, оценивали особенности двигательной активности (время замирания, двигательной активности, наличие вегетативной дисфункции) в тесте «Открытое поле», когнитивную функцию (тест «Водный лабиринт Морриса»), тревожность и эмоциональность в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт». Все параметры нейроповеденческого статуса

регистрировались автоматически и затем анализировались с помощью программы для видеотрекинга ANY-maze (Stoelting Co., США) [532].

Таблица 2 – Критерии оценки неврологической симптоматики у экспериментальных животных.

Функция		Баллы	
		Оценка	Возможная сумма
Моторная			
Подвешивание за хвост	Сгибание передней конечности	1	3
	Сгибание задней конечности	1	
	Отклонение головы на более чем 10° от вертикальной оси в течение 30 сек	1	
Размещение животного на полу	Обычные движения	0	3
	Нарушение движения прямо	1	
	Отклонения движения в сторону поражения	2	
	Падения в сторону поражения	3	
Сенсорная			
Зрительный и тактильный тесты		1	2
Проприоцептивный тест		2	
Равновесие			
Стабильное положение тела на балансира, равновесие не нарушено		0	6
Захват балансира лапами		1	
Фиксация балансира и свисание одной лапы с балансира		2	
Захват балансира, свисание двух лап с балансира, или кружение на балансира более 1 минуты		3	
Падение с балансира через 40 секунд		4	
Падение с балансира через 20 секунд		5	
Падение с балансира менее чем за 20 секунд		6	
Аномальные движения арефлексия			
Рефлекс с ушной раковины		1	4
Роговичный рефлекс		1	
Вздрагивание		1	
Судороги, миоклонус, мышечная дистония		1	
Итого			18

Шкала Neurological Severity Score содержит перечень критериев, по которым оценивается двигательная активность, сохранность рефлексов, удержание равновесия и поведенческие реакции. Неспособность животного выполнить задание, а также при отсутствии тестируемого рефлекса присваивается один балл. При этом максимально возможная сумма баллов

варьирует от 2 до 6 в зависимости от теста. По общей сумме баллов определялась степень неврологической дисфункции: 13-18 баллов соответствует тяжелому повреждению; 7-12 баллов – средней тяжести; 1-6 баллов – умеренному повреждению [459, 532].

Степень тяжести неврологической дисфункции определялась по общей сумме баллов. Один балл при тестировании соответствует отсутствию тестируемого рефлекса либо невозможности выполнения задания животным. В зависимости от теста максимальное количество баллов может быть от 2 до 6.

Тест «Открытое поле» (ОП) используется для измерения локомоторного и тревожного поведения [345]. Открытое поле – квадратная коробка (600 × 600 × 200 мм), покрытая полипропиленовыми листами внутри. Очерчена центральная арена (300 × 300 мм). Каждое животное помещали в центр поля. Оценивали общую активность в открытой арене, время и пройденное расстояние в центральной зоне. После каждого испытания лабиринт очищали влажным полотенцем и 1% гипохлоритом натрия с последующей обработкой 70% спиртом и протиранием насухо.

Тест «Водный лабиринт Морриса» (ВЛМ) используется для оценки пространственного обучения и памяти. Лабиринт состоит из бассейна со скрытой платформой, погруженной чуть ниже поверхности воды. Во время теста животное учится выходить из воды, обнаруживая скрытую платформу. Платформа может быть перемещена во второй фазе эксперимента для изучения реакции животного на новую ситуацию. Крысят помещали в круглый лабиринт глубиной 50 см, наполненный теплой (30°C) непрозрачной (вода подкрашивалась сухим молоком) водой таким образом, чтобы уровень установленной на дне лабиринта платформы был на 1 см ниже уровня воды (диаметр платформы 10 см). Платформу помещали в одном из квадрантов бассейна, два источника света (ориентиры для животных) прикрепляли к тесту в фиксированных точках. Перед тестированием животных обучали в течение трех дней. В день осуществлялось по 4 попытки, между которыми

животное сидело по 20 секунд на платформе для запоминания места ее расположения. В течение каждой попытки крыса помещалась в одну из 4 фиксированных стартовых точек бассейна («север», «юг», «восток», «запад»). Через день расположение платформы менялось. На 4-й день обучения во время 4-й попытки оценивалось время достижения крысой платформы в секундах. Критерием нормального состояния когнитивной функции у крысят являлось достижение платформы, скрытой под водой, за 15 и менее секунд.

Эмоциональное поведение и тревожность крысят исследовались на установке «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) согласно протоколу верификации теста НПК «Открытая Наука» (Москва, Россия), помещенной в 1 метре от пола. При тестировании животное помещалось в центр лабиринта с проведением видеорегистрации и автоматической оценкой видеотрекинга (программа для видеотрекинга ANY-maze, Stoelting Co., США) в течение 10 минут. Оценивали путь, пройденный животным в тесте; число пересеченных линий; время пребывания в закрытых и открытых «рукавах», количество входов в закрытые и открытые «рукава», длительность нахождения животного и число входов в центральной части теста.

2.1.3. Клеточная модель нейроваскулярной единицы *in vitro*

Часть исследования проведена на клеточной модели нейроваскулярной единицы *in vitro*. В состав модели входило три вида клеток: нейроны, астроциты, эндотелиальные клетки. Источником клеток для формирования модели НВЕ *in vitro* были прогениторные клетки, получаемые из головного мозга эмбрионов крыс. Выделенные прогениторные клетки культивировались до формирования нейросфер. После образования достаточного количества нейросфер, проводилась их дифференцировка в

нейроны и астроциты. Эндотелиальные клетки изолировали из сосудов головного мозга крыс.

Протокол получения нейросфер и первичной культуры нейронов и астроцитов

Крысиные эмбрионы гестационного возраста E15-E18 (E0 – день имплантации в стенку матки) извлекались из самки и помещались на лед. Головной мозг извлекали из эмбрионов и переносили в культуральную чашку, содержащую раствор 2% глюкозы в PBS, рутинная процедура диссекции описана в источнике [162]. Отделяли кору головного мозга и гиппокамп в культуральной чашке с раствором 2% глюкозы в PBS на льду. Полученные кусочки ткани переносились в пробирку со свежим раствором 2% глюкозы в PBS и ждали осаждения кусочков ткани с последующим удалением супернатанта. После осаждения ткани ее ресуспензировали в 1 мл среды NeuroCult® NS-A Proliferation (StemCell, Канада) и тритурировали до получения однородной суспензии клеток и оставляли на 1 минуту для осаждения крупных кусочков тканей. Отделяли недиссоциированную ткань, забирали и переносили супернатант в новую стерильную пробирку. Проводили центрифугирование супернатанта при 150g (~1200 оборотов в минуту) в течение 5 минут. После центрифугирования проводили короткую тритурацию в свежей культуральной среде. Определяли количество клеток с помощью гемоцитометра. Также определяли количество жизнеспособных клеток с трипановым синим (разведение 1:5 - 1:10).

Выделенные из эмбрионального мозга прогениторные клетки плотностью 6×10^4 - $1,2 \times 10^5$ жизнеспособных клеток/мл засеивали в культуральные флаконы T-25 cm^2 в 10 мл культуральной среды. Использовали коммерческую пролиферативную среду производства StemCell (Канада) NeuroCult® NS-A Proliferation. В дальнейшем клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ и температуре 37°C.

Дифференцировка крысиных нейросфер в нейроны и астроциты

Через сутки инкубации наблюдали образование нейросфер. Нейросферы это конгломерат клеток, которые пролиферируют в виде сфероидов. Нейросферы отделяются от поверхности культурального флакона или свободно плавают в толще среды. Нейросферы готовы к субкультивированию спустя 3-4 суток культивирования. При фазово-контрастном микроскопировании жизнеспособные нейросферы выглядят полупрозрачными, состоящими из большого количества клеток. На поверхности визуализируются микрошипики.

В последующем можно использовать нейросферы для пересева и поддержания культуры клеток в необходимом количестве. Для осуществления пассажа необходимо проводить смену культуральной среды в объеме 1/2- 1/3 каждые 48 часов. Собственно пассаж клеток целесообразно проводить 1 раз в 7 суток. Другим направлением использования нейросфер является дифференцировка их в нейроны и/или астроциты. Дифференцировка нейросфер проводилась путем добавления в среду для культивирования факторов дифференцировки. В качестве питательной среды при дифференцировке нейросфер использовалась коммерческая среда производства StemCell (Канада) - NeuroCult® NS-A Differentiation Medium. Через 7 и 14 суток культивирования нейросфер в дифференцировочной среде, открепляли клетки (нейроны, астроциты) и проводили их идентификацию (нейроны, астроциты) с помощью иммуноцитохимических исследований.

С целью идентификации клеток и определения чистоты культуры использовали флуоресцентные маркеры для нейронов (NSE) и клеток астроглии (GFAP), согласно стандартным протоколам непрямого иммуноцитохимического метода. Чистота полученных культур считалась в процентах NSE- и GFAP-иммунопозитивных клеток от общей суммы всех клеток. Подсчет проводился в десяти полях зрения.

Изолирование и культивирование церебральных эндотелиальных клеток

Источником эндотелиоцитов служили сосуды головного мозга крыс (самцы и самки) возраста 1-3 недели. В чистых условиях, после эвтаназии передозировкой анестетиком, извлекался головной мозг животного и помещался в ледяной раствор PBS. Удаляли твердую оболочку, мозжечок и ствол, оставляли только кору. Полученную кору измельчали в 3 мл ледяного DMEM до кусочков размерами не более 1 мм³. К ткани добавляли смесь ферментов - колагеназа-2 (1 мг/мл), ДНКаза (15 мкг/мл) и проводили ресуспензирование, после чего взвесь клеток помещали в термостат на шейкере на 90 минут при 37°C. По окончании инкубации добавляли 10 мл DMEM, перемешивали, проводили центрифугирование и собирали осадок. К осадку добавляли 20% BSA в DMEM и повторно центрифугировали. Удаляли супернатант и к осадку добавляли DMEM с ферментами: коллагеназа/диспаза (1 мг/мл) и ДНКаза (6,7 мкг/мл). Смесь клеток с ферментами помещалась в термостат на шейкере на 60 минут при 37°C. Через час проводили центрифугирование, собирали осадок и переносили его в градиент Перколла (33%) и центрифугировали 1 час. Слой эндотелиоцитов собирали шприцем, дважды отмывали в DMEM и производили посев в культуральной среде содержащей:

- a. 20% PDS-DMEM/F12 (plasma derived serum).
- b. FGFb (1 мг/мл),
- c. гепарин (100 мкг/мл),
- d. гентамицин (50 мкг/мл).

Создание простейшей модели нейроваскулярной единицы *in vitro*

После выделения эндотелиоциты и астроциты культивируются в чашках Петри с адгезивным покрытием, а нейроны культивируются на дне лунок культурального планшета с адгезивным покрытием. Клеточные культуры

выращиваются в стандартных условиях CO₂-инкубатора до образования монослоев.

После образования эндотелиоцитами монослоя, клетки открепляются и пересеиваются на внутреннюю поверхность (верхнюю сторону) вставки с полупроницаемой мембраной для культурального планшета, в емкость наливается среда для культивирования эндотелиоцитов (чтобы прикрыть мембрану вставки на 0,3-0,5 см), клетки культивируются в стандартных условиях CO₂-инкубатора 1-2 суток.

Через 1-2 суток вставка с мембраной переворачивается и помещается в лунку культурального планшета в свежую среду (смесь сред для культивирования эндотелиоцитов и астроцитов). При этом астроциты засеваются на внешнюю (нижняя сторона) поверхность перевернутой вставки с мембраной. Сокультура клеток культивируется в стандартных условиях CO₂-инкубатора до образования монослоев клеток.

Через 2-3 суток вставка с мембраной с сокультурой астроцитов и эндотелиоцитов переносится в лунку культурального планшета с монослоем нейронов на дне лунки. Лунка наполняется свежей культуральной средой (смесь сред для культивирования эндотелиоцитов, астроцитов и нейронов).

2.1.4. Модель химической гипоксии *in vitro* и подавление активности монокарбоксилатных транспортеров

Сокультуру клеток инкубировали с натрия йодацетатом. Финальная концентрация натрия йодацетата в среде составляла 50 мкМ. Длительность инкубации составила 30 минут при 37°C в CO₂-инкубаторе. По окончании инкубации клетки отмывали и проводили полную заменой культуральной среды, после чего продолжали культивирование клеток в стандартных условиях CO₂-инкубатора.

Для формирования хронической гипоксии через 24 часа проводили повторную инкубацию с йодацетатом натрия в той же концентрации в стандартных условиях CO₂-инкубатора при 37°C. Длительность инкубации составила инкубация 30 минут. Контрольной группой были сокультуры клеток, культивируемые без йодацетата. В обеих группах сокультур проводили полную смену культуральной среды через 30 минут инкубации [303].

Блокирование монокарбоксилатных транспортеров проводили путем инкубации клеток в течение 24 часов в культуральной среде с добавлением флоретина (100 мкМ) - блокатора транспортеров лактата МСТ1, МСТ4 (Sigma-Aldrich, кат. № P7912).

2.1.5. Регистрация клеточной пролиферации и оценка структурно-функциональной целостности ГЭБ *in vitro*

Регистрация и изучение особенностей пролиферативной активности клеток, входящих в состав НВЕ проводилась в физиологических условиях и при моделировании гипоксии. Регистрация осуществлялась с использованием системы «xCELLigence», предназначенной для анализа пролиферации клеток в режиме реального времени (Roche, Швейцария) [326, 334].

Принцип методики заключается в том, что присутствие клеток на электродах в лунках планшета вызывает изменения ионного состояния, что приводит к изменению сопротивления. Электроды в лунках планшета регистрируют эти изменения, а специализированное программное обеспечение рассчитывает показатель клеточного индекса. То есть, при увеличении количества клеток в лунках планшета наблюдается увеличение клеточного индекса, который является расчетным показателем. Собственно

клеточный индекс или индекс клеточной пролиферации зависит от количества, размеров клеток и является импедансозависимым.

В лунки специального планшета добавляли по 100 мкл суспензии клеток (нейроны, астроциты) и 100 мкл среды для культивирования. В качестве контроля использовалась культуральная среда без клеток. Инкубация проводилась в условиях CO₂-инкубатора при 5% CO₂ и температуре 37°C.

Оценка структурно-функциональной целостности клеточной модели ГЭБ *in vitro* проводили путем измерения трансэндотелиального сопротивления. Использовали вольтметр EVOM2 (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) с электродами STX2. Перед проведением эксперимента электроды стерилизовали 70% этанолом и помещали в ультрафиолетовую камеру на 15 минут, с последующей калибровкой в культуральной среде. Величина сопротивления регистрировалась в Ом*см² при формировании монослоя эндотелиальных клеток на вставках для культурального планшета. Из полученного результата вычиталась величина сопротивления мембраны без клеток.

2.1.6. Иммуногисто-цитохимические исследования

Определение экспрессии интересующих антигенов: NSE, GFAP, CD31, Р-гликопротеина, Сх43, CD38, JAM, CLDN5, ZO-1, МСТ1, МСТ4, GLUT4, PCNA, SLC1A и EAAT2 проводилось двойным непрямым методом иммуноферментного окрашивания в срезах головного мозга крыс и в трехклеточной модели НВЕ/ГЭБ *in vitro*.

В качестве первичных антител использовали:

1. Анти NSE антитела в рабочем разведении 1:200 (Abcam ab79757) в PBS с 1% BSA.

2. Анти Glial Fibrillary Acidic Protein антитела в рабочем разведении 1:100 (Sigma G4546-100UG) в PBS с 1% BSA.
3. Антитела к CD31 в рабочем разведении 1:200 (Abcam ab33858) в PBS с 1% BSA.
4. Антитела к Р-гликопротеину в рабочем разведении 1:100 (Abcam ab3366) в PBS с 1% BSA.
5. Анти Connexin-43 в рабочем разведении 1:100 (Abcam ab79010) в PBS с 1% BSA.
6. Антитела к CD38 в рабочем разведении 1:200 (Santa-Cruz sc-7049) в PBS с 1% BSA.
7. Антитела к JAM в рабочем разведении 1:200 (Abcam, США, ab52647) в PBS с 1% BSA.
8. Антитела к CLDN5 в рабочем разведении 1:400 (Santa-Cruz, США, sc-28670) в PBS с 1% BSA.
9. Антитела к ZO1 в рабочем разведении 1:200 (Santa-Cruz, США, sc-10804) в PBS с 1% BSA.
10. Антитела к MCT1 в рабочем разведении 1:200 (Abcam, США, ab90582) в PBS с 1% BSA.
11. Антитела к MCT4 в рабочем разведении 1:200 (Abcam, США, ab74109) в PBS с 1% BSA.
12. Антитела к GLUT4 в рабочем разведении 1:400 (Abcam, США, ab654) в PBS с 1% BSA.
13. Антител к PCNA в рабочем разведении 1:400 (Abcam, США, ab29) в PBS с 1% BSA.
14. Анти-SLC1A5 в рабочем разведении 1:200 (Abcam ab84903) в PBS с 1% BSA.
15. Антитела к EAAT2 в рабочем разведении 1:400 (Abcam ab85882) в PBS с 1% BSA.

Вторичными антителами являлись моноклональные антитела Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 647, Cy 5.5, TRITC, FITC в разведении 1:400 в PBS с 1% WGS.

При иммуноцитохимическом окрашивании клеточной модели HBE *in vitro* предварительно проводили префиксацию 4% параформом в культуральной среде разведении 1:1 в течение 5 минут.

Последующая фиксация клеток осуществлялась в 4% параформе в течение 15 минут. Далее иммуноцитохимическое окрашивание проводилось одинаково.

После фиксации проводилась пермеабелизация 0,1% Тритоном X-100 (10 минут при 23°C). Неспецифическую активность блокировали путем инкубацией препарата с 25 мкл 10% раствора BSA (bovine serum albumin) в PBS при 37°C в течение 30 минут.

После окончания инкубации клеток с BSA к препаратам добавляли 20 мкл первичных антител. Препараты инкубировали в течение 18-24 часов при 4°C во влажной камере. После инкубации, в темной комнате, на препараты наносили по 20 мкл вторичных антител и инкубировали во влажной камере в течение 30-60 минут при +37°C.

После инкубации с вторичными антителами наносили по 10 мкл монтирующей жидкости, накрывали покровным стеклом и проводили микроскопию. На всех этапах проводили обязательную отмывку препаратов раствором PBS. В качестве монтирующей жидкости использовался 50% раствор глицерина в PBS.

Проводилась люминесцентная микроскопия при увеличении x900. Использовали микроскоп «Olimpus-CX41» (производство фирмы Olimpus, Япония). Дополнительно проводили конфокальную микроскопию, для чего использовали лазерный конфокальный микроскоп «Olympus FV10i-W» (производство фирмы Olimpus, Япония). Для фото- и видеофиксации использовали систему анализа изображений Nikon Coolpix 4500 (производство фирмы Nikon, США), программное обеспечение

конфокального микроскопа «V10-ASW Viewer software(Ver.4.2b)». Проводили подсчет относительного числа иммунопозитивных клеток, экспрессирующих целевые антигены. Учитывали соэкспрессию интересующих антигенов. Подсчет проводили не менее, чем в 10 полях зрения на 500 клеток в образце. Для подсчета результатов обязательно учитывалось относительное количество всех иммунопозитивных клеток, экспрессирующих целевую метку/метки. Результаты представлены в процентах от общего числа клеток.

2.1.7. Спектрофотометрическое определение уровня лактата

После забора тканей головного мозга (миндалины и гиппокамп) проводили их гомогенизацию механическим путем. Определение концентрации лактата в гомогенатах ткани головного мозга проводили спектрофлуориметрическим методом с помощью набора Lactate Colorimetric/Fluorimetric Assay Kit (BioVision, K607-100) по стандартному протоколу фирмы-изготовителя.

Реакционная смесь содержала 87 мкл Lactate Assay Buffer, 2 мкл Lactate Enzyme Mix, 1 мкл Lactate Probe и 10 мкл исследуемого образца. Реакционную смесь инкубировали 30 мин при температуре 23 °С. После окончания инкубации измеряли интенсивность флуоресценции при $E_x/E_m=535/590$ нм на спектрофлуориметре СМ 2203 («Солар», Беларусь). Концентрацию лактата в исследуемых образцах измеряли по калибровочной кривой, которую строили по 8 точкам с концентрациями лактата 0-3 пмоль/мкл. Для построения калибровочной кривой к реакционной смеси добавляли 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30 мкл стандартного раствора лактата в концентрации 10 пмоль/мкл, инкубировали 30 мин при комнатной температуре, после чего измеряли интенсивность флуоресценции при $E_x/E_m=535/590$ нм на спектрофлуориметре СМ 2203 («Солар», Беларусь).

2.1.8. Оценка проницаемости гематоэнцефалического барьера *in vivo*

Оценку проницаемости гематоэнцефалического барьера у экспериментальных животных проводили путем фотометрической оценки содержания красителя Evans blue в крови и гомогенате ткани головного мозга. Животным в возрасте P7 и P17 внутрибрюшинно вводили свежеприготовленный 2% раствор Evans Blue (Sigma-Aldrich, USA), в объеме 4 мл/кг веса животного. Через 22 часа из левого желудочка сердца шприцем (с 10 мкл 10% раствора ЭДТА) собирали 200 мкл крови, после чего проводили транскардиальную перфузию головного мозга 30-50 мл холодного PBS и на льду выполняли забор головного мозга (с правой стороны брали полушарие целиком, с левой стороны выделяли гиппокамп, кору и миндалину) и готовили гомогенаты ткани в объеме 1 мл.

Затем кровь и гомогенаты центрифугировали: кровь 5 минут при 8000 rpm (6000g), гомогенат 30 минут при 13000 rpm (17000g) собирали супернатант и добавляли 50% раствор трихлоруксусной кислоты в объеме 1:1. После инкубации при 4°C в течение 18 часов проводили центрифугирование, при режимах описанных выше.

Определение содержания красителя в крови и гомогенатах ткани осуществляли фотометрическим методом при длине волны 610 нм в супернатантах по калибровочным кривым. Результаты выражали в мкг красителя/мл для крови и в мкг/г ткани для гомогенатов. Для оценки гематоэнцефалического барьера считали коэффициент его проницаемости путем деления содержания красителя в полушарии головного мозга на его содержание в крови и умножения полученного результата на 100.

2.2. Клиническая часть исследования

Объектом исследования в клинической части работы были дети в период новорожденности. В исследование включено 120 пациентов, у которых был выставлен диагноз «Церебральная ишемия I-III степени» согласно классификации перинатальных поражений нервной системы у новорожденных [18, 58].

Диагноз Все дети были доношенными - гестационный возраст от 38 до 41 ($39,5 \pm 1,5$) недель. Масса тела детей целевой группы составила 3000 - 4150 (3283 ± 150) грамм. Исследование выполнено в соответствии с разрешением Локального этического комитета (протокол № 7 от «4» декабря 2008 г.).

Условием включения детей в исследование являлось соответствие критериям включения, к которым относилось: 1. Доношенность; 2. Возраст ребенка от 0 до 28 суток; 3. Пребывание в стационаре с диагнозом «Церебральная ишемия» разной степени тяжести; 4. Согласие законного представителя ребенка на госпитализацию, диагностику, в том числе дополнительную и лечение; 5. Отсутствие критериев исключения.

Критерии исключения детей из целевой группы: 1. Пороки развития; 2. Внутриутробная инфекция или подозрение на внутриутробное инфицирование; 3. Билирубиновые энцефалопатии; 4. Травматическое повреждение ЦНС; 5. Наследственные заболевания; 6. Метаболические и токсические поражения ЦНС; 7. Гемолитические анемии.

Для всех пациентов применялись общепринятые клинические, ультразвуковые и лабораторные методы исследования. Осуществлялось ежедневное динамическое наблюдение за детьми. В целом в качестве материала использовались данные:

№	Метод исследования	Число наблюдений
1.	Анализ медицинской документации детей (истории болезни пациентов, амбулаторные карты)	120
2.	Оценка анамнестических данных	120

3.	Общие методы исследования: (клинический анализ крови, биохимический анализ крови, общий анализ мочи).	120
4.	Клиническое обследование новорожденных с оценкой неврологического статуса	120
5.	Нейросонография двукратно: в ранний и поздний неонатальные периоды	240
6.	Регистрация нейронспецифической енолазы (NSE) в сыворотке крови новорожденных.	120
7.	Регистрация глиального фибриллярного белка (GFAP) в сыворотке крови новорожденных	120
8.	Определение уровня sPECAM-1 в сыворотке крови новорожденных	120
9.	Определение уровня глутамата в сыворотке крови новорожденных	120
10.	Методы статистического анализа	

Вся информация вносилась в специально разработанную базу данных и протокол исследования. Разделы протокола был следующие:

1. Паспортная часть.
2. Анамнез (семейный, акушерский, родовый и настоящего заболевания).

3. Особенности неврологического статуса: синдром церебральной депрессии или возбудимости, судорожный синдром, синдром ликворососудистой дистензии, врожденный гипертонус или гипотонус.

4. Описание нейросонографии на 1 и 4 неделе жизни.

5. Иммуноферментный анализ сыворотки крови.

Церебральная ишемия I степени диагностировалась на основании данных:

1. Асфиксии средней тяжести при рождении.

2. Угнетение или возбуждение ЦНС (менее 7 дней).

Церебральная ишемия II степени диагностировалась на основании данных:

1. Патологическое течение беременности и внутриутробной гипоксии плода.

2. Угроза прерывания беременности.
3. Осложненное течение родов с развитием острой гипоксии плода.
4. Наличие среднетяжелой асфиксии при рождении.
5. Симптомы угнетения/возбуждения ЦНС, сохраняющиеся более 7 суток.

6. Наличие судорожного синдрома, внутричерепной гипертензии.
7. Данных НСГ – повышение эхогенности субкортикальной области.

Церебральная ишемия III степени диагностировалась на основании:

1. Наличие факторов, вызвавших внутриутробную гипоксию.
2. Тяжелая асфиксия.
3. Отрицательная динамика церебральной активности, длящаяся более 10 суток: кома, судороги, дещеребрация/декортикация, вегетативные нарушения.

4. Данных НСГ: диффузное повышение эхогенности ткани мозга, изменение размеров ликворопроводящей системы, признаки атрофии больших полушарий.

Нейросонографическое исследование выполнялось с использованием ультразвукового сканера «АЛОКА - 500» с датчиком 3500 кГц. Были проанализированы ведущие сонографические показатели, обнаруженные на первой и четвертой неделях.

Оценивались размеры межполушарной щели, желудочков мозга, большой цистерны, конвексимального субарахноидального пространства, ретроцеребеллярного пространства. Учитывалось наличие отеков перивентрикулярного пространства и субкортикальных структур головного мозга, кровоизлияний в сосудистые сплетения боковых желудочков и внутрижелудочковых кровоизлияний.

Для лабораторных исследований использовалась венозная кровь. У детей натошак из вены сухую пробирку для центрифугирования забирали кровь в объеме 2 мл. Пробирку с кровью инкубировали в термостате при 37С° в течение 45 мин. После инкубации пробирку центрифугировали при

3000 оборотах в минуту (300g), в течение 20 мин, с последующим забором сыворотки.

Отдельные образцы сыворотки сохраняли не более 6 месяцев в низкотемпературной морозильной камере (-82°C) до проведения исследований. Концентрация целевых маркеров определялась в нг/мл.

Всем детям, из целевой группы на первой неделе после родов было выполнено исследование образцов сыворотки крови. Регистрировали концентрацию нейронспецифической енолазы, глиофибрилярного кислого белка и sPECAM-1. Определение проводилось на базе РЛДЦ ИХМИ методом иммуноферментного анализа. Использовался набор реактивов и протокол производителя (Bender Medsystems, США).

Концентрацию глутамата определяли методом спектрофотометрии. Использовался набор реактивов «Glutamate Assay Kit» фирмы Abcam (каталожный номер - ab83389) в соответствии с инструкцией производителя. Спектрофотометрия проводилась на спектрофлуориметре «Solar CM2203» при длине волны 450 нм (производитель ЗАО «Солар», Беларусь).

Дизайн клинической части исследования представлен на рисунке 4.



Рисунок 4 – Дизайн клинической части

2.3. Математико-статистическая обработка результатов

Математико-статистическая обработка полученных результатов осуществлена методами с применением прикладных программ «StatPlus 2009 5.8.4.0» (AnalystSoft Inc., США), Microsoft Excel 9.0 (Microsoft, США), программой для анализа изображений V10-ASW Viewer software 4.2b (Olympus, Япония).

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 несоблюдения 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 наличии нормального распределения 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 - $p < 0,05$ [69, 79]. Различия принимали как статистически значимые при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Результаты комплексной оценки состояния НВЕ *in vivo*

3.1.1 Неврологический статус животных при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС

Использование международной шкалы Neurological Severity Score (NSS) позволило провести анализ неврологического статуса животных с экспериментальной моделью гипоксически-ишемического повреждения головного мозга и установить, что первые неврологические нарушения можно зафиксировать достаточно рано - через 4 часа после воздействия гипоксии-ишемии (таблица 3.1). Различия между опытной ($11 \pm 0,31$ баллов) и контрольной ($7,5 \pm 0,5$ баллов) группами статистически значимые ($p=0,001$). Необходимо отметить тот факт, что у крыс контрольной группы в возрасте 7 суток фиксировали нарушения неврологического статуса, соответствующие среднетяжелому повреждению по шкале NSS ($7,5 \pm 0,5$).

Таблица 3.1 – Сумма баллов у животных по шкале Neurological Severity Score, (баллы, $M \pm \sigma$).

Подгруппа животных	Количество баллов по шкале Neurological Severity Score		
	Опыт, n=16	Контроль, n=8	p
P7`	$11 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,5$	0,001
P7	$11 \pm 0,6$	$7,0 \pm 0,3$	0,001
P10	$9,8 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,5$	0,001
P17	$5,6 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,2$	0,001
P28	$2,2 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,2$	

Примечания: p - статистическая значимость между группами опыта и контроля в соответствующих возрастных подгруппах, критерий Манна-Уитни.

Нарушения неврологического статуса в опытной группе сохранялись до 4 недель постнатального развития. Восстановление неврологического

статуса отмечено в животных подгруппы P28, когда статистически значимых отличий в неврологическом статусе животных опытной и контрольной групп выявлено не было. Однако, в опытной группе животных, неврологические нарушения, соответствовавшие средней степени тяжести ($9,8 \pm 0,3$ баллов) сохранялись до трех суток (подгруппа P10) после развития гипоксически-ишемического повреждения головного мозга. В это же время (подгруппа P10) у животных из контрольной группы неврологическая симптоматика соответствовала умеренным нарушениям ($2,5 \pm 0,5$ балла). С течением времени происходило постепенное восстановление неврологического статуса у животных опытной группы.

Через 10 суток после развития гипоксически-ишемического повреждения (подгруппа P17) сумма баллов по шкале NSS составила $5,6 \pm 0,5$, что соответствует умеренному повреждению, оставаясь при этом значимо выше $1,2 \pm 0,2$ баллов контрольной группы ($p=0,001$).

Учитывая то, что шкала NSS позволяет оценить нарушения различных функций, была проведена оценка их в отдельности (таблица 3.2). Анализируя полученные при оценке неврологического статуса экспериментальных животных данные, установлено, что через 4 часа после гипоксически-ишемического поражения у крыс в подгруппе P7' статистически значимо чаще ($p=0,03$) наблюдалось нарушение рефлекторной деятельности ($2 \pm 0,5$ баллов) и двигательной активности ($2 \pm 0,5$ баллов) по сравнению с животными контрольной группой ($0,6 \pm 0,3$ и $0,8 \pm 0,3$ баллов, соответственно).

В опытной подгруппе P7 зафиксировано нарастание моторной дисфункции ($1,5 \pm 0,4$ баллов) и сенсорных нарушений ($1,4 \pm 0,4$ баллов), что статистически значимо отличается от группы контроля, в которой моторная функция оценена в $0,3 \pm 0,1$ балла, а сенсорная функция - $0,7 \pm 0,3$ балла ($p=0,03$). Нарушения рефлекторной деятельности у животных опытной группы оставались более выраженными - $1,8 \pm 0,4$ баллов, против контрольной - $0,6 \pm 0,3$ баллов.

Таблица 3.2 – Анализ отдельных функций по шкале NSS, (баллы, М±σ).

Группа		Оцениваемая функция, баллы по шкале NSS				
		Моторная	Сенсорная	Рефлексы	Равновесие	Движение
P7	Опыт, n=16	0,5±0,2	0,5±0,2	6±0,4	2±0,5	6±0,4
	Контроль, n=8	0,3±0,1	0,3±0,1	5,5±0,5	0,8±0,3	5,5±0,5
Значимость различий, p				0,03		0,03
P7	Опыт, n=16	1,5±0,4	1,4±0,4	5,1±0,3	1,2±0,4	5,1±0,3
	Контроль, n=8	0,3±0,1	0,7±0,3	4,6±0,5	0,8±0,3	4,6±0,5
Значимость различий, p		0,03	0,03	0,03		
P10	Опыт, n=16	1,5±0,4	1,2±0,4	5,3±0,3	0,6±0,3	5,3±0,3
	Контроль, n=8	0,4±0,1	0,2±0,2	1,5±0,4	0,2±0,2	1,5±0,4
Значимость различий, p		0,03	0,03	0,03	0,001	
P17	Опыт, n=16	1,3±0,1	0,8±0,2	2±0,5	0,4±0,2	2±0,5
	Контроль, n=8	0,2±0,2	0,2±0,2	0,4±0,1	0,4±0,2	0,4±0,1
Значимость различий, p		0,03	0,05	0,03	0,03	
P28	Опыт, n=16	0,5±0,2	0,2±0,2	0,8±0,3	0,3±0,1	0,8±0,3
	Контроль, n=8	0,2±0,2	0,2±0,2	0,3±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1
Значимость различий, p						

Примечания: p - статистическая значимость между опытной и контрольной группами, критерий Манна-Уитни.

Через 72 часа после моделирования гипоксически-ишемического

поражения головного мозга (подгруппа P10) зафиксировано восстановление только двигательной активности в опытной группе животных ($0,6 \pm 0,3$ балла) до показателей контрольной ($0,2 \pm 0,2$).

Одновременно с этим нарушения равновесия статистически значимо чаще встречались у животных в опытной группе ($5,3 \pm 0,3$ баллов), по сравнению с контрольной ($1,5 \pm 0,4$ баллов) ($p=0,001$).

К 10 дню (подгруппа P17) после моделирования гипоксически-ишемического повреждения отмечается улучшение всех показателей. Однако сохраняются более выраженные нарушения моторной ($1,3 \pm 0,1$ баллов), сенсорной ($0,8 \pm 0,2$ баллов) функций, угнетения рефлексов ($1,1 \pm 0,1$ баллов) и равновесия ($2 \pm 0,5$ баллов) в опытной группе по сравнению с контрольной.

На 28 сутки постнатального развития отличий между группами не зафиксировано. Произошло восстановление неврологического статуса животных опытной группы согласно шкале NSS.

Результаты оценки двигательной активности, когнитивной дисфункции, а также эмоциональности и тревожности крыс в возрасте 28 суток после перенесенного перинатального гипоксически-ишемического повреждения головного мозга представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Анализ нейроповеденческого тестирования у животных в возрасте 28 суток (P28), $M \pm \sigma$.

Тест	Критерий теста	Группа животных		p
		Контроль (n=8)	Опыт (n=8)	
«Открытое поле»	Пройденный путь (м)	$24,9 \pm 1,05$	$18,1 \pm 1,04$	0,001
	Число пересеченных линий	$123,7 \pm 7,51$	$97,1 \pm 6,19$	0,009
	Совокупное время замирания (с)	$122,8 \pm 6,53$	$124,5 \pm 19,5$	$>0,05$
«Водный лабиринт Морриса»	Время достижения платформы (с)	$27,3 \pm 4,7$	$38,8 \pm 3,3$	$>0,05$
«Приподнятый крестообразный»	Число пересеченных линий	$193,1 \pm 64,1$	$80,9 \pm 18$	0,08
	Число входов в открытые рукава	$65,2 \pm 6,22$	$25,8 \pm 0,3$	0,03
	Число входов в закрытые рукава	$68,1 \pm 20,5$	$26,6 \pm 6,1$	0,05
	Число входов в центральную часть теста	$27,9 \pm 12$	$11,6 \pm 2,1$	$>0,05$

	Время нахождения в закрытых рукавах	120±38	210±30	0,03
--	-------------------------------------	--------	--------	-------------

Примечания: p - статистическая значимость между опытной и контрольной группами, критерий Манна-Уитни.

К 28 суткам постнатального развития регистрируется частичное восстановление неврологических нарушений (когнитивной и познавательной деятельности) и сохранение повышенной тревожности у животных экспериментальной группы по сравнению с опытной.

Таким образом, при анализе неврологических нарушений в группе экспериментальных животных установлено, что неврологическая дисфункция проявляется в виде альтерации двигательной и рефлекторной деятельности в первые часы после поражения. В последующем происходит восстановление моторной, сенсорной и двигательной активности в течение нескольких суток и вплоть до 28 суток жизни, когда зафиксировано полное восстановление, а также восстановление когнитивной функции с сохранением повышенной тревожности.

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

Мы предположили, что перинатальное гипоксически-ишемическое поражение головного мозга вызывает не только нарушения структурно-функциональной целостности ГЭБ вследствие повреждения базальной пластинки, эндотелиоцитов и астроцитов, но и является причиной нарушения молекулярных механизмов, обеспечивающих уникальную особенность эндотелиальных клеток гематоэнцефалического барьера и участвующих в поддержании структурной целостности церебрального эндотелия, в динамике постнатального развития. Для проверки указанного предположения провели исследование особенностей экспрессии белков плотных контактов (JAM,

ZO1, CLDN5) эндотелиальными клетками в пато(физио)логических условиях.

Установлено, что в физиологических условиях с 7 суток до 28 суток постнатального развития количество эндотелиоцитов, экспрессирующих белок JAM, 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 постепенно и статистически значимо увеличивается во всех изученных областях мозга (таблица 3.4) ($p < 0,05$).

Таблица 3.4 – Количество эндотелиоцитов НВЕ, экспрессирующих белки плотных контактов.

Область мозга	Под-группа	JAM		ZO1		CLDN5	
		контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Гиппокамп	P7	9±1,1	13,8±1,8	27,2±2	48,1±4,7 [#]	16,8±1,6	28±3,1 [#]
	P28	18±1,7*	24,6±1,2* [#]	35,1±4,1*	25,6±3,9*	21,9±2*	34,4±3,6 [#]
Миндалина	P7	10,5±5,5	24,5±2,7 [#]	21,3±3,7	52,2±6,7 [#]	14,6±2,8	22,4±2,6 [#]
	P28	9,7±1,4	27,8±2,9 [#]	28,5±1,5*	28,5±8,9*	24±4,8*	50,1±5,3* [#]
Кора	P7	22,9±4,8	29,5±2,7	19,1±1,4	42,8±4,2 [#]	18,9±1,5	29,7±3 [#]
	P28	24,2±2,7	28,3±2,6	28,2±5,5*	17,2±2,5*	44,9±3,2*	54,3±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.

Для оценки пролиферативной активности клеток мы проанализировали относительное количество JAM+/PCNA+ клеток в исследуемых регионах мозга и установили, что перенесенное гипоксическое повреждение увеличивает пролиферацию клеток в гиппокампе и коре головного мозга (P7) с последующим снижением к P28 (таблица 3.5).

По сравнению с областью гиппокампа, перинатальное гипоксическое повреждение ЦНС привело к наиболее выраженному снижению пролиферативного потенциала клеток эндотелия именно в

миндалине головного мозга к 28 суткам постнатального развития, что позволяет считать область миндалевидного тела регионом ЦНС, высокочувствительным к действию факторов, нарушающих ангиогенез в развивающемся мозге.

Таблица 3.5 – Количество PCNA-иммунопозитивных эндотелиоцитов в различных регионах головного мозга на 7, 28 сутки постнатального развития у животных, $M \pm \sigma$.

Область мозга	Под- группа	PCNA		p между опытной и контрольной группами,
		контроль	опыт	
Гиппокамп	P7	83±12,1	85±10,8	>0,05
	P28	87±10,7	93±5	>0,05
Значимость различий между возрастными подгруппами, p		>0,05	>0,05	
Миндалина	P7	58±5,5	95±2,7	0,001
	P28	93±1,4	78±2,9	0,001
Значимость различий между возрастными подгруппами, p		0,001	0,001	
Кора	P7	77±4,8	97±2,7	0,001
	P28	97±2,7	85±2,6	0,001
Значимость различий между возрастными подгруппами, p		0,001	0,001	

Примечание: p - статистическая значимость между опытной и контрольной группами, критерий Манна-Уитни.

Таким образом, в ходе роста и развития головного мозга, в целом, происходит прогрессивное увеличение количества клеток, экспрессирующих белки плотных контактов (эндотелий церебральных сосудов), что может свидетельствовать о продолжающемся ангиогенезе, сопровождающим процессы пластичности мозга в неонатальном периоде, что не противоречит данным о том, что процессы локального ангиогенеза продолжаются в постнатальный период и поддерживают нейрогенез, а также обеспечивают развитие головного мозга [407, 498].

У животных, подвергшихся гипоксически-ишемическому воздействию (P7), отмечается более высокое количество клеток эндотелия, экспрессирующих ZO1 и CLDN5, в гиппокампе, миндалине и коре, по сравнению с группой контроля, практически в 1,5-2 раза (таблица 3.4). При этом число эндотелиоцитов, экспрессирующих JAM в гиппокампе, миндалине и коре головного мозга оставалось сопоставимым с группой контроля. К 28 суткам постнатального развития у животных опытной группы произошло статистически значимое двукратное увеличение количества JAM+-эндотелиальных клеток, при этом превышающим показатели группы контроля ($p < 0,05$). Также установлено, что общее количество эндотелиоцитов, экспрессирующих белок JAM в миндалине статистически значимо больше, чем в контрольной группе. 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 количества клеток, которые экспрессируют белки плотных контактов в церебральных эндотелиоцитах, 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.

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.

Учитывая информацию о том, что нарушение экспрессии белков плотных контактов знаменует собой интенсификацию ангиогенеза при некоторых видах патологии головного мозга [107, 233, 238], мы предполагаем, что перинатальная гипоксия-ишемия головного мозга приводит к интенсификации ангиогенеза, что сопровождается дисбалансом в экспрессии белков плотных контактов и нарушениями формирования плотных контактов в клетках церебрального эндотелия. Кроме этого можно предположить, что указанные изменения могут иметь не только патологическое, но и отчасти компенсаторное влияние, путем сохранения пролиферативного потенциала клеток микрососудов гиппокампа, миндалины и коры головного мозга в период, вплоть до 28 суток постнатального развития.

Это может объяснить факт увеличения числа клеток, экспрессирующих белки плотных контактов, что, вероятно, определяет сохранность структурной и функциональной целостности гематоэнцефалического барьера при ангиогенезе в развивающемся головном мозге.

3.1.3 Особенности экспрессии CD38 и коннексина-43 в клетках НВЕ экспериментальных животных

Молекулой, претендующей на роль маркера межклеточных взаимодействий в НВЕ, является НАД⁺-гликогидролаза/CD38, которая экспрессируется клетками нейрональной и глиальной природы и участвует в реализации НАД⁺-контролируемых процессов [60, 89, 277, 483, 494].

Нами установлено, что при гипоксически-ишемическом воздействии и последующем поражении ЦНС происходит изменение количества клеток

головного мозга, экспрессирующих молекулу CD38. Обнаруженные в ходе исследования изменения имеют время-зависимый характер.

При этом у крыс из контрольной группы количество CD38-иммунопозитивных клеток не изменяется до 28 суток наблюдения (таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Экспрессия CD38 клетками головного мозга экспериментальных животных, (%), $M \pm \sigma$.

Подгруппа животных	Относительное число CD38-позитивных клеток		
	Опыт, n=16	Контроль, n=8	p
P7`	2,2±1,1	5,3±0,5	0,03
P7	8±1,5	4,8±0,5	0,03
P10	8,5±1	4,5±0,9	0,03
P17	4,3±0,6	4±0,2	
P28	3,1±1	2±0,7	

Примечание: p - статистическая значимость между группами опыта и контроля в соответствующих возрастных подгруппах, критерий Манна-Уитни.

При развитии повреждения ЦНС вследствие воздействия гипоксии-ишемии, в клетках НВЕ практически не изменяется локализация иммунопозитивных меток. То есть изменений локализации искомой молекулы не происходит. Сама молекула CD38 регистрируется по всей цитоплазме равномерно и немного более плотно в перинуклеарном пространстве (рисунок 5).

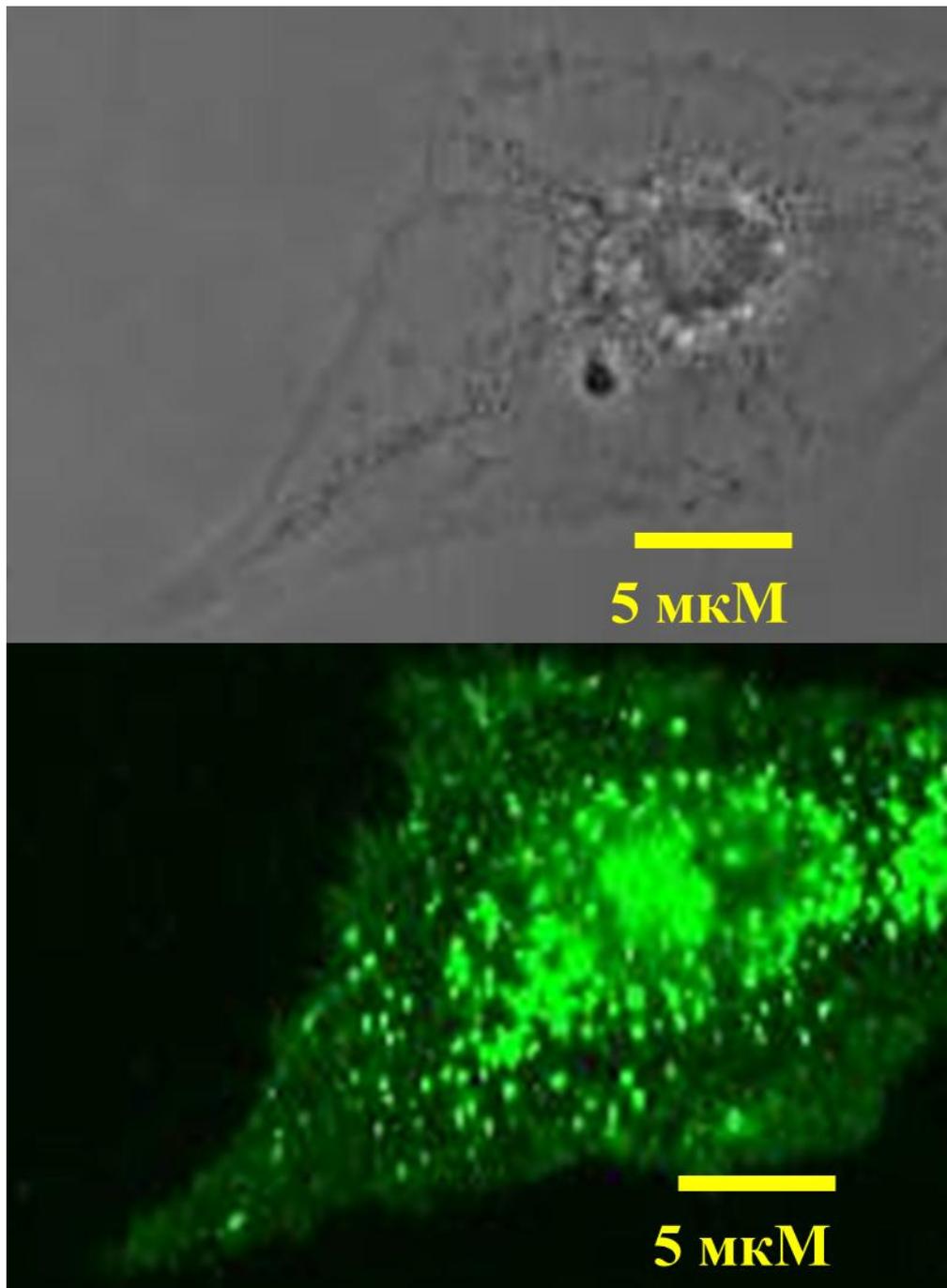


Рисунок 5 – Астроцит крысы опытной группы: фазово-контрастная микроскопия (верху) и экспрессия CD38 (люминесцентная микроскопия, внизу, краситель Alexa 488).

В ходе исследования зарегистрировано динамическое изменение экспрессии молекулы CD38 в нейроваскулярной единице в норме (рисунок 6) и при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении головного мозга (рисунок 7).

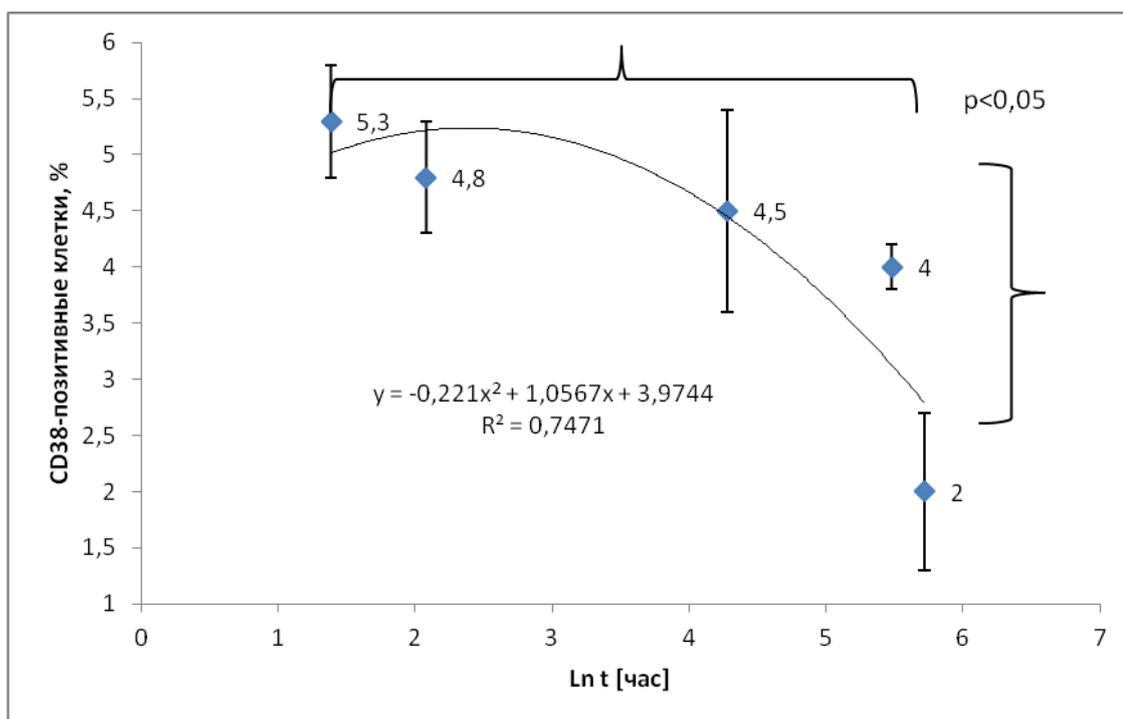


Рисунок 6 – Количество CD38-иммунопозитивных клеток (%) в нейроваскулярной единице в контрольной группе животных

Анализ экспрессии молекулы CD38 клетками животных показал, что в группе контроля экспрессия остается достаточно стабильной на протяжении 17 суток постнатального развития. Количество CD38-иммунопозитивных клеток 4,0-5,3% ($4,7 \pm 0,7\%$). Но к возрасту 28 суток наблюдается статистически значимое уменьшение их количества до $2 \pm 0,7\%$.

У животных, которые подверглись гипоксически-ишемическому воздействию, при повреждении ЦНС наблюдается изменение количества экспрессирующих молекулу CD38 клеток нейроваскулярной единицы.

В первые 4 часа количество клеток, экспрессирующих молекулу CD38 снизилось. Через 8 часов зафиксировано увеличение CD38-иммунопозитивных клеток. При этом их количество было значительно больше, чем у животных контрольной группы. Продолжающееся увеличение количества CD38-иммунопозитивных клеток происходит до 72 часов после гипоксически-ишемического воздействия, что соответствует 10 суткам постнатального развития, и достигает $8,5 \pm 1,0\%$. В последующем отмечается постепенное снижение количества клеток, экспрессирующих молекулу CD38

и полная нормализация к 17 суткам постнатального развития (10 суток с момента гипоксически-ишемического поражения) - $4,3 \pm 0,6\%$.

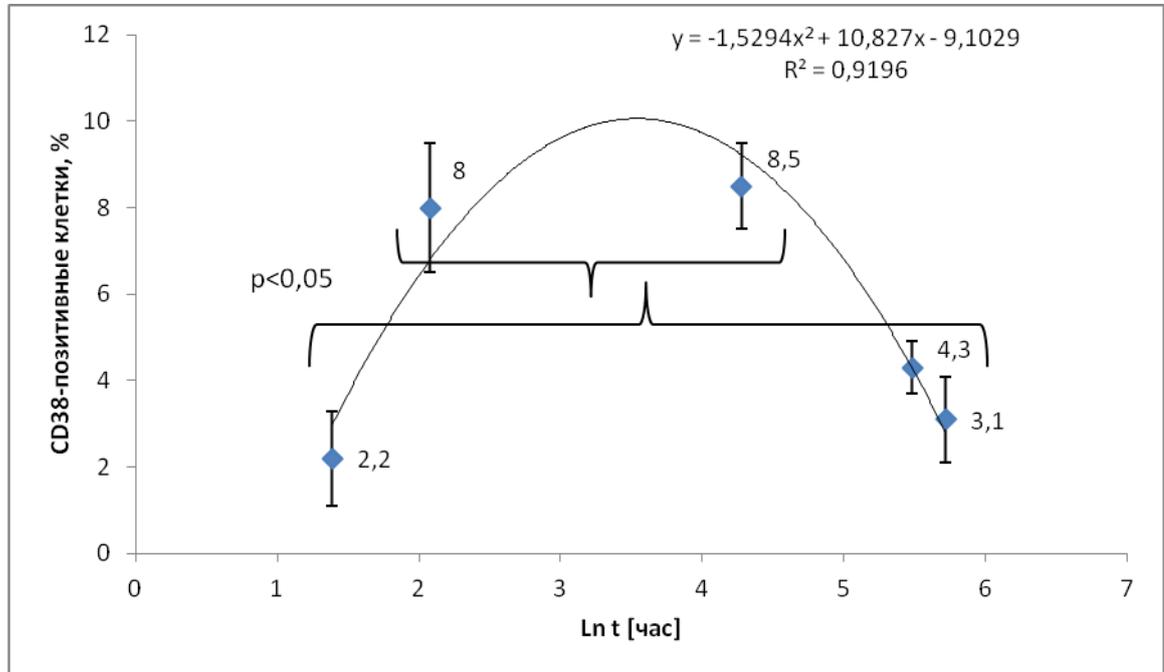


Рисунок 7 – Количество CD38-иммунопозитивных клеток (%) в нейроваскулярной единице в опытной группе животных

Необходимо заметить, что для клеток модели НВЕ *in vitro*, характерны изменения однотипные результатам исследования *in vivo*. В результате гипоксического воздействия произошло увеличение числа астроцитов, экспрессирующих CD38 (в 15 раз) при одновременном уменьшении CD38-иммунопозитивных нейронов (в 15 раз) (таблица 3.19).

Таким образом, при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС у животных, происходят разнонаправленные изменения числа клеток НВЕ, экспрессирующих молекулу CD38. В ближайшие часы характерно уменьшение, которое в дальнейшем, до 72 часов после гипоксии-ишемии, сменяется увеличением количества клеток. Нормализация до контрольных показателей происходит к 10 суткам после патологического воздействия.

При этом установлено, что изменения в нейронах и астроцитах

различные. Происходит уменьшение NSE-иммунопозитивных нейронов, соэкспрессирующих молекулу CD38. Что касается астроцитов, то зафиксировано увеличением GFAP-иммунопозитивных клеток (астроцитов), соэкспрессирующих исследуемый маркер.

Для идентификации вида клеток, обеспечивающих усиление экспрессии молекулы CD38 в головном мозге при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении, мы изучили динамические изменения экспрессии глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP), а также соэкспрессии молекул CD38 и GFAP (таблица 3.7).

Таблица 3.7 – Соэкспрессия GFAP и CD38 на клетках головного мозга крыс, (% , $M \pm \sigma$).

Подгруппа животных	GFAP+ клетки			GFAP+ клетки, экспрессирующие CD38		
	Опыт, n=16	Контроль, n=8	p	Опыт, n=16	Контроль, n=8	p
P7`	6,2±2,1	6,8±1,6		25,9±9,4	18,6±5,8	0,03
P7	10,5±1,8	5,2±1,9	0,01	23,3±5,7	16,6±4,4	0,03
P10	12,8±1,9	7,8±1,5	0,03	26,3±8,2	15,5±3,2	0,01
P17	9,0±2,3	5,8±1,0	0,03	33,9±7,8	11,3±3,7	0,001
P28	5,8±0,9	5,3±1,0		27,8±5,9	10,4±2,4	0,001

Примечания: p - статистическая значимость между группами опыта и контроля в соответствующих возрастных подгруппах, критерий Манна-Уитни.

Маркером клеток астроглиальной природы является глиофибрилярный кислый протеин. Таким образом, показатели экспрессии этого маркера позволят судить о количестве астроцитов в ткани головного мозга. Динамические изменения экспрессии GFAP- и GFAP/CD38-иммунопозитивных клеток контрольной группы представлены на рисунке 8.

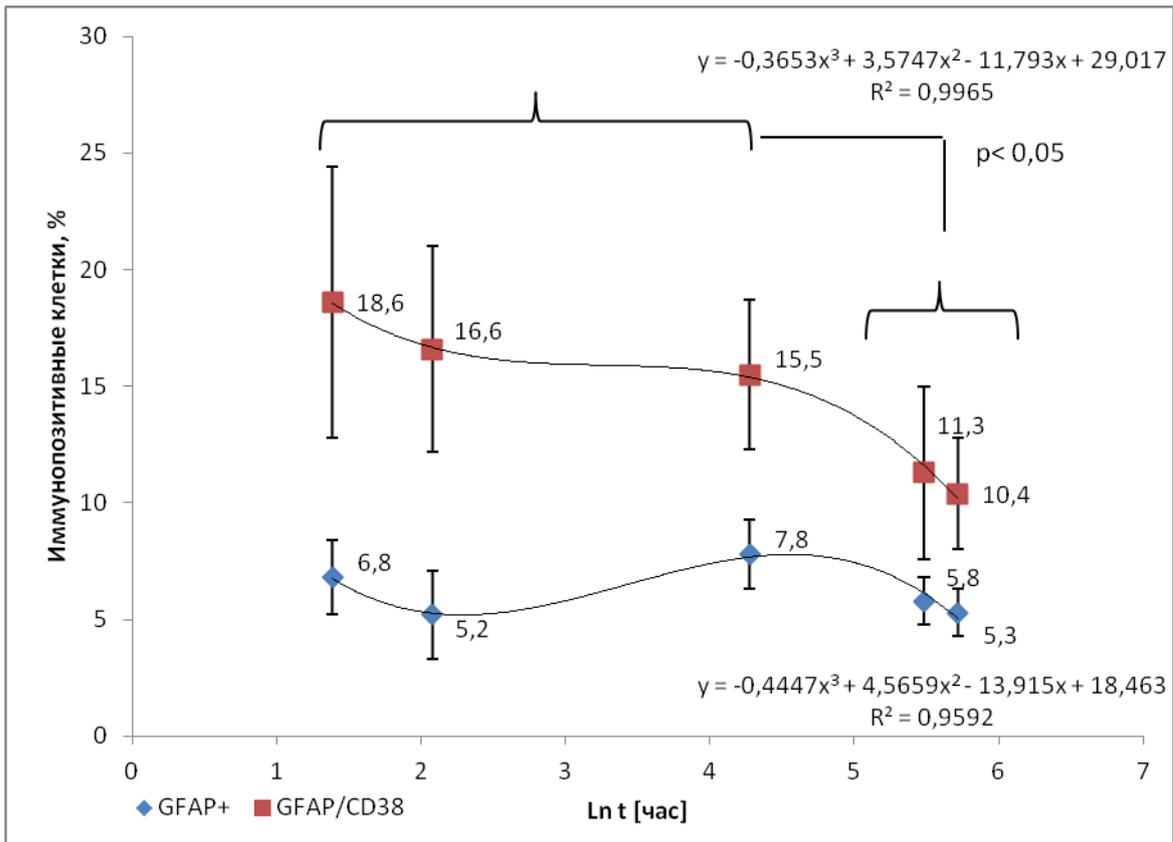


Рисунок 8 – Экспрессия GFAP и CD38 на клетках нейроваскулярной единицы у контрольных животных

У интактных животных количество клеток, экспрессирующих маркер астроглии практически не изменилось в течение 4 недель после рождения и оставалось в пределах 5,3-7,8%. Самое большое, но статистически не отличающееся от других подгрупп, число CD38-иммунопозитивных клеток было обнаружено у 10-дневных животных. Одновременно с этим, мы обнаружили прогрессирующее, стойкое снижение соэкспрессирующих GFAP и CD38 клеток. С возраста 17 после рождения, у животных контрольной группы, число астроцитов, экспрессирующих CD38, статистически меньше.

Можно сделать вывод, что в процессе постнатального развития в физиологических условиях происходит прогрессивное уменьшение относительного количества астроцитов, экспрессирующих НАД⁺-гликогидролазу (CD38).

В случае перинатальной патологии гипоксически-ишемического генеза, изменения, касающиеся молекулы CD38 статистически значимо отличались

от контрольной группы (рисунок 9).

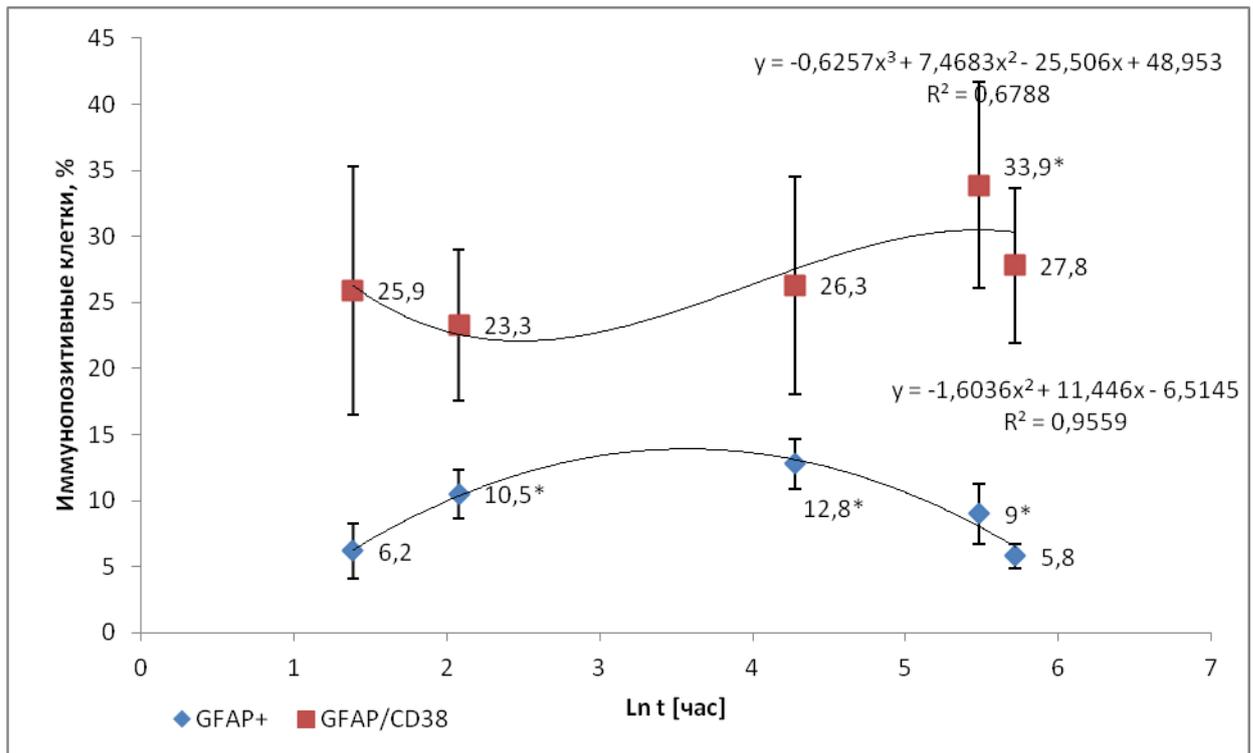


Рисунок 9 – Экспрессия GFAP и CD38 на клетках нейроваскулярной единицы у опытных животных (*- статистическая разница между указанной подгруппой и другими подгруппами ($p < 0,05$), критерий Манна-Уитни)

Произошло постепенное увеличение числа GFAP-экспрессирующих клеток, начиная с 8 часов после перенесенного патологического воздействия (подгруппа P7). Максимальные показатели были через 72 часа (подгруппа P10) - $12,8 \pm 1,9\%$. Далее происходило постепенное уменьшение (P17 - $9,0 \pm 2,3\%$) и достижение к 28 дню постнатального развития (подгруппа P28) контрольных значений - $5,8 \pm 0,9\%$.

Одновременно с этим, в группе животных опытной группы произошло увеличение количества клеток астроглии, несущих на своей поверхности молекулу CD38, по сравнению с контролем (рисунок 10).

Таким образом, после перенесенного гипоксически-ишемического повреждения ЦНС, практически все астроциты, входящие в состав НВЕ, являются CD38-иммунопозитивными.

Во всех подгруппах животных, перенесших воздействие гипоксии-

ишемии, уже через 4 часа, произошло статистически значимое увеличение соэкспрессии GFAP/CD38. Максимальный пик достигается к 10 суткам и составляет $33,9 \pm 7,8\%$. С 28 суток постнатального развития зафиксировано уменьшение соэкспрессии GFAP/CD38. Однако показатели остаются значимо выше значений контрольной группы - $27,8 \pm 5,9\%$.

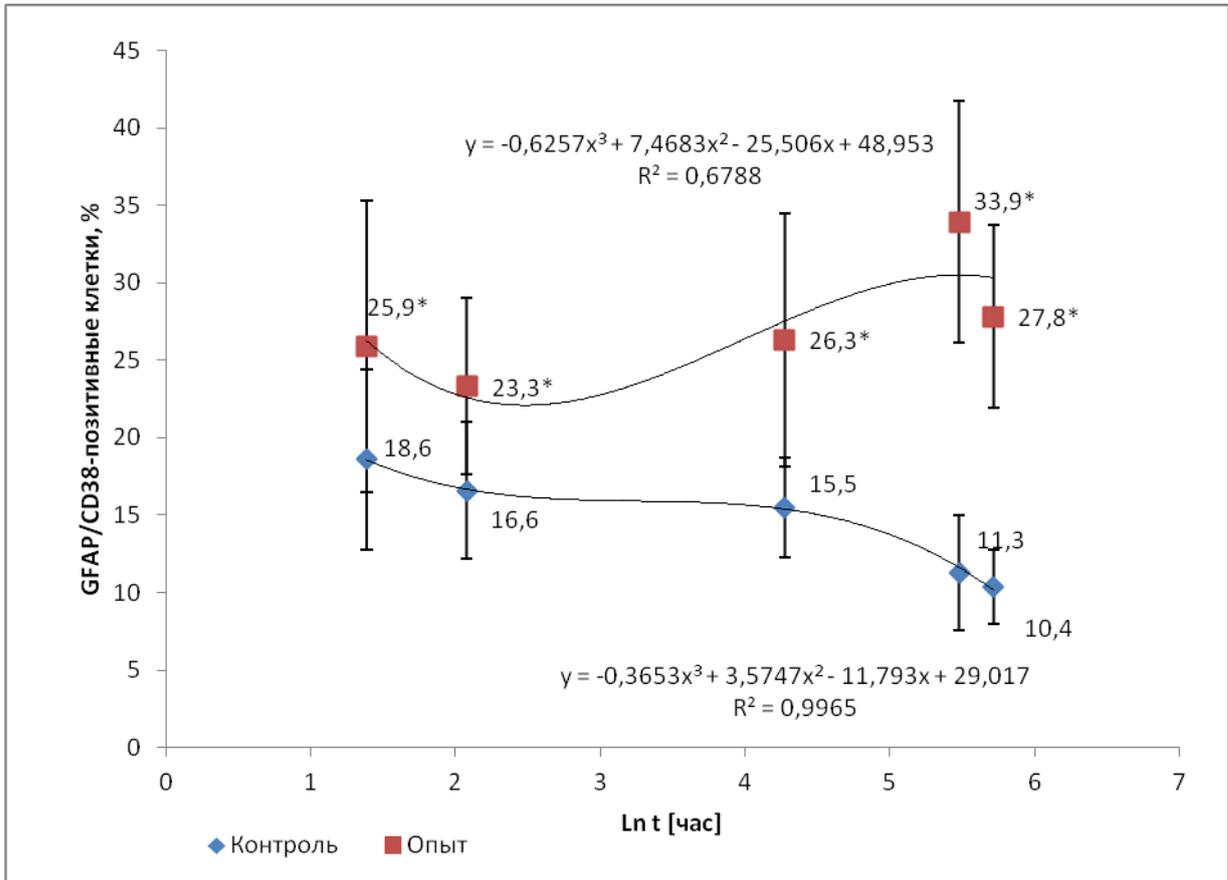


Рисунок 10 – Созэкспрессия GFAP/CD38 на клетках нейроваскулярной единицы животных контрольной и опытной групп (*- статистическая разница между указанной подгруппой и другими подгруппами ($p < 0,05$), критерий Манна-Уитни)

Итак, в острый период перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС происходит увеличение относительного количества клеток астроглиальной природы. Вероятно, это можно объяснить следствием развивающегося реактивного астроглиоза. Либо усилением процесса нейрогенеза. Многие клетки астроглии являются CD38-иммунопозитивными. К 28 дню после рождения количество астроцитов уменьшается, но при этом они остаются основными клетками, которые экспрессируют молекулу CD38.

Молекулой, функционально сопряженной на клетках нейрональной и глиальной природы с молекулой CD38, является коннексин-43 (Cx43), обеспечивающий транспорт НАД⁺ к активному центру фермента НАД⁺-гликогидролазы [187, 476].

Для определения роли Cx43 в патогенезе перинатального поражения ЦНС вследствие перенесенной гипоксии-ишемии мы регистрировали одновременную соэкспрессию молекул CD38 и Cx43 в клетках головного мозга (таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Соэкспрессия Cx43 и CD38 в GFAP-позитивных клетках головного мозга животных, (% , M±σ).

Подгруппа	Cx43+ клетки			Cx43+ клетки, экспрессирующие CD38		
	Опыт, n=16	Контроль, n=8	p	Опыт, n=16	Контроль, n=8	p
P7	11±0,9	12,3±0,9		71,5±9,6	76,0±9,0	
P7	11,5±1,5	12,0±1,9		81±5,6	78,0±8,3	
P10	13,4±0,9	8,7±1,7	<0,05	76±6,9	75,9±8,7	
P17	15±1,2	8,5±1,2	0,03	79,6±5,4	76,8±4,9	
P28	13,0±1,9	9±1,2	<0,05	75,0±9,7	73±10,9	

Примечания: p - статистическая значимость между группами опыта и контроля в соответствующих возрастных подгруппах, критерий Манна-Уитни.

Определяя долю клеток, которые экспрессировали молекулу Cx43 было установлено, что в первые 4-8 часов разница между опытной и контрольной группами отсутствует. Статистически значимое увеличение доли клеток, несущих на своей поверхности коннексин 43 произошло с 3 суток после патологического воздействия (подгруппа P10). Увеличение доли Cx43-иммунопозитивных клеток продолжалось до 10 суток (подгруппа P17) и составила 15±1,2%, превышая при этом показатели контрольной группы в 1,7 раза (p<0,05). Через три недели после перенесенной гипоксии-ишемии (подгруппа P28) относительное количество клеток, экспрессирующих

молекулу Сх43 уменьшилось, по сравнению с предыдущими возрастными подгруппами. Однако показатели оставались статистически значимо более высоким, чем у животных контрольной группы соответствующего возраста. Анализ соэкспрессии молекул Сх43 и CD38 позволил установить, что у животных опытной и контрольной групп, во всех изучаемых возрастных подгруппах соэкспрессия обеих молекул обнаруживается одинаково часто. То есть является сопоставимым. Относительное количество Сх43+/CD38+ клеток в опытной группе – $76,6 \pm 7,4\%$ и $75,9 \pm 8,2\%$ в контрольной.

Для идентификации вида клеток, которые экспрессируют коннексин-43, проведено определение соэкспрессии Сх43 с маркером клеток астроглии (GFAP) и маркером эндотелиальных (CD31). Результаты представлены в таблице 3.9.

Таблица 3.9 – Соэкспрессия GFAP и CD31 в Сх43-иммунопозитивных клетках головного мозга животных, (%), $M \pm \sigma$).

Подгруппа	Сх43/GFAP-позитивные клетки			Сх43/CD31-позитивные клетки		
	Опыт, n=16	Контроль, n=8	p	Опыт, n=16	Контроль, n=8	p
P7	$75,0 \pm 5,3$	$71,5 \pm 8,6$		$73,9 \pm 3,6$	$75,3 \pm 6,0$	
P7	$92,1 \pm 8,3$	$78,9 \pm 7,6$	<0,05	$70,2 \pm 2,6$	$74,9 \pm 6,4$	
P10	$97,9 \pm 1,7$	$76,0 \pm 9,6$	<0,05	$46,6 \pm 4,9$	$78,1 \pm 7,8$	0,03
P17	$95,8 \pm 3,9$	$78,1 \pm 3,4$	<0,05	$50,8 \pm 8,4$	$74,9 \pm 6,8$	0,03
P28	$74,9 \pm 10,9$	$77,7 \pm 5,0$		$65,9 \pm 7,7$	$75,3 \pm 3,9$	<0,05

Примечания: p - статистическая значимость между группами опыта и контроля в соответствующих возрастных подгруппах, критерий Манна-Уитни.

Известно, что Сх43 экспрессируется разными видами клеток головного мозга, однако доминирующей популяцией Сх43+-клеток являются астроциты, сопряженные посредством этих белков в т.н. астроглиальный синцитий.

Мы обнаружили, что увеличение количества клеток, экспрессирующих Сх43, после перенесенной гипоксии-ишемии, действительно, определяется астроцитами. Это можно увидеть по значительному увеличению количества Сх43 и GFAP-иммунопозитивных клеток у животных опытной группы (рисунок 11). Через 8 часов после патологического воздействия количество астроцитов, экспрессирующих Сх43, увеличивается с $78,9 \pm 7,6\%$ до $92,1 \pm 8,3\%$ ($p < 0,05$). Максимум соответствует 72 часам после патологического воздействия ($97,9 \pm 1,7\%$). Уменьшение количества Сх43-иммунопозитивных астроцитов начинается через 10 дней, и показатели достигают значений контрольной группы на 21 сутки после перенесенной гипоксии-ишемии (подгруппа P28).

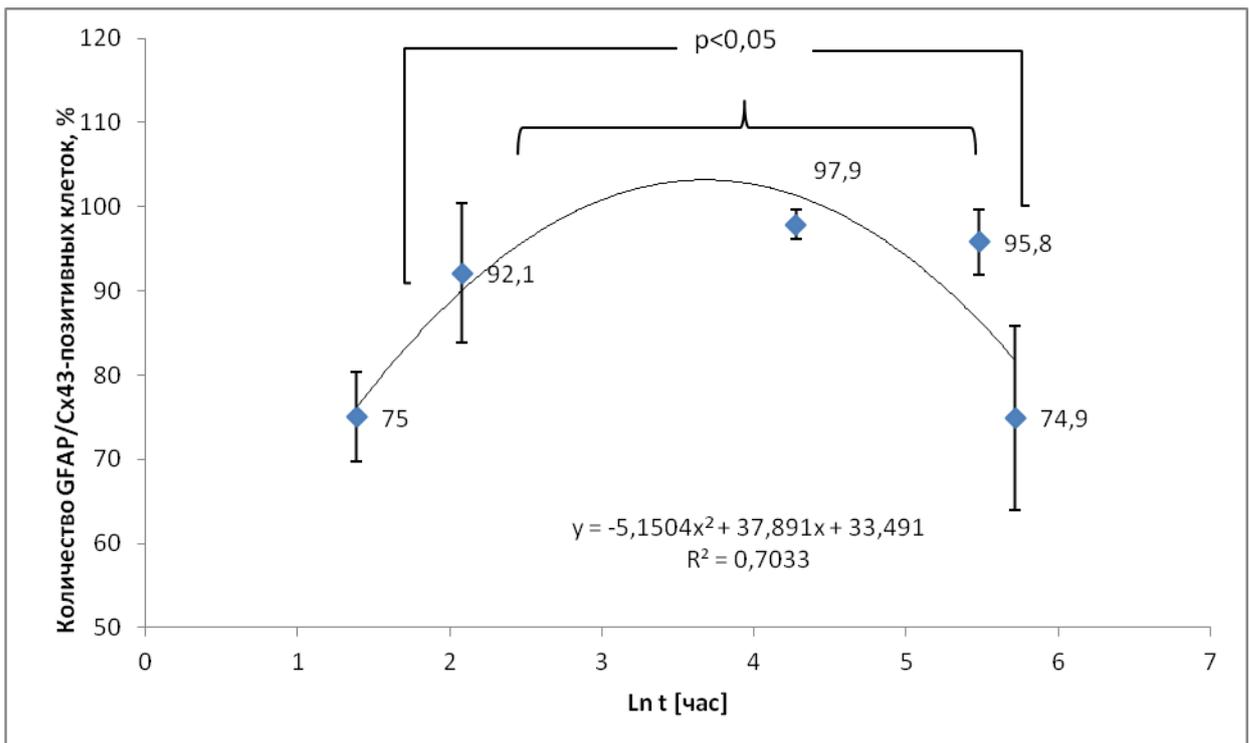


Рисунок 11 – Изменение экспрессии Сх43 на астроцитах в опытной группе животных

Иная картина экспрессии Сх43 наблюдается на эндотелиальных клетках головного мозга животных опытной группы (рисунок 12).

Через 72 часа после патологического воздействия наблюдалась минимальная экспрессия Сх43 эндотелиальными клетками ($46,6 \pm 4,9\%$). В

последующем наблюдалось постепенное увеличение до контрольных цифр к 28 суткам.

Однотипные изменения количества Сх43-иммунопозитивных клеток были обнаружены и в трехклеточной модели НВЕ *in vitro* (таблица 3.19). Характерно увеличение экспрессии коннексина 43 астроцитами и эндотелиальными клетками в сокультуре, находящейся в физиологических условиях. В условиях гипоксии происходит статистически значимое увеличение экспрессии Сх43 на астроцитах с $21,0 \pm 6,0\%$ до $59,0 \pm 12,0\%$. При этом значимых изменений на эндотелиальных клетках не обнаружено.

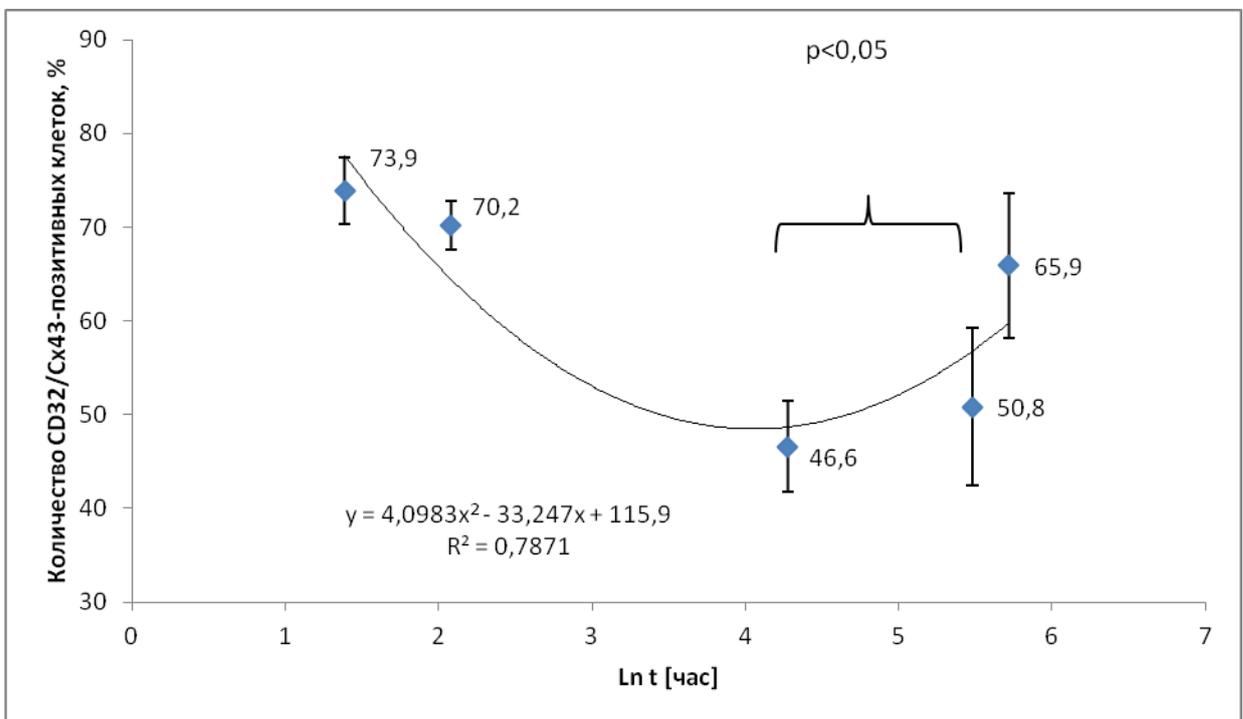


Рисунок 12 – Изменение экспрессии Сх43 на церебральных эндотелиоцитах в опытной группе животных

Таким образом, на фоне гипоксически-ишемического поражения ЦНС, уже через 4-8 часов, происходит увеличение общего количества клеток экспрессирующих Сх43, в основном, за счет астроцитов. Одновременно с этим количество эндотелиоцитов головного мозга, экспрессирующих Сх43 уменьшается. Восстановление произошедших изменений наблюдается через

3 недели после гипоксически-ишемического поражения ЦНС.

Обнаруженные изменения свидетельствуют о том, что процессы реактивного астроглиоза сопровождаются усилением функционального сопряжения клеток астроглии и скоординированной соэкспрессией молекул Cx43 и CD38. Эти молекулы принимают участие в поддержании гомеостаза НАД⁺ в клетках, регулируют процессы НАД⁺-конверсии в Ca²⁺-мобилизирующий мессенджер. Такие процессы можно рассматривать как необходимый компонент при активации и миграции предшественников и зрелых клеток астроглиальной природы.

Одновременное угнетение экспрессии молекулы Cx43 на клетках эндотелия, вероятнее всего, отражает процессы дизрегуляции барьерогенеза, как ранее было предположено [262, 332, 550].

В целом, можно предположить, что обнаруженные нами особенности экспрессии молекул Cx43 и CD38 являются новыми маркерами, свидетельствующими о нарушениях структуры и функциональной целостности НВЕ/ГЭБ при гипоксически-ишемическом повреждении головного мозга.

3.1.4 Особенности экспрессии белков, транспортирующих глутамин, глутамат, гидрофобные молекулы, монокарбоксилатных транспортеров (MCT1, MCT4) и транспортера глюкозы (GLUT4) в клетках НВЕ *in vivo*

Интегральным показателем структурной и функциональной целостности нейроваскулярной единицы и гематоэнцефалического барьера является проницаемость ГЭБ.

Известно, что проницаемость ГЭБ регулируется активностью большого числа транспортных белков, и изменение экспрессии или активности этих молекул может быть вызвано действием различных повреждающих факторов.

Для определения роли белков, участвующих в регуляции коммуникации между клетками НВЕ в условиях перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС мы изучили экспрессию Р-гликопротеина (Pgp) и белка SLC1A5 клетками НВЕ. Pgp является транспортером гидрофобных ксенобиотиков. SLC1A5 – транспортер глутамин. Кроме этого провели регистрацию соэкспрессии этих двух белков и маркеров нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов. Полученные результаты представлены в таблицах 3.10 и 3.11.

Нейронов, которые несли на своей поверхности Р-гликопротеин, в группе интактных животных не было обнаружено. В опытной группе животных, зарегистрировано статистически значимое увеличение числа нейронов, которые экспрессировали Pgp, в сравнении с контрольной группой. Через 4 часа после гипоксически-ишемического влияния относительное число Pgp-иммунопозитивных нейронов повысилось до $11,3 \pm 3,4\%$. Еще через 4 часа (P7) общее количество Pgp-позитивных нейронов увеличилось до $16,7 \pm 4,3\%$ ($p < 0,05$).

Таблица 3.10 – Количество Pgp-позитивных клеток, (%), $M \pm \sigma$.

Подгруппа	Нейроны		Астроциты		Эндотелиоциты	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
P7`	$11,3 \pm 3,4^*$	0	$16,3 \pm 4,9^*$	$1,7 \pm 1,1$	$8,7 \pm 2,7^*$	$3,3 \pm 0,8$
P7	$16,7 \pm 4,3^*$	0	$17,1 \pm 3,5^*$	$1,5 \pm 0,9$	$16 \pm 2,1^*$	$3,9 \pm 0,4$
P10	$18,0 \pm 5,5^*$	0	$13,7 \pm 3,1^*$	$2,1 \pm 0,4$	$20,8 \pm 1,7^*$	$2,7 \pm 1,2$
P17	$9,1 \pm 2,1^*$	0	$12,1 \pm 4,2^*$	$1,4 \pm 0,6$	$16,0 \pm 2,7^*$	$2,5 \pm 0,7$
P28	$7,6 \pm 1,4^*$	0	$10,1 \pm 2,6^*$	$1,9 \pm 0,5$	$15,1 \pm 1,8^*$	$3,2 \pm 0,6$

Примечания: * - уровень значимости между группами $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни.

В дальнейшем, до 3 суток после перенесенной гипоксии-ишемии, количество нейронов, несущих на своей поверхности белок лекарственной устойчивости, практически, не увеличилось - $18,0 \pm 5,5\%$. В опытной подгруппе P17 зафиксировано снижение количества Pgp-иммунопозитивных нейронов в два раза, по сравнению с подгруппой P10 - $9,1 \pm 2,1\%$ ($p < 0,01$).

Уменьшение их количества наблюдалось до 28 суток постнатального развития (до $7,6 \pm 1,4\%$).

У животных в группе контроля количество клеток НВЕ, экспрессирующих Pgp, значимо не изменилось за весь период наблюдений. Pgp-иммунопозитивные астроциты - $0,6-2,8\%$, эндотелиоциты - $1,5-4,3\%$. Нейронов, экспрессирующих Р-гликопротеин, в группе контроля не обнаружено.

Клеток астроглиальной природы, экспрессирующих Pgp, у животных в опытной группе, наравне с эндотелиальными клетками было статистически значимо больше, чем в контрольной группе.

Статистически значимое повышение количества Pgp+-клеток наблюдалось в очень ранние сроки после гипоксически-ишемического воздействия. Через 4 часа число Pgp+ астроцитов увеличилось в 9,5 раз, эндотелиальных клеток в 2,6 раза. К 8 часу зафиксировано дополнительное увеличение количество Pgp+-астроцитов до $17,1 \pm 3,5\%$, и статистически значимо увеличилось число Pgp-позитивных эндотелиоцитов - практически в два раза, по сравнению с подгруппой P7'. При сравнении с контрольной группой количество Pgp-иммунопозитивных клеток было больше в 4 раза ($p < 0,05$).

Через 72 часа после перенесенного патологического воздействия зафиксировано снижение количества Pgp+ астроцитов. К 21 суткам (подгруппа P28) их количество достигло значения $10,1 \pm 2,6\%$, оставаясь в 5,3 раза выше, по сравнению с соответствующей подгруппой контрольных животных.

Однако с эндотелиальными клетками наблюдалась иная ситуация. Так, на 3 сутки (подгруппа P10) после гипоксически-ишемического поражения зафиксировано более высокое содержание числа Pgp+ эндотелиальных клеток ($20,8 \pm 1,7\%$). В этой временной подгруппе было максимальное содержание Pgp+ эндотелиоцитов, по сравнению с другими подгруппами

($p < 0,01$). Превышение показатель по сравнению с соответствующей подгруппой контрольных животных было в 7,7 раз.

После трех суток наблюдалось уменьшение количества эндотелиальных клеток, содержащих изучаемый белок. На 21 сутки (подгруппа P28) после перенесенного повреждения ЦНС количество Pgp+ эндотелиоцитов превышало контрольные показатели в 4,7 раза ($p < 0,05$).

Экспрессия транспортера глутамин (белок SLC1A5) была зарегистрирована на астроцитах и нейронах. Во всех подгруппах у животных из контрольной группы количество нейронов и астроцитов, экспрессирующих SLC1A5 был практически одинаков. На эндотелиоцитах экспрессии не зарегистрировано (таблица 3.11).

Таблица 3.1 – Созэкспрессия SLC1A5 и меток НВЕ, (%), $M \pm \sigma$.

Подгруппа	Нейроны		Астроциты	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
P7`	2,4 \pm 1,1	2,1 \pm 0,6	5,8 \pm 0,3	5,2 \pm 0,1
P7	20,0 \pm 8,0*	2,5 \pm 0,3	9,0 \pm 1,0*	4,5 \pm 0,5
P10	23,0 \pm 5,0*	1,5 \pm 0,1	22,0 \pm 6,0*	4,8 \pm 0,3
P17	0,4 \pm 0,2*	2,2 \pm 0,8	18,0 \pm 4,0*	4,7 \pm 0,2
P28	0,3 \pm 0,1*	1,8 \pm 0,4	4,8 \pm 0,4	5,1 \pm 0,2

Примечания: * - уровень значимости между группами $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни.

В подгруппе P7 экспериментальных животных зафиксировано десятикратное увеличение экспрессии SLC1A5 нейронами. Такое повышенное содержание SLC1A5-иммунопозитивных нейронов, сохранялось до 10 суток, после чего наблюдалось быстрое снижение. Относительное количество в подгруппах P17 и P28 статистически значимо ниже, чем в контрольной группе животных (рисунок 13).

В целом, можно сделать заключение о влиянии гипоксии-ишемии на экспрессию транспортера глутамин SLC1A5 клетками НВЕ *in vivo*. В эксперименте, проведенном с использованием клеточной модели НВЕ, были обнаружены однотипные влияние гипоксии-ишемии на экспрессию SLC1A5,

которые сопоставимы с результатами, полученными *in vivo*. При развитии острой гипоксии *in vitro* произошло пятикратное увеличение числа астроцитов и нейронов, экспрессирующих SLC1A5 (таблица 3.19).

При оценке характера изменения содержания транспортера глутамата EAAT2 на клетках НВЕ, эта молекула, как и ожидалось, была обнаружена только на GFAP-позитивных клетках, т.е. астроцитах (таблица 3.12).

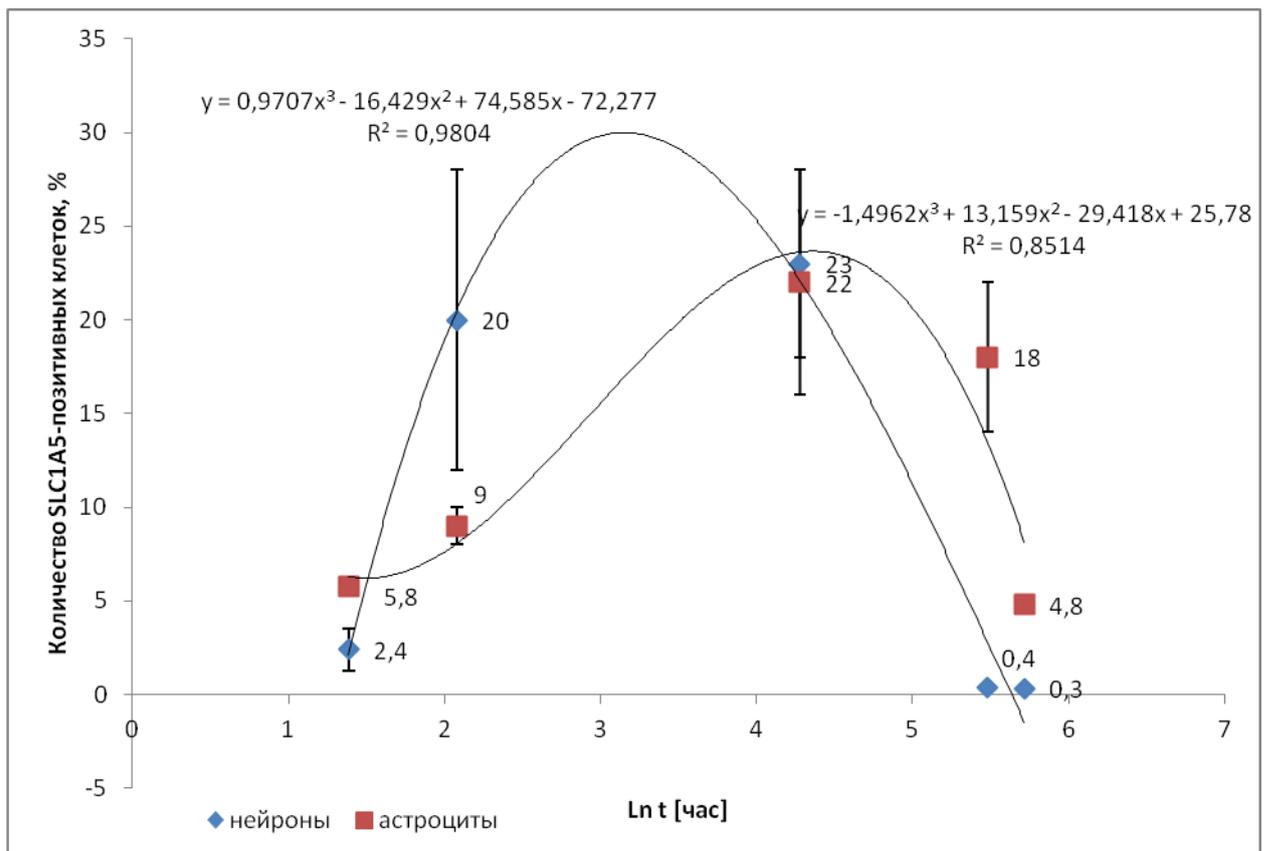


Рисунок 13 – Изменение экспрессии SLC1A5 на нейронах и астроцитах в опытной группе животных

В отношении транспортера глутамата – EAAT2 получены следующие результаты. У крыс из группы контроля, практически отсутствовали изменения количества EAAT2-иммунопозитивных астроцитов - 40-60%.

Таблица 3.12 – Количество EAAT2-позитивных клеток, (%), $M \pm \sigma$.

Подгруппа	EAAT2+-астроциты	
	Опыт	Контроль
P7`	24,6±3,8*	50,3±5,6
P7	23,0±5,5*	46,8±6,3
P10	65±4,1*	52,7±3,8
P17	72,1±4,2*	48,8±7,2
P28	54,1±2,6	52,1±6,2

Примечания: * - уровень значимости между группами $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни.

Для первых 8 часов после воздействия гипоксии-ишемии характерно выраженное снижение числа клеток экспрессирующих транспортер глутамата EAAT2. Однако с 3 по 10 сутки зафиксированное увеличение количества EAAT2-позитивных клеток. Нормализация показателя клеток, экспрессирующих EAAT2, до значений, сопоставимых с контрольными животными, произошла к 28 суткам после рождения. В контрольной группе животных изменений не было зафиксировано.

Далее в эксперименте на клеточной модели НВЕ *in vitro* в опытной группе на клетках астроглии мы также установили, что произошло уменьшение количества клеток, экспрессирующих EAAT2 (таблица 3.19). Таким образом, наши результаты, полученные в эксперименте *in vivo*, не противоречат данным, полученным в последующих этапах исследования *in vitro*, а подтверждают его. Примечательно, что в литературе есть указания на то, что высокий уровень экспрессии EAAT2 регистрируется в областях перивентрикулярной лейкомаляции [472, 520].

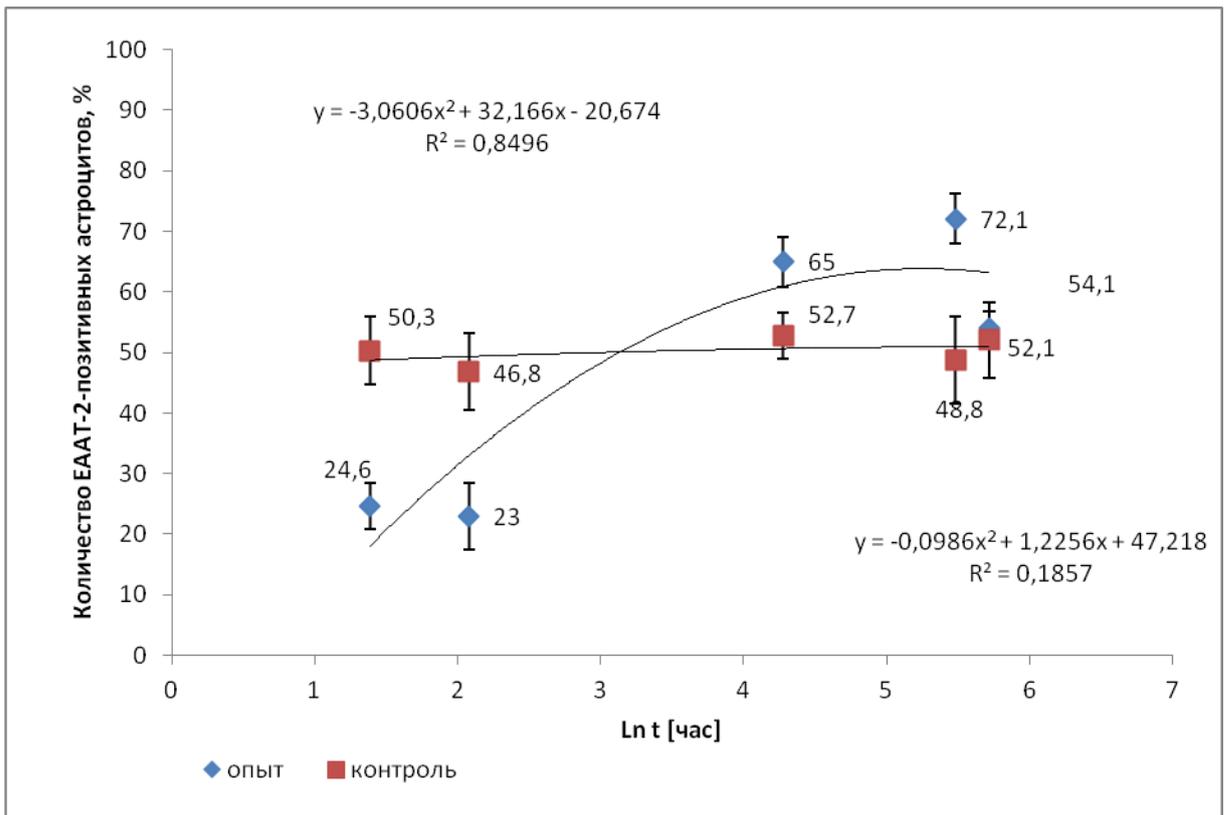


Рисунок 14 – Изменение экспрессии EAAT2 на астроцитах у животных контрольной и опытной групп

Итак, первыми клетками, которые реагируют на перинатальное гипоксически-ишемическое повреждение, являются астроглиальные клетки. По прошествии 4 часов появляется большое число астроцитов, экспрессирующих Р-гликопротеин. В дальнейшем наблюдается постепенное уменьшение числа Pgp-иммунопозитивных астроцитов.

К 3-м суткам произошло максимальное увеличение экспрессии Pgp в нейронах и клетках эндотелия. При этом эндотелиоциты являются клетками, которые максимально долго сохраняют повышенную экспрессию Р-гликопротеина. Так в подгруппе P28 у животных опытной группы количество Pgp-позитивных клеток в 5 раз выше контрольных показателей и больше, чем Pgp⁺-нейронов и Pgp⁺-астроцитов.

Через 8 часов после гипоксически-ишемического повреждения в клетках нейроваскулярной единицы происходит увеличение экспрессии нейронального транспортера SLC1A5 в 10 раз. Через 10 дней происходит резкое снижение их количества. При этом показатель был ниже, чем

контрольные значения. Одновременно с этим происходит увеличение числа астроцитов содержащих SLC1A5 (пятикратно), которое остается повышенным намного дольше – до 10 суток после гипоксически-ишемического поражения, снижаясь лишь к 4 неделе после повреждения.

Изменения экспрессии астроцитарных транспортеров глутамата показывают время-зависимый разнонаправленный характер. Для первых 8 часов характерно снижение, а в последующем, с 3 по 10 сутки - увеличение EAAT2-иммунопозитивных клеток. Нормализация наблюдалась к 28 суткам постнатального развития.

Анализируя полученные в ходе исследования данные, мы можем сказать, что при ишемическом перинатальном повреждении в клетках нейроваскулярной единицы головного мозга характерны изменения, которые свидетельствуют о нарушении механизмов метаболического сопряжения между астроглией и нейронами, а также механизмами проницаемости ГЭБ, контролируемые эндотелиоцитами.

В целом, можно сделать заключение, что в результате перинатального гипоксически-ишемического повреждения НВЕ происходят изменения экспрессии Р-гликопротеина как транспортера гидрофобных молекул, наравне с транспортерами глутамин и глутамата, которые обеспечивают захват и утилизацию глутамата из активированных астроцитами нейронов, с последующим переносом глутамин в клетках нейрональной природы. Кроме того, клетки НВЕ после перенесенной гипоксии-ишемии отличаются aberrантной экспрессией CD38 и Cx43, что свидетельствует о нарушении локального метаболизма и транспорта НАД⁺.

3.1.5 Изменения транспорта и продукции лактата в НВЕ *in vivo*

С учетом данных о том, что неонатальный мозг преимущественно в качестве основного энергетического субстрата утилизирует лактат [329, 450], что впоследствии сменяется использованием, мы изучили особенности

экспрессии транспортеров глюкозы (GLUT4) и лактата (MCT1, MCT4) в клетках церебрального эндотелия на разных этапах онтогенеза у экспериментальных животных.

Монокарбоксилатные транспортеры 1 и 4 подтипов (MCT1, MCT4), экспрессируемые эндотелиоцитами и астроцитами головного мозга, относятся к белкам-транспортерам суперсемейства SLC (solute-linked carrier), а именно к семейству SLC16 (16 класс). Главная физиологическая роль обозначенных переносчиков заключается в осуществлении транспорта веществ, которые не проникают через ГЭБ другим путем и имеют высокую степень гидрофильности или ионизации [461]. Так MCT1 и MCT4 отвечают за транспортировку лактата, пирувата и кетоновых тел через клеточную мембрану, что, в свою очередь, может стимулировать в эндотелиоцитах ядерный фактор каппа В (NF- κ B), продукцию и активацию интерлейкина-8 (ИЛ-8) и HIF1, что приводит к активации ангиогенеза [285, 452]. Убедительно доказано, что при блокировании функции MCT-белков наблюдается снижение ангиогенеза и угнетение метаболизма в клетках вследствие снижения концентрации лактата и ингибирования активности HIF-1 [330, 516].

Транспортер глюкозы, а именно GLUT4 является еще одним белком суперсемейства SLC (SLC2A4 или транспортер глюкозы 4 типа). Выраженная экспрессия этого белка регистрируется в клетках гиппокампа, в первую очередь в нейронах и эндотелиоцитах [281, 282]. Функции и активность GLUT4 регулируется инсулином: при низкой концентрации инсулина GLUT4 находится во внутриклеточных везикулах, при повышении концентрации происходит активация инсулиновых рецепторов клеток, генерируется сигнал, который приводит к стимуляции экзоцитоза внутриклеточных GLUT4 везикул по направлению к плазматической мембране и наблюдается транслокация GLUT4, что, в итоге, облегчает проникновение глюкозы внутрь клеток [557].

Результаты исследования особенностей экспрессии транспортных белков, участвующих в межклеточной коммуникации и метаболическом сопряжении клеток НВЕ, представлены в таблицах 3.13-3.15.

Количество МСТ1+-эндотелиоцитов и астроцитов в контрольной группе, в гиппокампе, коре и миндалине значительно уменьшается к 28 дню постнатального развития (таблица 3.13). Интересно, что после гипоксически-ишемического повреждения отмечается более высокое, по сравнению с контролем, количество МСТ1-иммунопозитивных эндотелиоцитов в области гиппокампа. При этом к 28 дню жизни зафиксировано статистически значимое превышение количества МСТ1⁺ эндотелиоцитов во всех изучаемых анатомических областях головного мозга по сравнению с контрольной группой, где произошло уменьшение изучаемого показателя ($p < 0,05$).

Таблица 3.13 – Динамические изменения экспрессии МСТ1 клетками нейроваскулярной единицы *in vivo*.

МСТ1 позитивные клетки		P7	P28	
Контроль	Гиппокамп	Астроциты	11,9±2,1	2,7±0,7*
		Эндотелиоциты	30,2±2,6	11,4±1,6*
	Кора	Астроциты	5,5±1,6 [#]	6,8±3,8
		Эндотелиоциты	39,7±2,9	27,8±2,7*
	Миндалина	Астроциты	26,6±3,4	19±2,8*
		Эндотелиоциты	35,1±3,9	17,6±2,4*
Гипоксия	Гиппокамп	Астроциты	13,3±1,6	15,1±1,6 [#]
		Эндотелиоциты	52,0±1,8 [#]	41,6±2,4 [#]
	Кора	Астроциты	20,3±2 [#]	14,7±1,9 [#]
		Эндотелиоциты	32,0±1,5	57,2±3,4 [#]
	Миндалина	Астроциты	10,1±1,7 [#]	20,1±2,5*
		Эндотелиоциты	37,2±2,1	47,3±3,6 [#]

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

Одновременно с этим изменения количества астроцитов, экспрессирующих МСТ1, в опытной группе были более разнообразными. Так, уже через 8 часов после гипоксически-ишемического воздействия

зафиксировано практически четырехкратное увеличение числа МСТ1-иммунопозитивных астроцитов в коре головного мозга и трехкратное уменьшение их количества в области миндалины. К 28 суткам жизни количество МСТ1+ астроцитов оставалось более высоким в области гиппокампа и коры по сравнению с группой контроля, при этом в области миндалины произошло увеличение числа изучаемых астроцитов до нормальных показателей ($p < 0,05$).

МСТ4 экспрессируется в клетках астроглиальной природы и отражает потребность клеток в высвобождении лактата из клеток при интенсивном гликолизе, в том числе для транспортировки лактата к нейронам, испытывающим потребность в энергетическом субстрате. Мы обнаружили, что перинатальное гипоксически-ишемическое повреждение вызывает резкое увеличение МСТ4+ астроцитов в первые часы после ГИП (P7) с последующим уменьшением их количества к 28 суткам постнатального развития в гиппокампе, коре и миндалине (таблица 3.14), 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.

У животных контрольной группы количество МСТ4+-эндотелиоцитов в области гиппокампа с периода P7 до периода P28 практически не изменилось, в коре головного мозга произошло полуторакратное увеличение МСТ4-иммунопозитивных эндотелиальных клеток, а в области миндалины – уменьшение ($p < 0,05$). После перенесенной гипоксии-ишемии уже через 8 часов наблюдалось резкое увеличение количества эндотелиоцитов, экспрессирующих МСТ4 в области гиппокампа ($85,5 \pm 4,2\%$) по сравнению с контрольной группой ($43,2 \pm 8,1\%$), в остальных изучаемых анатомических областях головного мозга значимых изменений не было 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 высокий в области гиппокампа.

Таблица 3.14 – Динамические изменения экспрессии МСТ4 клетками нейроваскулярной единицы *in vivo*.

МСТ4 позитивные клетки			P7	P28
Норма	Гиппокамп	Астроциты	0	12,6±1,4*
		Эндотелиоциты	43,2±8,1	41,1±4,4
	Кора	Астроциты	9,7±5,3	17,8±2,6*
		Эндотелиоциты	51,0±7,1	76,1±2,8*
	Миндалины	Астроциты	5,3±2,5	10,9±3,1*
		Эндотелиоциты	83,3±6,8	54,2±10,1*
Гипоксия	Гиппокамп	Астроциты	20,6±4,9 [#]	3,2±1,8* [#]
		Эндотелиоциты	85,5±4,2 [#]	72,3±3* [#]
	Кора	Астроциты	25,6±7 [#]	2,0±1,4* [#]
		Эндотелиоциты	57,5±4,7	70,6±3,7*
	Миндалины	Астроциты	36,6±6,2 [#]	6,8±3,2*
		Эндотелиоциты	76,7±6,4	61,1±3,7*

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

Экспрессия GLUT4 в клетках эндотелия определяет особенности транспорта глюкозы через ГЭБ и биодоступность глюкозы для реакций гликолиза (таблица 3.15). В физиологических условиях количество нейронов, экспрессирующих транспортер глюкозы GLUT4, 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. произошло постепенное увеличение, однако в коре головного мозга этот показатель практически не меняется и остается достаточно высоким - на уровне 79-85%.

При развитии гипоксически-ишемического повреждения ЦНС зафиксировано резкое увеличение количества GLUT4-иммунопозитивных эндотелиоцитов в области гиппокампа и миндалин уже в первые часы

(подгруппа P7) ($p < 0,05$). В этот же период времени количество нейронов, экспрессирующих изучаемый транспортер не менялось. Однако к 28 суткам жизни зафиксировано статистически значимо меньшее количество GLUT4+-нейронов, по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). То есть 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.

Таблица 3.15 – Динамические изменения экспрессии GLUT4 клетками нейроваскулярной единицы.

GLUT4 позитивные клетки		P7	P28	
Контроль	Гиппокамп	Нейроны	21,4±3	37,6±2,9*
		Эндотелиоциты	57,3±4,4	69,5±2,7*
	Кора	Нейроны	25,2±3,6	32,6±3,6*
		Эндотелиоциты	82,7±3	80,7±1,7
	Миндалина	Нейроны	23,2±1,8	30,8±2,5*
		Эндотелиоциты	43,3±6,1	68±3,5*
Гипоксия	Гиппокамп	Нейроны	22,2±1,8	14,2±2,7*#
		Эндотелиоциты	93,8±3 [#]	84,7±4,7 [#]
	Кора	Нейроны	20,1±1,8	24,6±2,6 [#]
		Эндотелиоциты	81,1±2,8	90,9±4,3
	Миндалина	Нейроны	23,5±3,1	16,1±1,2*#
		Эндотелиоциты	88,8±7,4 [#]	93,9±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, стресс.

При анализе концентрации лактата в клетках гиппокампа и миндалины 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 гипоксически-ишемического воздействия концентрация внутриклеточного лактата в клетках гиппокампа и миндалина оказалась статистически значимо ниже во все возрастные периоды по сравнению с группой интактных животных ($p < 0,05$) и практически не имела динамических изменений. Так, 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).

Обнаруженные особенности динамики внутриклеточной концентрации лактата у животных группы контроля соответствуют динамике числа клеток, экспрессирующих МСТ4 клетками, когда с возрастом увеличивается количество монокарбоксилатных транспортеров, выводящих лактат из клеток. В условиях перинатального гипоксически-ишемического повреждения клеток головного мозга произошло резкое увеличение числа клеток, экспрессирующих МСТ4 (P7), что, вероятно, и может объяснить более низкие показатели внутриклеточного лактата в клетках головного мозга животных опытной группы.

Можно предположить, что повреждение головного мозга ассоциировано с сохранением высокой экспрессии транспортеров лактата, что, однако, не препятствует физиологическому нарастанию транспорта глюкозы. Одним из механизмов адаптации клеток НВЕ является обеспечение одновременного использования лактата и глюкозы в качестве энергетических субстратов в неонатальном периоде, что контролируется HIF-1 и сопряженными сигнальными молекулами.

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 гипоксическом 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

Таким образом, в результате проведенного исследования получены новые фундаментальные данные о механизмах астроцит-зависимой организации нейроваскулярной единицы/гематоэнцефалического барьера в развивающемся мозге в норме и при патологии (перинатальное гипоксическое повреждение головного мозга) на основе характеристики особенностей экспрессии молекул-транспортёров в головном мозге, включенных в межклеточные взаимодействия и регуляцию локального метаболизма (поступление глюкозы в клетки, гликолиз, транспорт лактата) в динамике постнатального развития.

3.1.6 Оценка проницаемости гематоэнцефалического барьера *in vivo*

Учитывая, что в физиологических условиях ГЭБ является малопроницаемым для альбумина, а краситель Evans blue связывается с альбумином, то проницаемость ГЭБ для указанного красителя должна быть ограничена. На этом свойстве основывается один из широко применяемый методов оценки проницаемости ГЭБ. В патологических условиях, которые приводят к дисфункции клеток НВЕ, в первую очередь за счет изменения функциональной активности эндотелиальных клеток, можно оценить степень изменений проницаемости ГЭБ, т.к. наблюдается повышенная экстравазация красителя Evans blue в паренхиму головного мозга. Участки головного мозга с повышенной проницаемостью показывают увеличение синей окраски по сравнению с интактными.

На основании того, что степень нарушения проницаемости сосудов можно оценить методом простой визуализации или путем количественного измерения красителя в интересующих участках головного мозга была проведена оценка проницаемости гематоэнцефалического барьера *in vivo* в контрольной и опытной группах животных.

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

Нами установлено, что 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 (таблица 3.16).

Таблица 3.16 – Содержание красителя Evans blue в гомогенате полушария животных (мкг красителя/г ткани) и коэффициент проницаемости, ($M \pm \sigma$).

Подгруппа	Содержание (мкг/г)			Коэффициент проницаемости		
	Опыт	Контроль	p	Опыт	Контроль	p
P7	0,8±0,02	0,4±0,09	0,03	1,05±0,1	0,45±0,01	0,01
P17	5,7±0,5	4,6±0,6		5,18±0,5	4,18±0,05	

Примечания: p - статистическая значимость между опытной и контрольной группами, критерий Манна-Уитни.

Так как одновременно с определением содержания красителя Evans blue регистрировали его концентрацию в крови экспериментальных животных, то были произведены расчеты коэффициента проницаемости ГЭБ.

При этом, как и ожидалось коэффициент проницаемости для животных опытной группы оказался значительно выше, по сравнению с животными группы контроля и составил 1,05 против 0,45, соответственно ($p < 0,05$), т.е. на 57% больше. К 14 суткам развития (7 сутки после гипоксически-ишемического повреждения) наблюдается статистически значимо более высокий коэффициент проницаемости ГЭБ, однако разница с коэффициентом проницаемости контрольной группы стала не такой выраженной – всего на 19% больше, чем в группе контроля ($p < 0,05$).

Анализ содержания красителя Evans blue в отдельных областях головного мозга (гиппокамп, кора, миндалевидное тело) показал (таблица 3.17), что 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.

Таблица 3.17 – Содержание красителя Evans blue в отдельных областях головного мозга у экспериментальных животных, мкг/г.

Подгруппа	Область головного мозга								
	Гиппокамп			Кора			Миндалина		
	Опыт	Контроль	p	Опыт	Контроль	p	Опыт	Контроль	p
P7	0,5±0,2	0,1±0,05	0,01	0,4±0,07	0,3±0,04		1,5±0,8	0,3±0,1	0,01
P17	3,1±0,2	1,8±0,5	0,03	4,2±0,3	4±0,6		3,6±0,5	3,1±0,5	

Примечания: p - статистическая значимость между опытной и контрольной группами, критерий Манна-Уитни.

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.

Установленные особенности содержания красителя Evans blue согласуются с данными, полученными при анализе особенностей экспрессии белков плотных контактов, а также 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 дизрегуляции гликолитической активности в клетках церебральных микрососудов.

3.2 Результаты комплексной оценки состояния НВЕ *in vitro*

Для подтверждения наших предположений следующий этап работы исследования был выполнен с использованием собственной оригинальной клеточной модели нейроваскулярной единицы/ГЭБ *in vitro*.

3.2.1 Разработка и применение моделей НВЕ/ГЭБ *in vitro*

Разработанные нами модели НВЕ/ГЭБ *in vitro* (подробные протоколы представлены в главе «Материалы и методы») по своим характеристикам являются многокомпонентными, статическими, выполненными с использованием первичной культуры церебральных микрососудов и стволовых клеток эмбрионального мозга в качестве источника нейронов и периваскулярной астроглии.

Модель НВЕ представляет собой микс клеток (эндотелиоциты, астроциты, нейроны) в чашке Петри или в лунке планшета, функциональная активность которых поддерживается средой определенного состава. Эта модель позволяет оценить базовые межклеточные взаимодействия, а также характер повреждения клеток НВЕ при действии патогенных факторов. Однако эта модель не может использоваться для оценки структурной целостности ГЭБ (рисунок 15).

Модель ГЭБ представляет собой трехклеточную со-культуру, в которой астроциты и нейроны растут вместе в нижней камере, а церебральные эндотелиоциты формирует монослой на полупроницаемой мембране (диаметр пор 0,4 мкм) в специальной «вставке», что исключает прямой контакт эндотелия с другими периваскулярными клетками (рисунок 16). Эта модель позволяет, помимо оценки межклеточных взаимодействий, обеспечиваемых гуморальными факторами, высвобождающимися из клеток барьера, оценить структурную целостность и проницаемость ГЭБ *in vitro*.

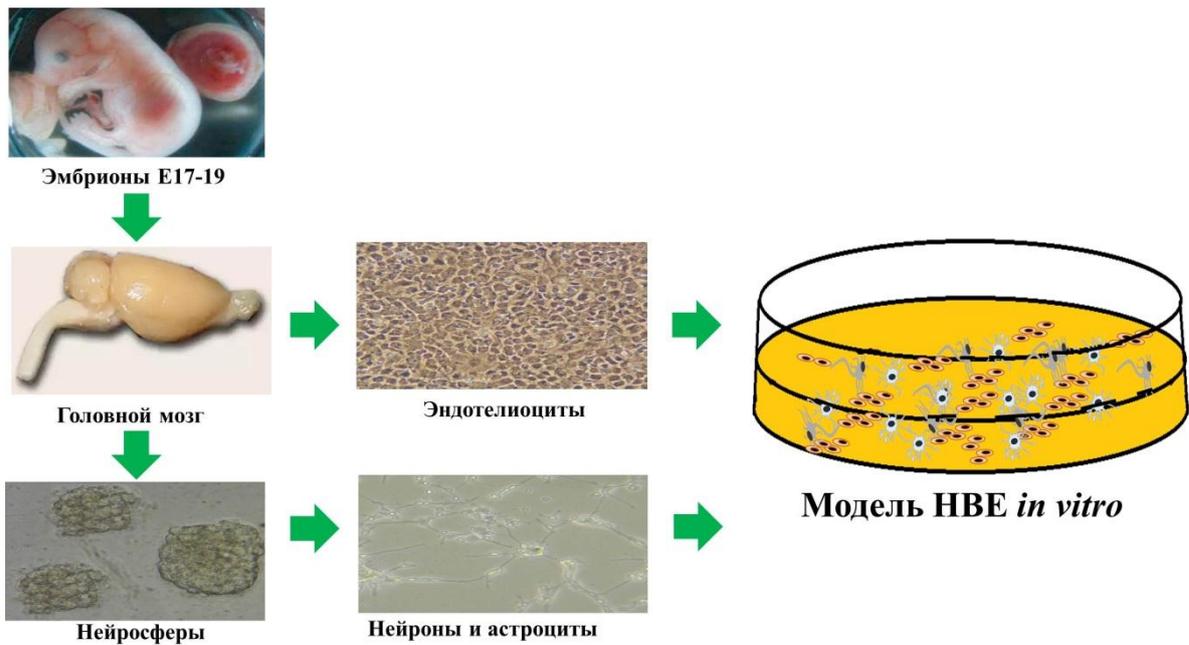


Рисунок 15 – Схема получения оригинальной модели нейроваскулярной единицы *in vitro*

Обе модели применимы для исследования механизмов ангиогенеза и барьерогенеза, метаболизма клеток, работы основных транспортных систем. Использование той или иной модели зависит от поставленных задач.

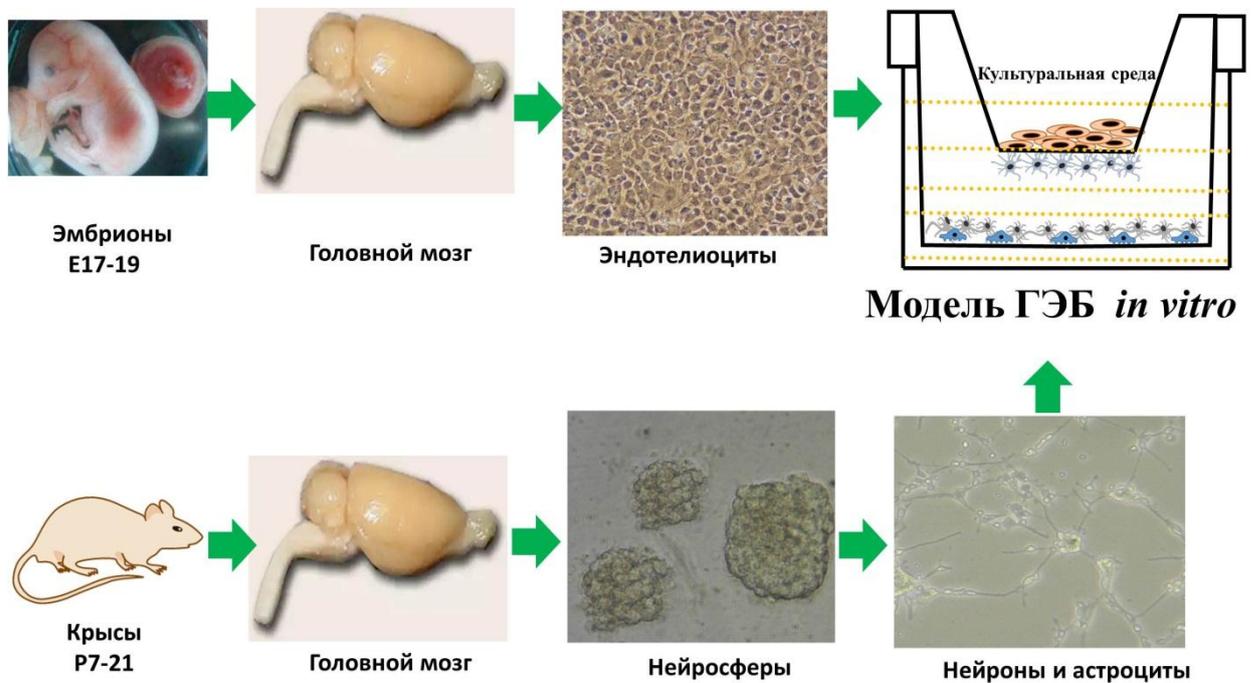


Рисунок 16 - Схема получения оригинальной модели гематоэнцефалического барьера *in vitro*

Разные источники клеток (церебральные эндотелиоциты, стволовые клетки гиппокампа или коры эмбрионов животных) позволяют использовать в разработанных нами моделях различные подходы к моделированию патологических состояний головного мозга (например, эндотелий, полученный от животных с гипоксическим или иным повреждением, в сочетании с интактными клетками нейрональной и астроглиальной природы; либо интактные эндотелиоциты в сочетании с нейронами и астроцитами, полученными от животных, перенесших внутриутробную гипоксию). Контролируемая дифференцировка стволовых эмбриональных клеток в астроциты и нейроны, которые формируют модели НВН/ГЭБ, позволяет *in vitro* модифицировать отдельные этапы барьерогенеза направленным образом (генетические и эпигенетические манипуляции, изменение метаболизма). Обе оригинальные модели являются воспроизводимыми, обладают средней ресурсозатратностью (по сравнению с аналогами) и обладают потенциалом к расширению их применения (например, на их основе нами дополнительно была создана модель нейровоспаления *in vitro*).

В данной главе приведены результаты исследований, выполненных с использованием разработанных нами оригинальных моделей НВЕ/ГЭБ *in vitro*.

Известно, что отличительной чертой церебральных эндотелиоцитов является высокое трансэндотелиальное электрическое сопротивление (ТЭС), которое изменяется при повреждении ГЭБ с повышением проницаемости.

Учитывая выявленные в экспериментах *in vivo* изменения проницаемости ГЭБ, экспрессии белков плотных контактов и молекул, осуществляющих межклеточные взаимодействия, следующим этапом мы изучили особенности изменения величины ТЭС, а также экспрессии белков плотных контактов при развитии гипоксически-ишемического повреждения *in vitro*.

В ходе своей работы при исследовании трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС) в трехклеточной модели ГЭБ *in vitro*

установлено, что в культуре клеток, находящихся в условиях химической гипоксии произошло статистически значимое уменьшение величины трансэндотелиального электрического сопротивления на 30% по сравнению с контрольными показателями ($p=0,03$, рисунок 17).

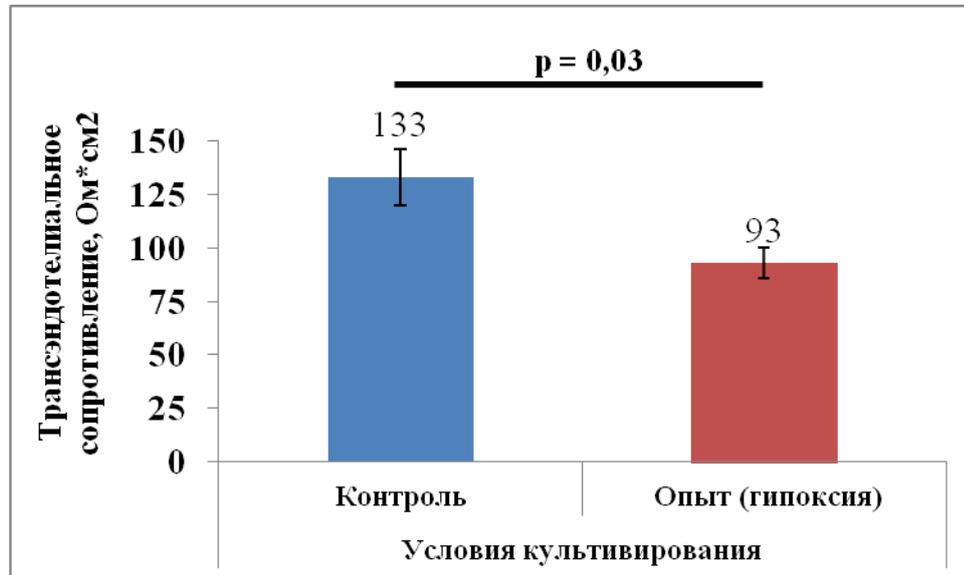


Рисунок 17 – Величина трансэндотелиального электрического сопротивления при экспериментальном гипоксически-ишемическом повреждении клеток НВЕ/ГЭБ *in vitro*; p - уровень статистической значимости, критерий Манна – Уитни

Для проверки предположения о том, что уменьшение величины ТЭС на при развитии гипоксии *in vitro* обусловлено изменением экспрессии белков плотных контактов (JAM, ZO1, CLDN5), мы провели регистрацию эндотелиальных клеток, экспрессирующих целевые белки в пато(физио)логических условиях (таблица 3.18).

Таблица 3.18 – Количество эндотелиоцитов НВЕ/ГЭБ, экспрессирующих белки плотных контактов *in vitro*, (%), $M \pm \sigma$.

Белок плотных контактов	Группа		p
	Контроль	Опыт (гипоксия)	
JAM	94±3,2	63±10,2	0,001
ZO1	96±2,1	34±13,3	0,001
CLDN5	95±2,8	65±8,6	0,001

Примечания: p - статистическая значимость между опытной и контрольной группами, критерий Манна-Уитни.

Установлено, что в опытной группе произошло статистически значимое уменьшение числа клеток, 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. Результаты, которые мы получили, согласуются с уменьшением величины трансэндотелиального электрического сопротивления, что характерно для повышения проницаемости ГЭБ, что в свою очередь, подтверждают результаты оценки содержания Evans blue в экспериментах *in vivo*.

Выявленные особенности позволяют подтвердить наше 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.

3.2.2 Роль Cx43 в регуляции функционирования НВЕ *in vitro* при гипоксическом повреждении

На следующем этапе экспериментальной части работы использовалась оригинальная клеточная модель НВЕ *in vitro*. С учетом данных, полученных нами *in vivo*, мы сфокусировались на оценке вклада транспортеров глутамината и глутамата, коннексина-43, Р-гликопротеина и CD38 в осуществлении межклеточной коммуникации и энергетического сопряжения клеток НВЕ. Для этого иммуногистохимическим методом была проведена регистрация экспрессии целевых молекул в физиологических условиях и при гипоксии. Использовалась методика химической гипоксии клеток (с йодацетатом

натрия), в том числе, в присутствии блокатора активности коннексиновых каналов (карбенексолона).

Были использованы 4 варианта сокультивирования клеток в следующих группах.

Группа I – культивирование клеток в стандартных условиях, 1 контрольная группа.

Группа II – моделирование острой «химической гипоксии *in vitro*». В качестве индуктора использовали йодацетат натрия. Конечная концентрация в среде - 50 мкМ. Время инкубации 30 минут в стандартных условиях.

Группа III – культивирование клеток в присутствии карбенексолона. Конечная концентрация 50 мкМ. Время инкубации 50 минут в стандартных условиях.

Группа IV – моделирование острой гипоксии (йодацетатом натрия) в присутствии блокатора коннексиновых каналов (карбенексолона).

Особенности экспрессии изучаемых белков, которые участвуют в обеспечении межклеточной коммуникации и метаболического сопряжения клеток НВЕ, представлены в таблице 3.19.

В условиях острой гипоксии наблюдается статистически значимое уменьшение в 15 раз числа экспрессирующих молекулу CD38, что сопряжено с одновременным увеличением экспрессии Р-гликопротеина и глутаминового транспортера SLC1A5 в 5 раз. На фоне уменьшения количества CD38-иммунопозитивных нейронов, зафиксировано достоверное увеличение астроглиальных клеток, экспрессирующих CD38 (в 15 раз), транспортера глутамин (5 раз), а также Pgp и Sx43. При этом экспрессия транспортера глутамата EAAT2 достоверно снизилась в 1,5 раза. На эндотелиальных клетках, единственной из изученных молекул, которая отреагировала на гипоксическое воздействие, является Р-гликопротеин. Зафиксировано полуторакратное увеличение количества Pgp-иммунопозитивных эндотелиоцитов.

Таблица 3.19 – Транспортные молекулы и регуляторы метаболического сопряжения клеток НВЕ *in vitro*, (% , $M \pm \sigma$).

Маркер	Нейроны		Астроциты		Эндотелиоциты	
	Гипоксия	Контроль	Гипоксия	Контроль	Гипоксия	Контроль
CD38	0,4±0,2*	6,0±0,7	30,0±4,0*	2,0±0,1	20,0±1,5	24,0±1,2
Cx43	3,2±0,4	4,1±0,9	59,0±12,0*	21,0±6,0	15,0±9,0	23,0±8,0
Pgp	9,0±1,0*	0	72,0±12,0*	20,0±4,0	78,0±12*	50,0±14,0
SLC1A5	5,0±1,2*	1,0±0,5	5±0,6*	1,0±0,3	0	0
EAAT2	0	0	6,0±1,8*	9,6±1,0	0	0

Примечания: * - уровень значимости между группами $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни.

При культивировании клеток в присутствии блокатора Cx43 зарегистрированы изменения экспрессии молекул, которые представлены в таблице 3.20.

Таблица 3.20 – Транспортные молекулы и регуляторы метаболического сопряжения клеток НВЕ *in vitro* при подавлении функции коннексина-43, (% , $M \pm \sigma$).

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*	3,5±0,7	2,0±0,1	1,5±0,1	20,0±1,0	18,0±7,0
Cx43	0,8±0,1*	1,5±0,2	1,2±0,3*	3,8±0,5	2,0±0,5*	10,0±8,0
Pgp	11,0±4,0*	0	60,0±19,0*	22,0±8,0	96,0±4,0*	58,0±16,0
SLC1A5	0,04±0,02	0,02±0,01	0	0	0	0
EAAT2	0	0	3,2±1,2	2,4±0,1	0	0

Примечания: * - уровень значимости между группами $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни.

При сокультивировании клеток в стандартных условиях, в модели нейроваскулярной единицы *in vitro*, зафиксировано одновременное снижение нейронов, экспрессирующих Cx43, CD38 и SLC1A5; астроцитов, несущих на своей поверхности CD38, EAAT2 и SLC1A5; CD38-иммунопозитивных клеток.

Наблюдаемое уменьшение CD38 можно объяснить снижением доступности энергетических субстратов (НАД⁺, АТФ), которые транспортируются посредством коннексинов. Принимая во внимание полученные в ходе исследования результаты, в совокупности с литературными данными можно предположить, что должно происходить снижение накопления кальция внутри клеток, уменьшение потери НАД⁺, угнетение активности NMDA-каналов и секреции глутамата нейронами во внеклеточное пространство. Следствием уменьшения концентрации глутамата во внеклеточном пространстве является снижение транспортеров глутамата (EAAT2) на клетках астроглии. Недостаточность транспортеров глутамата приводит к уменьшению поступления субстрата для глутаминсинтетазы. Активность этого фермента в клетках астроглии снижается, что приводит к уменьшению глутамина из глутамата, который в физиологических условиях должен транспортироваться в нейроны [275, 343]. Снижение секреции клетками астроглии глутамина вызывает уменьшение экспрессии его транспортеров (SLC1A5) на нейронах и астроцитах.

Таким образом, влияние блокатора коннексина-43 на клетки нейроваскулярной единицы в условиях нормоксии проявляется в уменьшении экспрессии Cx43 и CD38 на всех клетках НВЕ, нейронального транспортера глутамина, астроцитарного транспортера глутамата, но увеличении экспрессии Р- гликопротеина на эндотелиальных клетках.

В условиях гипоксии влияние блокатора Cx43 проявляется в угнетении экспрессии Cx43 и CD38.

Подводя итог полученным результатам, можно обозначить следующие ключевые события, характерные для клеток нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы входящих в составе НВЕ *in vitro*:

- астроциты НВЕ характеризуются высоким уровнем экспрессии Cx43 и транспортеров глутамата EAAT2 на фоне пониженной экспрессии CD38 и SLC1A5;

- гипоксия индуцирует в астроцитах НВЕ значительное усиление

экспрессии Cx43, CD38, SLC1A5, и угнетение экспрессии EAAT2;

- нейроны, демонстрируют высокий уровень экспрессии молекулы CD38 и низкий Cx43 и SLC1A5;

- гипоксия индуцирует значительное уменьшение экспрессии нейрональной CD38 с одновременным увеличением экспрессии SLC1A5;

- для эндотелиальных клеток характерен стабильный уровень экспрессии Cx43, в условия нормоксии и гипоксии *in vitro*;

- угнетение коннексиновой активности карбеноксолоном приводит к уменьшению экспрессии нейрональных CD38, Cx43, SLC1A5 и астроцитарных CD38, Cx43 и EAAT2.

3.2.3 Особенности экспрессии монокарбоксилатных транспортеров 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 MCT1 и MCT4 в физиологических условиях и при гипоксии. При этом нейроны не экспрессируют целевые молекулы (таблица 3.21).

В условиях острой гипоксии наблюдается увеличение числа эндотелиоцитов, экспрессирующих монокарбоксилатные транспортеры: MCT1 в 1,5 раза, MCT4 – 2 раза, по сравнению с клетками контрольной группы ($p=0,001$).

Таблица 3.21 – Монокарбоксилатные транспортеры клеток НВЕ *in vitro*, (%), $M \pm \sigma$.

Маркер	Астроциты			Эндотелиоциты		
	Контроль	Опыт	p	Контроль	Опыт	p
MCT1	13,4±1,3	26,6±1,6	0,01	40±2,5	64±3,2	0,001
MCT4	19,1±6	30,5±5,6	0,03	42,5±4,5	84,9±4,1	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 ($p=0,03$).

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.

3.2.4 Изменение концентрации лактата и глутамата в НВЕ *in vitro*

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

внечелочного 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 ($p < 0,05$).

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 внечелочном пространстве согласуется с уменьшением количества клеток, несущих на своей поверхности транспортеры глутамата (EAAT2), учитывая функциональную активность этой молекулы, которая осуществляет захват внечелочного 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 [285]. После выхода лактата в межклеточное пространство MCT1 эндотелиоцитов 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 внечелочное 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 [329]. В последующем основными

гликолитически активными клетками становится астроциты. А роль энергетического субстрата переходит от лактата к глюкозе.

Указанный механизм нарушается при гипоксическом перинатальном поражении головного мозга. Изменяется экспрессия монокарбоксилатных транспортеров, а возможно и их функциональная активность, а также снижается концентрация лактата, что в совокупности может оказывать влияние на пролиферативную активность и регенераторный потенциал клеток.

3.2.5 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 (рисунок 18).

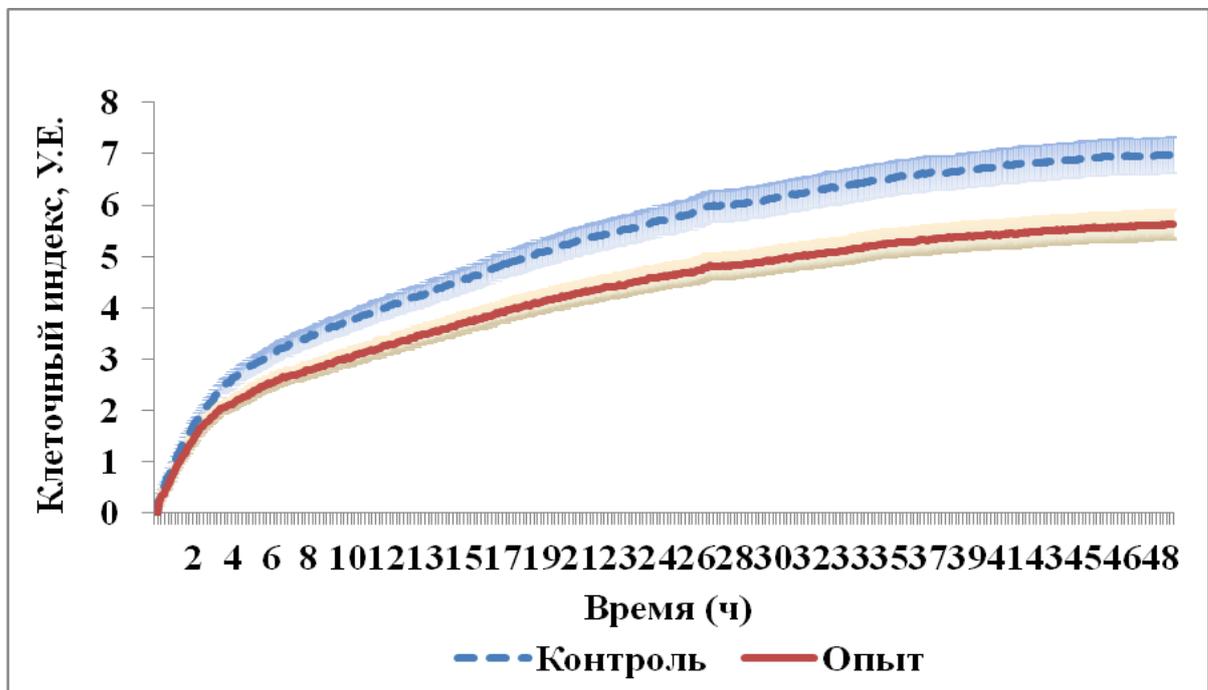


Рисунок 18 – Величина пролиферативной активности (клеточного индекса) в контрольной и опытной группах клеток в течение 48 часов. Данные представлены в виде $M \pm \sigma$

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 ($p < 0,05$).

При нормализации клеточного индекса (значение индекса исследуемых клеток разделить на значение индекса нормальных клеток), мы определили, что коэффициент пролиферации клеток, находящихся в условиях гипоксии составил $0,81 \pm 0,02$ У.Е., что на 19% меньше, чем у клеток контрольной группы - 1 ± 0 У.Е. ($p < 0,001$).

При этом, один из ключевых показателей роста, как время удвоения (время за которое происходит увеличение числа клеток в два раза) под влиянием гипоксии не изменился, по сравнению с контрольной группой ($8,1 \pm 1,6$ ч и $8 \pm 1,3$ ч соответственно). В указанные точки времени зарегистрировано значение клеточного индекса в опытной группе - $2,8 \pm 0,1$ У.Е., что ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной - $3,5 \pm 0,1$ У.Е.

Таким образом, в ходе исследования мы обнаружили, что гипоксическое воздействие на клетки НВЕ/ГЭБ приводит к снижению их пролиферативной активности. Уменьшение пролиферативной активности клеток на фоне снижения концентрации лактата, можно объяснить запуском компенсаторных механизмов - «переключению» механизмов ангиогенеза, определяемого пролиферативным потенциалом клеток эндотелия, на механизмы барьерогенеза, что, в целом, направлено на поддержание структурно-функциональной целостности ГЭБ.

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 МСТ1, МСТ4) в клетках модели НВЕ/ГЭБ *in vitro* (рисунок 19) 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 ингибитором МСТ1 и МСТ4 привела к увеличению пролиферативной активности клеток неэпителиальной природы.

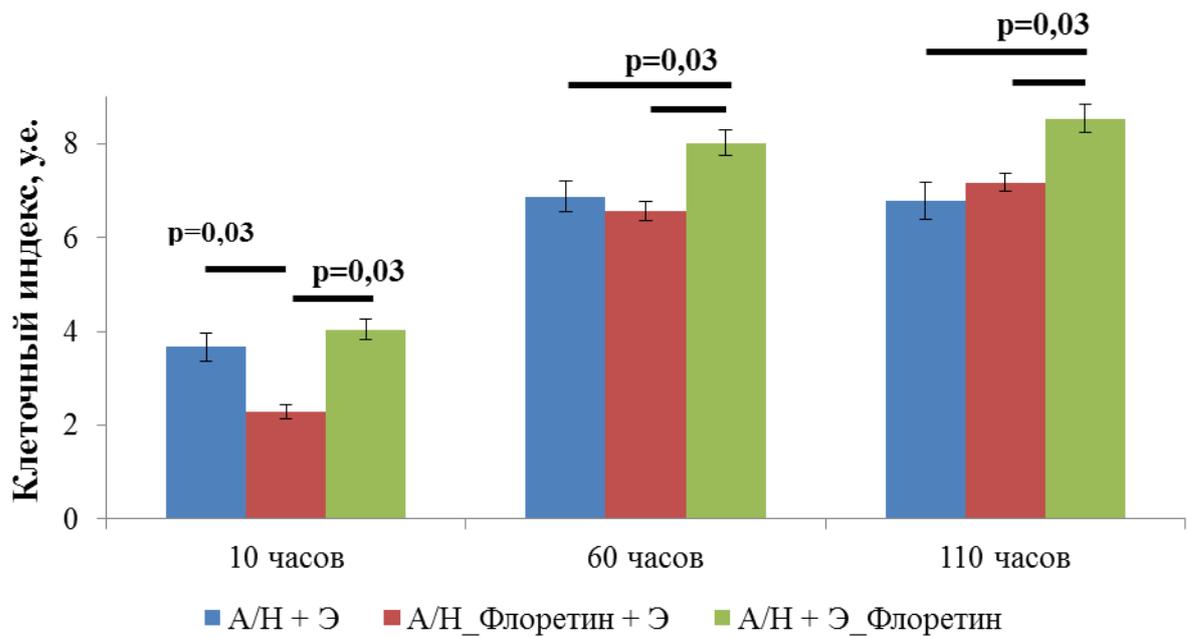
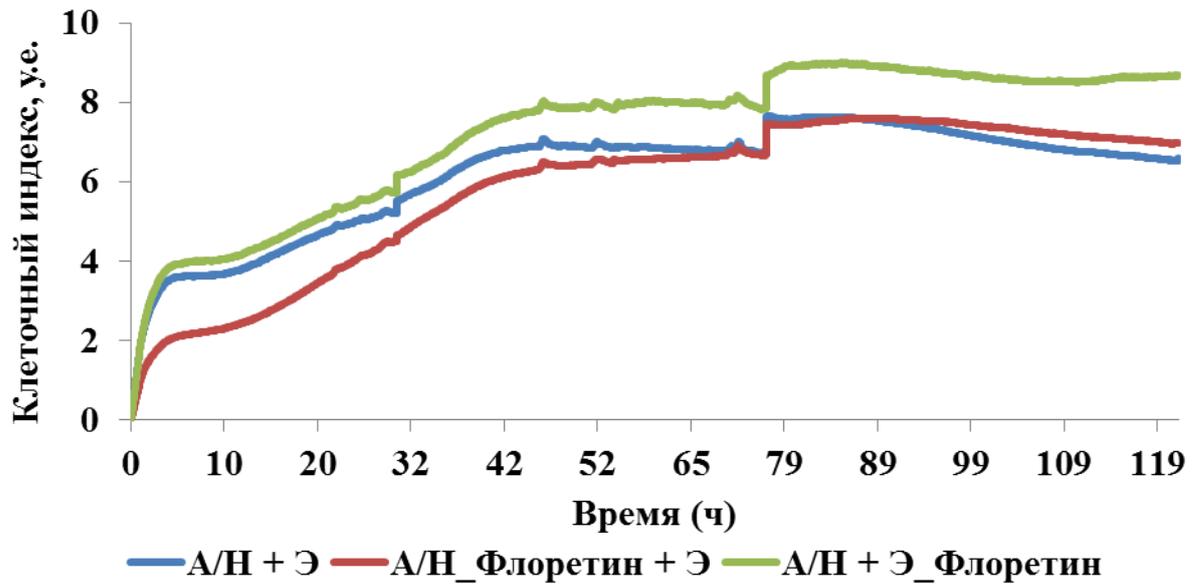


Рисунок 19 – Значения клеточного индекса (у.е.), определенные на клеточном анализаторе «xCelligence» (Roshe), для культуры астроцитов и нейронов в присутствии на вставках эндотелиоцитов в контрольной (A/N + Э) и экспериментальных (A/N_Флоретин + Э – прединкубированные астроциты и нейроны в присутствии флоретина (100мкМ, 24 часа); A/N + Э_Флоретин – прединкубированные эндотелиоциты в присутствии флоретина (100мкМ, 24 часа)) группах *in vitro*

В целом, ингибирование активности монокарбоксилатных транспортеров (MCT1 и MCT4), 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 (MCT1 и MCT4) можно обозначить как актуальные молекулы-мишени для разработки новых протоколов фармакотерапии заболеваний головного мозга, ассоциированных с дисфункцией НВЕ (ишемия, нейродегенерация, нейровоспаление).

ГЛАВА IV.

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕЙ С ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ

Для уточнения того, насколько установленные в эксперименте механизмы повреждения ГЭБ могут быть экстраполированы на реальные клинические условия, мы осуществили клиническую часть исследования.

Пациентов, соответствовавших критериям включения в исследование, распределили в три группы, в соответствии со степенью тяжести церебральной ишемии:

1. новорожденные дети с церебральной ишемией I степени (n=40) - 1 группа;
2. новорожденные дети с церебральной ишемией II степени (n=40) - 2 группа;
3. новорожденные дети с церебральной ишемией III степени (n=40) - 3 группа.

4.1. Особенности течения антенатального периода

Перинатальный период составляет менее 0,5% от средней продолжительности жизни человека. При этом у каждого пятого родившегося новорожденного, по литературным данным, регистрируется неблагоприятное течение антенатального периода, когда в 30% случаев формируется патология ЦНС или появляется фон для развития патологии.

Согласно полученным нами данным, в период настоящей беременности наиболее частой патологией у матерей был анемический синдром, зарегистрированный во всех исследуемых группах (без достоверных различий по степени тяжести). Однако статистически значимо чаще анемия диагностирована у женщин, дети которых имели церебральную

ишемию III степени (3 группа). Частота встречаемости анемии была в два раза выше, чем в группах 1 и 2.

Также у матерей пациентов с церебральной ишемией 3 степени, чаще диагностировали ХФПН. По сравнению с первой группой ХФПН встречалась в 4,5 раза чаще, а по сравнению со второй - в 2,5 раза чаще ($p < 0,05$). Также у этих женщин в первой половине беременности встречалась чаще угроза прерывания по сравнению с женщинами других групп ($p < 0,05$).

Диагностика данного патологического состояния проводилась акушерами-гинекологами в соответствии с принятыми алгоритмами ведения беременных женщин.

Данные об особенностях течения беременности представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Особенности антенатального периода новорожденных с церебральной ишемией разной степени тяжести.

Признак	1 группа (n=40)		2 группа (n=40)		3 группа (n=40)	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Гестоз I половины беременности	8	20	6	15	8	20
Гестоз II половины беременности	8	20	15	37,5	10	25
Анемия	12	30	14	35	29*	72,5
Угроза выкидыша в I половину	8	20	7	17,5	16**	40
Угроза выкидыша во II половину	8	20	7	17,5	8	20
Хроническая фетоплацентарная недостаточность	4	10	7	17,5	18*	45

Примечания: * - отличия между 3 группой по сравнению с 1 и 2 ($p < 0,05$); ** - статистически значимая разница между 2 и 3 группами ($p < 0,05$), критерий χ^2 .

4.2. Особенности интранатального периода новорожденных с церебральной ишемией

Вероятность формирования церебральной ишемии в перинатальном периоде существенно возрастает при патологическом течении родов. Обвитие вокруг шеи пуповины, развитие слабости родовой деятельности, в целом, увеличивают риск развития церебральной ишемии.

Анализ данных (таблица 4.2) об особенностях течения интранатального периода не выявил значимых различий между группами пациентов с изучаемой патологией в частоте выполнения таких операций, как эпизиотомия, плановое кесарево сечение.

Таблица 4.2 – Особенности интранатального периода новорожденных с церебральной ишемией разной степени тяжести.

Признак	1 группа (n=40)		2 группа (n=40)		3 группа (n=40)	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Кесарево сечение плановое	8	20	4	10	3	7,5
Кесарево сечение экстренное	4	10	6	15	16*	40
Слабость родовой деятельности	8	20	13	32,5	10	25
Эпизиотомия	2	5	3	7,5	3	7,5
Стремительные и быстрые роды	0	0	6	15	6	15
Преждевременная отслойка плаценты	0	0	2	5	13*	32,5
Дородовое излитие околоплодных вод	0**	0	20	50	20	50
Обвитие пуповины вокруг шеи	4	10	10	25	10	25
Маловодие	2	5	4	10	2	5
Многоводие	0	0	2	5	3	7,5
Мекониальные околоплодные воды	8	20	14	35	8	20

Примечания: * - отличия между 3 группой по сравнению с 1 и 2 ($p < 0,05$).

** - статистически значимая разница между 1 группой по сравнению со 2 и 3 группами ($p < 0,005$), критерий χ^2 .

Также не было найдено различий в особенностях протекания родовой деятельности, частоте патологии, сопровождавшейся маловодием/многоводием или мекониальным прокрашиванием, обвитием пуповины вокруг шеи.

Проанализировав особенности течения интранатального периода, мы установили более частое развитие патологии родов в группах детей с более глубокой церебральной ишемией. Необходимость проведения экстренного оперативного родоразрешения, наличие преждевременной отслойки плаценты значимо чаще наблюдались у матерей пациентов с церебральной ишемией III степени ($p = 0,04$). Во 2 и 3 группах в половине случаев зафиксировано дородовое излитие околоплодных вод, что отсутствовало в 1 группе ($p < 0,005$).

Такие состояния, как слабость родовой деятельности окрашивание околоплодных вод меконием, которые считаются признаками гипоксии плода [366], встречались одинаково часто во всех группах.

Полученные данные позволили подтвердить информацию о том, что тяжелая церебральная ишемия чаще развивается в случаях развития патологии интранатального периода. Также мы выявили и представили наиболее значимые проявления патологии интранатального периода у пациентов, включенных в исследование.

4.3. Клинические особенности новорожденных детей с церебральной ишемией при рождении

Для объективного представления о состоянии новорожденных в первые минуты жизни широко используется шкала Апгар, которая позволяет достаточно просто и своевременно оценить жизненно важные функции

ребенка и решить вопрос о необходимости проведения реанимационных мероприятий и выбрать тактику их проведения. И, несмотря на то, что в настоящее время предлагаются различные модификации этой шкалы, она остается проверенным временем, необходимым и полезным инструментом быстрой характеристики статуса новорожденного [193, 356, 367].

По нашим данным, у детей из групп 2 и 3 сумма баллов по шкале Апгар была ниже, чем в первой группе ($4,8 \pm 0,75$; $4,1 \pm 2,1$ и $7,6 \pm 0,2$ баллов, соответственно) ($p < 0,05$) в конце первой минуты.

В конце 5 минуты выявлены однотипные особенности характерные для первой минуты. Так сумма баллов по шкале Апгар у пациентов в группах 2 и 3 осталась ниже, по сравнению с детьми из 1 группы ($p < 0,05$) и составила ($6,18 \pm 0,75$; $6,5 \pm 1,5$; и $8,6 \pm 0,5$ соответственно). Данные представлены в таблице 4.3.

При этом значительных различий в сумме баллов между 2 и 3 группами не определено, как по окончании первой, так и пятой минут.

Всем пациентам 2 и 3 групп, т.е. с суммой менее 7 баллов на 1 минуте, выполняли реанимационные мероприятия (таблица 4.4). Детям из 1 группы реанимационные мероприятия не проводились, так как у всех детей оценка по шкале Апгар была более 7 баллов.

Таблица 4.3 – Оценка по шкале Апгар новорожденных с церебральной ишемией разной степени тяжести, (баллы).

Показатель	1 группа (n=40)	2 группа (n=40)	3 группа (n=40)
Оценка по шкале Апгар на первой минуте жизни	$7,6 \pm 0,2^*$	$4,8 \pm 0,75$	$4,1 \pm 2,1$
Оценка по шкале Апгар на пятой минуте жизни	$8,6 \pm 0,5^*$	$6,18 \pm 0,75$	$6,5 \pm 1,5$

Примечания: * - достоверность различий 1 группы, по сравнению со 2 и 3 группами ($p < 0,05$), критерий Манна-Уитни.

По сравнению с группой 1 необходимость проведения искусственной вентиляции легких одинаково часто требовалась детям из групп 2 и 3 по

сравнению с детьми группы 1, без отличий между собой ($p < 0,001$). При этом длительность проведения искусственной вентиляции легких у детей с церебральной ишемией 2 и 3 степени была сопоставима и составила $7 \pm 2,5$ и $7,5 \pm 3,2$ дней.

Таблица 4.4 – Потребность в реанимационных мероприятиях в группах новорожденных с церебральной ишемией разной степени тяжести.

Признак	1 группа (n=40)		2 группа (n=40)		3 группа (n=40)	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Подача кислорода через маску	8	20	9	22,5	0	0
Искусственная вентиляция легких	0*	0	30	75	40	100

Примечания: * - достоверность различий 1 группы, по сравнению со 2 и 3 группами ($p < 0,001$), критерий χ^2 .

4.4. Особенности неонатального периода пациентов с церебральной ишемией

Неонатальный период в целом, а особенно ранний, является самым ответственным отрезком жизни для адаптации новорожденного, т.к. в этот период происходит приспособление жизненно важных систем к внеутробному существованию. В этом периоде выделяют наиболее значимые этапы максимальной нагрузки на реакции адаптации. В первые 30 минут после рождения наблюдается острая респираторно-гемодинамическая адаптация. В интервале времени от 1 часа до 6 часов происходит функциональная синхронизация основных систем ребенка. На 3-4 сутки жизни приходится максимальная метаболическая адаптация, что объясняется переходом на лактотрофное питание, а также переключением с катаболического на анаболический тип обмена веществ.

В поздний неонатальный период продолжается адаптация новорожденных к внешней среде. В этот период времени самыми главными критериями физического благополучия новорожденного являются

динамическое увеличение массы тела и роста ребенка. О нормальном нервно-психическом развитии свидетельствуют состояние сна, хороший мышечный тонус, наличие активной двигательной активности, а также нормальное функционирование органов и систем ребенка. Значительный вклад в течение и исход неонатального периода вносят пограничные состояния и сопутствующая патология. При анализе патологии раннего неонатального периода (таблица 4.5) установлено, что сопутствующая патология неонатального периода статистически значимо преобладала ($p < 0,05$) у детей 3 группы по сравнению с группой 1 и 2. Однако рассматривая отдельные состояния, не было установлено статистически значимых отличий между детьми с церебральной ишемией различной степени тяжести.

Таблица 4.5 – Сопутствующая патология в группах новорожденных с церебральной ишемией разной степени тяжести.

Патология	1 группа (n=40)		2 группа (n=40)		3 группа (n=40)	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
ОРДС	0	0	3	7,5	6	15
Аспирационный синдром	0	0	3	7,5	6	15
Конъюгационная желтуха	4	10	2	5	6	15
Травма позвоночника	4	10	6	15	10	25
Всего:	8	20	15	37,5	30*	75

Примечания: * - отличия между 1 группой по сравнению со 2 и 3 группой ($p < 0,05$), критерий χ^2 .

4.5 Особенности неврологической симптоматики пациентов с церебральной ишемией

Результатом перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС у ребенка является развитие определенной неврологической дисфункции, которая не отличается разнообразием симптомов и синдромов в связи с тем, что, практически, любое патологическое воздействие на ЦНС вызывает схожие структурно-морфологические, метаболические и

функциональные изменения: генерализованный отек мозга, нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера, апоптоз и некроз клеток. При этом в клинической картине преобладают известные симптомокомплексы: наиболее частыми являются синдром возбуждения или синдром угнетения. При этом возможно нарушение сознания разной степени выраженности, а также судорожный синдром.

Нами проанализированы особенности неврологической симптоматики у детей с церебральной ишемией (таблица 4.6). Оценка выраженности нарушения сознания и проявления судорожного синдрома оценивались по Sarnat Grading Scale.

Анализ выявил следующие особенности. У детей с церебральной ишемией 2 и 3 степени статистически значимо чаще по сравнению с группой 1 присутствовали арефлексия, гипорефлексия, нарушения сознания и судорожный синдром. При этом значимых отличий между 2 и 3 группами не установлено. Патологическое повышение тонуса мышц в раннем неонатальном периоде, наравне с перечисленной выше симптоматикой, чаще обнаруживалось у пациентов с церебральной ишемией II и III степени, но максимально часто у детей второй группы ($p < 0,05$).

При сравнении с ранним неонатальным периодом, в поздний неонатальный у детей с церебральной ишемией отмечается общее улучшение состояния. Так у детей с церебральной ишемией 2 степени наблюдается статистически значимое ($p < 0,05$) снижение случаев судорожного синдрома с 20 (50%) до 7 (17,5%) случаев, арефлексии с 22 (55%) до 3 (7,5%) случаев. Статистически значимо снизились ($p < 0,01$) гипорефлексия с 24 (60%) до 9 (22,5%) случаев и гипотонус.

Таблица 4.6 – Особенности неврологического статуса у детей с церебральной ишемией разной степени тяжести в ранний неонатальный период.

	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 позднем неонатальном периоде (таблица 4.7) зафиксировано улучшение отдельных неврологических симптомов.

Таблица 4.7 – Особенности неврологического статуса у детей с церебральной ишемией разной степени тяжести в поздний неонатальный период.

	Поздний неонатальный период					
	1 группа (n=40)		2 группа (n=40)		3 группа (n=40)	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Нарушение сознания	0	0	8	20	10	25
Судорожный синдром	0	0	7	17,5	8	20
Арефлексия	0	0	3	7,5	8	20
Гипорефлексия	0	0	9	22,5	12	30
Врожденный гипотонус	0	0	5	12,5	10	25
Врожденный гипертонус	0*	0	35	87,5	36	90

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

У детей с церебральной ишемией 32 степени наблюдается уменьшение количества детей с арефлексией в 2,8 раза, с 23 (57,5%) до 8 (20%), а также в 3 раза с гипотонусом – с 30 (75%) до 10 (25%). Однако у детей с тяжелой церебральной ишемией отмечалось увеличение числа детей с преобладанием мышечного гипертонуса.

Полученные в ходе исследования клинические результаты соответствуют критериям церебральной ишемии II и III степени и,

практически, не выявляют клинических особенностей течения этого патологического состояния.

4.6 Нейросонографическая характеристика

Известно, что ишемическое поражение головного мозга в период новорожденности на ранних этапах после перенесенной гипоксии-ишемии характеризуется сужением основных ликворопроводящих путей вследствие отека окружающих тканей (перивентрикулярной и субкортикальной областей).

Расширение ликворопроводящих путей регистрируется при развитии атрофических изменений, которые развиваются в следствие гипоксически-ишемического воздействия либо при усилении ликворопродукции.

В настоящем исследовании проведен анализ данных нейросонографического исследования у детей с церебральной ишемией. Оценивались параметры ликворопроводящих путей и состояние паренхимы головного мозга в неонатальный период - ранний и поздний (таблицы 4.8. - 4.11).

Для раннего неонатального периода характерны статистически значимые изменения размеров ликворопроводящих путей у пациентов с церебральной ишемией II и III степенью тяжести по сравнению с 1 группой детей (таблица 4.9).

Так как боковые желудочки головного мозга являются наиболее стабильными по своей форме и глубине, то, практически сразу, при нарушениях ликворооттока наблюдаются изменения формы и размеров этих структур.

Таблица 4.8 – Нейросонографические признаки изменений ликворопроводящих путей у детей с церебральной ишемией в ранний неонатальный период, (%).

Показатель		1 группа (n=40)		2 группа (n=40)		3 группа (n=40)	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Передние рога боковых желудочков	Норма	28	70	16	40	14	35
	Сужение	8	20	2	5	2	5
	Расширение	4	10*	22	55	25	62,5
Задние рога боковых желудочков	Норма	24	60	26	65	6	15
	Сужение	4	10	0	0	3	7,5
	Расширение	12	30	14	35	30	75*
Тело бокового желудочка	Норма	20	50	8	20	2	5
	Сужение	12	30	20	50	10	25
	Расширение	8	20	12	30	28	70*
III желудочек (ширина)	Норма	40	100	30	75	15	37,5
	Сужение	0	0	8	20	20	50
	Расширение	0	0	2	5	5	12,5
IV желудочек (глубина)	Норма	32	80	14	35	13	32,5
	Сужение	4	10	4	10	4	10
	Расширение	4	10*	22	55	23	57,5
Большая затылочная цистерна мозга	Норма	36	90	34	85	30	75
	Сужение	0	0	2	5	5	12,5
	Расширение	4	10	3	7,5	5	12,5
Субарахноидальное пространство	Норма	32	80	11	27,5	7	17,5
	Сужение	8	20	14	35	30	75*
	Расширение	0	0	16	40	3	7,5
Межполушарная щель	Норма	36	90	22	55	15	37,5
	Сужение	0	0	9	22,5	13	32,5
	Расширение	4	10	9	22,5	12	30

Примечания * - статистически значимые различия указанной группы с другими группами ($p < 0,05$), точный критерий χ^2 .

Таблица 4.9 – Значения основных нейросонографических признаков (ликворопроводящие пути) у детей с церебральной ишемией в ранний неонатальный период, (мм, $M \pm \sigma$).

Показатель	1 группа (n=40)	2 группа (n=40)	3 группа (n=40)
	мм ($M \pm \sigma$)	мм ($M \pm \sigma$)	мм ($M \pm \sigma$)
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 ($p < 0,05$), Манна-Уитни.

При анализе показателей желудочковой системы в ранний неонатальный период выявлено, что самые часто встречающиеся изменения размеров ликворопроводящих путей у детей с церебральной ишемией III степени являются: расширение рогов (передних и задних) и тел боковых желудочков, четвертого желудочка, а также уменьшение размеров третьего желудочка. У пациентов 3 группы чаще обнаруживалось уменьшение размеров субарахноидального пространства, по сравнению с пациентами из 1 и 2 групп ($p < 0,05$). У пациентов всех исследуемых групп размеры большой затылочной цистерны оставались в пределах нормы и были сопоставимы между собой. Такие же особенности обнаружены в отношении размеров межполушарной щели, которые не отличались от нормальных показателей, что не противоречит данным литературы [27].

Проанализировав особенности нейросонографических данных в поздний неонатальный период (таблица 4.10 и 4.11) удалось установить, что

размеры передних рогов боковых желудочков у пациентов 1 и 2 групп вернулись к нормальным показателям (превышали 2 мм).

Таблица 4.10 – Нейросонографические признаки изменений ликворопроводящих путей у детей с церебральной ишемией в поздний неонатальный период, (%).

Показатель		1 группа (n=40)		2 группа (n=40)		3 группа (n=40)	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Передние рога боковых желудочков	Норма	32*	80	16	40	15	37,5
	Сужение	4	10	8	20	8	20
	Расширение	4*	10	16	40	18	45
Задние рога боковых желудочков	Норма	32	80	23	57,5	7	17,5
	Сужение	0	0	8	20	17	42,5
	Расширение	8	20	9	22,5	17	42,5
Тело бокового желудочка	Норма	36	90	18	45	3	7,5*
	Сужение	0	0	4	10	13	32,5
	Расширение	4	10*	18	45	23	57,5
III желудочек (ширина)	Норма	36	90	33	82,5	15	37,5
	Сужение	0	0	2	5	15	37,5
	Расширение	4	10	4	10	10	25
IV желудочек (глубина)	Норма	36	90	21	52,5	13	32,5
	Сужение	4	10	2	5	12	30
	Расширение	0	0	17	42,5*	15	37,5
Большая затылочная цистерна мозга	Норма	40	100	28	70	20	50
	Сужение	0	0	0	0	3	7,5
	Расширение	0	0	12	30	16	40
Субарахноидальное пространство	Норма	40	100	18	45	10	25
	Сужение	0	0	4	10	15	37,5
	Расширение	0*	0	18	45	15	37,5
Межполушарная щель	Норма	40	100	22	55	20	50
	Сужение	0	0	7	17,5	7	17,5
	Расширение	0	0	12	27,5	13	32,5

Примечания: * - статистически значимые различия указанной группы с другими группами ($p < 0,05$), критерий χ^2 .

В поздний неонатальный период, несмотря на преобладание во 2 группе количества детей с расширением ликворопроводящих путей, в 3

группе средние размеры IV желудочка, большой затылочной цистерны и субарахноидального пространства были статистически значимо больше ($p < 0,05$), чем в группах 1 и 2.

Таблица 4.11 – Значения основных нейросонографических признаков (ликворопроводящие пути) у детей с церебральной ишемией в поздний неонатальный период, (мм, $M \pm \sigma$).

Показатель	1 группа (n=40)	2 группа (n=40)	3 группа (n=40)
	мм ($M \pm \sigma$)	мм ($M \pm \sigma$)	мм ($M \pm \sigma$)
Передние рога боковых желудочков	1,5±0,2	2,7±0,9 *	2,2±0,2
Задние рога боковых желудочков	13,2±2*	22,3±3	24,9±1,0
Тело бокового желудочка	1,2±0,2*	3,3±0,7	3,4±0,5
III желудочек (ширина)	1,4±0,5	2,8±1,1	1,9±0,7
IV желудочек (глубина?)	1,5±0,4*	2,2±0,4	2,5±0,5
Большая затылочная цистерна мозга	4±0,3	4,8±0,8	5,5±0,7
Субарахноидальное пространство	1,8±0,4	1,8±0,3	2,4±0,2*
Межполушарная щель	2,0±0,4	2±0,5	1,9±0,4

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

Анализируя данные нейросонографического исследования о состоянии паренхимы головного мозга в ранний и поздний неонатальные периоды, мы выявили общие изменения, которые характерны для церебральной ишемии: отек коры, а также подкорковых структур головного мозга (таблица 4.12).

В ранний неонатальный период у пациентов с церебральной ишемией II и III степени одинаково часто наблюдался умеренный отек коры головного мозга и перивентрикулярного пространства. Однако наиболее часто встречался выраженный отек подкорковых структур ($p < 0,05$). В целом, для позднего неонатального периода характерна положительная динамика нейросонографических изменений, которая заключается в уменьшении выраженности отека ткани головного мозга у пациентов всех групп. Но при

этом сохранялись статистически значимые изменения у пациентов 3 группы, где отмечается только уменьшение доли детей с выраженным отеком подкорковых структур головного мозга.

Таблица 4.12 – Выявляемость различных нейросонографических признаков у детей с церебральной ишемией в ранний и поздний неонатальный период.

Гиперэхогенность		Неонатальный период	1 группа (n=40)		2 группа (n=40)		3 группа (n=40)	
			Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Коры	Легкая	ранний	20	50*	4	10	4	10
		поздний	8	20	11	27,5	10	25
	Умеренная	ранний	8	20	30	75	30	75
		поздний	4	10	23	57,5	16	40
	Выраженная	ранний	0	0	6	15	8	20
		поздний	0	0	6	15	13	32,5
Подкорковых структур	Легкая	ранний	12	30	4	10	2	5
		поздний	12	30	7	17,5	16	40
	Умеренная	ранний	8	20	26	65	23	57,5
		поздний	0	0	22	55	20	50
	Выраженная	ранний	0	0	10	25	15	37,5
		поздний	0	0	11	27,5	3	7,5
Отек ПВО	Слабый	ранний	12	30	8	20	8	20
		поздний	0	0	12	30	15	37,5
	Умеренный	ранний	0	0	23	57,5	18	45
		поздний	0	0	20	50	17	42,5
	Выраженный	ранний	0	0	8	20	13	32,5
		поздний	0	0	8	20	8	20

Примечания: * - статистически значимые различия указанной группы с другими группами ($p < 0,05$), критерий χ^2 .

Результаты, полученные при анализе данных нейросонографического исследования, позволили обозначить те структуры головного мозга, которые максимально вовлечены в патологический процесс при церебральной ишемии. Однако, несмотря на нейросонографические находки, клинические проявления неврологических нарушений не сильно зависят от характера

обнаруженных повреждений, что является подтверждением ограниченной эффективности указанного исследования.

В целом можно сказать, что обнаруженные изменения являются последствием повреждения клеток нейроваскулярной единицы, которые контролируют ликворообразование и транспорт спинномозговой жидкости.

Для подтверждения этого предположения нами была проведена оценка содержания белков-маркеров нейронов, астроцитов и эндотелиальных клеток в периферической крови пациентов с церебральной ишемией.

4.7 Содержание белков NSE, GFAP, sPECAM-1, лактата и глутамата в сыворотке крови пациентов с церебральной ишемией

Для определения глубины клеточных повреждений компонентов нейроваскулярной единицы, а также роли особенностей межклеточных-коммуникаций в патогенезе гипоксически-ишемического поражения головного мозга проведен анализ содержания нейроспецифических белков (НСБ), sPECAM-1 и глутамата в крови пациентов с церебральной ишемией различной степени тяжести. В ходе анализа повреждения клеток нейроваскулярной единицы мы обнаружили особенности их реагирования на действие повреждающего фактора (ишемия). Главной особенностью является индивидуальный (для каждого вида клеток) характер высвобождения в кровь молекул-маркеров. Также, дополнительно, мы оценили уровень лактата и глутамата в периферической крови детей, коль скоро, по данным недавних исследований [179], они отражают особенности транспорта лактата и глутамата между клетками НВЕ (таблица 4.14).

Таблица 4.13 – Уровни НСБ, sPECAM-1 у новорожденных с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС в ранний неонатальный период, (нг/мл).

Группа		NSE	GFAP	sPECAM
1 группа (n=40)	M±σ	4,72±2,5	0,22±0,09	0,1±0,09*
	min-max	1,1-8,2	0,012-0,32	0,02 - 0,28
2 группа (n=40)	M±σ	6,52±2,3	0,68±0,28*	4,2±2,2
	min-max	2,3-36	0,01 - 1,36	0,07 - 8,45
3 группа (n=40)	M±σ	9,18±1,1*	0,451±0,22	4,5±2,6
	min-max	5,8-42,9	0,2-1,7	0,047-12,04
Уровень статистической значимости		p _{1,2} =0,1 p _{1,3} = 0,001 p _{2,3} = 0,0001	p _{1,2} = 0,03 p _{1,3} >0,05 p _{2,3} = 0,03	p _{1,2} = 0,001 p _{1,3} = 0,001 p _{2,3} >0,05

Таблица 4.14 – Содержание лактата (ммоль/л) и глутамата (нг/мл) у новорожденных с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС в ранний неонатальный период.

Группа		Лактат (ммоль/л)	Глутамат (нг/мл)
1 группа (n=40)	M±σ	1,8±0,2	2,58±0,8
	min-max	1,1-2,43	1,29-4,1
2 группа (n=40)	M±σ	5,7±1,7	24,6±12,5
	min-max	3,1-7,7	4,9-39,9
3 группа (n=40)	M±σ	9,8±2,2	50,9±12,1
	min-max	7,8-12,8	40,13-89,7
Уровень статистической значимости		p _{1,2} = 0,02 p _{1,3} = 0,01 p _{2,3} < 0,05	p _{1,2} = 0,001 p _{1,3} = 0,001 p _{2,3} = 0,0001

Проанализировав особенности содержания в сыворотке крови пациентов с церебральной ишемией нейроспецифических белков, sPECAM-1 и глутамата, мы установили, что максимальное содержание NSE в сыворотке крови соответствует церебральной ишемии III степени у пациентов с

выраженной неврологической симптоматикой (различные нарушения сознания, наличие судорожного синдрома, нарушения тонуса мышц и рефлексов), при необходимости проведения ИВЛ, а также в случаях расширения размеров ликворопроводящей системы и/или выраженном отеке паренхимы мозга.

Увеличение концентрации GFAP происходит при развитии церебральной ишемии любой степени тяжести. При этом максимальное содержание глиального фибриллярного кислого протеина обнаружено у пациентов при нарушении сознания, наличии судорожного синдрома, а также в ситуациях, требовавших проведения ИВЛ, при уменьшении размеров ликворопроводящей системы и выраженном отеке ткани мозга.

Превышение нормальных значений sPESAM-1 обнаружено у пациентов из 2 и 3 группы в ситуациях, сопровождающихся нарушением сознания, судорогами, гипертонусом, развитием гипорефлексии, а также при расширении размеров ликворопроводящих путей и выраженном отеке паренхимы мозга.

Проанализировав содержание лактата в крови пациентов было выявлено, что при нарастании тяжести повреждения ЦНС наблюдается увеличение концентрации молочной кислоты. Максимальное содержание у пациентов 3 группы, минимальное у пациентов с ишемией первой степени ($p < 0,05$).

Максимально высокая концентрация глутамата обнаружено у детей с церебральной ишемией третьей степени ($p < 0,05$). Также высокий уровень определен у детей с церебральной ишемией второй степени. С учетом клинической симптоматики повышение содержания глутамата наблюдается у пациентов с наличием выраженной неврологической симптоматикой (нарушения сознания, судорожный синдром, гипо- и арефлексия, мышечная дистония), при необходимости проведения ИВЛ, выраженном отеке ткани мозга и изменениях размеров ликворопроводящих путей.

Учитывая, что разброс максимальных и минимальных значений NSE составил от 1,1 нг/мл до 42,9 нг/мл, мы осуществили распределение детей по перцентильным интервальным значениям (таблица 4.15).

Таблица 4.15 – Распределение детей по уровню NSE и GFAP в ранний неонатальный период.

Группы		п	NSE	GFAP
		%		
< 25 перцентильный коридор	1 группа (n=40)	Абс.	20	0
		%	50	0
	2 группа (n=40)	Абс.	13	0
		%	32,5	0
	3 группа (n=40)	Абс.	7	0
		%	17,5	0
25-75 перцентильный коридор	1 группа (n=40)	Абс.	8	12
		%	20	30
	2 группа (n=40)	Абс.	6	19
		%	15	47,5
	3 группа (n=40)	Абс.	10	10
		%	25	25
> 75 перцентильный коридор	1 группа (n=40)	Абс.	12	28
		%	30	70
	2 группа (n=40)	Абс.	21	21
		%	52,5	52,5
	3 группа (n=40)	Абс.	23	30
		%	57,5	75

Так, установлено, что 25-75 перцентильному коридору у здоровых детей соответствуют значения NSE в интервале от 3,2 – 4,4 нг/мл, а GFAP в периферической крови здоровых детей не регистрируется.

Проанализировав распределение детей с учетом перцентильных интервалов, мы установили, что у детей с церебральной ишемией встречались значения как пониженные и повышенные, так и находящиеся в пределах нормальных значений.

Для определения роли повреждения клеток НВЕ в патогенезе ишемического повреждения головного мозга мы, далее, проанализировали характер появления маркеров поражения НВЕ (уровни NSE, GFAP, sPECAM-1), а также глутамата в периферической крови во взаимосвязи с клиническими проявлениями неврологической дисфункции (таблица 4.16-4.17).

Таблица 4.16 – Уровни NSE, GFAP, sPECAM и глутамата (нг/мл) в периферической крови новорожденных с клиническими проявлениями ишемического повреждения головного мозга в ранний неонатальный период.

	n	NSE нг/мл	GFAP нг/мл	sPECAM-1 нг/мл
	%	M ± σ		
Нарушение сознания	38	10,06±3,3	1,86±0,16	5,2±2,0
	31,6			
Судорожный синдром	48	9,69±5,2	0,93±0,12	5,64±2,2
	40			
Арефлексия	41	9,48±1,8	0,55±0,22	4,5±1,7
	34,2			
Гипорефлексия	50	8,8±1,96	0,58±0,18	5,1±2,5
	41,7			
Врожденный гипотонус	91	6,4±2,1	0,32±0,09	4,6±2,3
	75,8			
Врожденный гипертонус	15	7,28±2,8	0,43±0,1	5,0±3,6
	12,5			
Подача кислорода через маску	17	6,18±4,5	0,86±0,14	1,3±0,4
	14,2			
Искусственная вентиляция легких	89	9,94±4,8	1,73±0,2	4,3±2,4
	74,1			

Ведущими клиническими критериями тяжести повреждения головного мозга являются судорожный синдром, степень нарушения сознания и рефлекторной деятельности.

Таблица 4.17 – Содержание лактата (ммоль/л) и глутамата (нг/мл) в периферической крови новорожденных с клиническими проявлениями ишемического повреждения головного мозга в ранний неонатальный период.

	n	Лактат ммоль/л	Глутамат нг/мл
	%	M ± σ	
Нарушение сознания	38	8,8±2,2	46,7±12,7
	31,6		
Судорожный синдром	48	7,9±3,2	38,5±8,5
	40		
Арефлексия	41	8,1±1,8	33,2±6,3
	34,2		
Гипорефлексия	50	7,5±1,5	30,5±6,2
	41,7		
Врожденный гипотонус	91	5,4±1,6	23,3±5,1
	75,8		
Врожденный гипертонус	15	6,1±0,8	30,7±7,6
	12,5		
Подача кислорода через маску	17	2,2±0,5	5,9±2,7
	14,2		
Искусственная вентиляция легких	89	9,2±1,8	41,3±11,4
	74,1		

Учитывая полученные в ходе исследования результаты, мы выполнили анализ зависимости активности маркеров поражения нейронов, астроцитов, эндотелиальной дисфункции (концентрация NSE, GFAP, sPECAM-1), а также концентрации лактата и глутамата в сыворотке крови у пациентов от указанных ранее клинико-anamнестических показателей:

- 1) необходимость в проведении искусственной вентиляции легких,
- 2) наличие судорожного синдрома,
- 3) степень нарушения сознания,
- 4) наличие нарушений рефлексов,
- 5) отдельные нейросонографические особенности.

1. Необходимость проведения искусственной вентиляции легких. У пациентов с тяжелой церебральной ишемией потребовалось проведение

искусственной вентиляции легких. При этом содержание нейронспецифической енолазы ($9,94 \pm 4,8$ нг/мл), наравне, с концентрацией глиофибрилярного кислого белка ($1,73 \pm 0,2$ нг/мл) оказалось очень высоким и сопоставимым с концентрацией, характерной для ситуаций, которые сопровождались нарушением сознания, а также статистически значимо более высокой, чем в случаях, когда выполнялась только санация верхних дыхательных путей и осуществлялась подача кислорода через маску (NSE - $6,18 \pm 4,5$ нг/мл, GFAP - $0,86 \pm 0,14$ нг/мл). Содержание sPECAM-1 в крови пациентов, которым требовалось проведение ИВЛ ($4,3 \pm 2,4$ нг/мл) было в три раза выше, чем у пациентов, которым кислород подавался через маску ($1,3 \pm 0,4$ нг/мл) и концентрация не превышала нормальные показатели ($p=0,001$). В отношении изменения содержания лактата и глутамата в крови пациентов с церебральной ишемией обнаружена однотипная с sPECAM-1 картина. В случаях необходимости проведения ИВЛ концентрация лактата оказалась в четыре раза выше ($p<0,05$), чем в случаях кислородотерапии через маску, а концентрация глутамата в семь раз больше ($p<0,05$), чем при подаче кислорода через маску ($41,3 \pm 11,4$ нг/мл и $5,9 \pm 2,7$ нг/мл соответственно).

2. При наличии у пациентов судорожного синдрома, концентрация сывороточной NSE была высокой ($9,69 \pm 5,2$ нг/мл), что оказалось в два раза больше нормативных показателей. Концентрация GFAP составила $0,93 \pm 0,12$ нг/мл, а sPECAM-1 - $5,64 \pm 2,2$ нг/мл, что оказалось максимально высоким у пациентов с судорожным синдромом ($p<0,05$). Содержание лактата и глутамата – $7,9 \pm 3,2$ ммоль/л и $38,5 \pm 8,5$ нг/мл соответственно. В целом выявленные особенности свидетельствуют о глубоком и массивном повреждении клеток НВЕ, а также нарушении проницаемости ГЭБ.

3. При развитии нарушений сознания у пациентов, уровень маркера нейронов (NSE) составил $10,06 \pm 3,3$ нг/мл. Этот уровень превышал 75 перцентиль в 2,3 раза ($p=0,03$). Одновременно с этим в сыворотке крови зарегистрирована максимально высокая концентрации GFAP ($1,86 \pm 0,16$

нг/мл). Содержание sPECAM-1 превысило нормативные показатели и составило $5,2 \pm 2,0$ нг/мл ($p=0,001$). Максимально высокий уровень лактата и глутамата был зафиксирован у пациентов с нарушением сознания ($8,8 \pm 2,2$ ммоль/л и $46,7 \pm 12,7$ нг/мл соответственно).

4. Нарушения в рефлекторной сфере проявлялись как в ослаблении рефлексов, так и полном их отсутствии. В случае арефлексии концентрация NSE ($9,48 \pm 1,8$ нг/мл) оказалась сопоставима с концентрацией у пациентов с судорожным синдромом, но выше, чем у пациентов с гипорефлексией. Концентрация маркера астроглии ($0,55 \pm 0,22$ нг/мл) была сопоставима с гипорефлексией, превышая при этом нормативные показатели ($p < 0,05$). Концентрация sPECAM-1 в крови пациентов ($4,5 \pm 1,7$ нг/мл) превышала нормальные значения ($p < 0,05$). Содержание лактата у пациентов с нарушениями рефлекторной деятельности составило $8,1 \pm 1,8$ ммоль/л, а глутамата - $33,2 \pm 6,3$ нг/мл.

В ситуациях, сопровождающихся гипорефлексией концентрация NSE - $8,8 \pm 1,9$ нг/мл, GFAP - $0,58 \pm 0,18$ нг/мл, что сопоставимо с концентрацией при арефлексии. Концентрация sPECAM-1 - $5,1 \pm 2,5$ нг/мл, глутамата - $30,5 \pm 6,2$ нг/мл, что сопоставимо с арефлексией.

5. Изменения нейросонографической картины.

Сопоставив данные НСГ и концентрацию изучаемых нейроспецифических белков, sPECAM-1 и глутамата (таблица 4.18, 4.19), мы установили, что увеличение размеров передних рогов боковых желудочков сочетается с увеличением концентрации NSE ($6,8 \pm 1,8$ нг/мл), GFAP ($0,42 \pm 0,2$ нг/мл), sPECAM-1 ($4,9 \pm 2,5$ нг/мл), лактата ($4,2 \pm 1,3$ ммоль/л), глутамата ($37 \pm 12,5$ нг/мл).

У пациентов, у которых наблюдалось расширение задних рогов боковых желудочков головного мозга зафиксировано увеличение концентрации NSE в крови до $7,3 \pm 2,5$ нг/мл, что соответствует максимальным значениям. Также было повышено содержание GFAP, sPECAM-1, лактата и глутамата.

Таблица 4.18 – Сопоставление данных НСГ с уровнем НСБ и глутамата в ранний неонатальный период.

Показатель		n	NSE нг/мл	GFAP нг/мл	sPESAM-1 нг/мл	Лактат ммоль/л	Глутамат нг/мл
		Абс.	M ± σ				
		%					
Передние рога боковых желудочков	Норма	51	5,3±2,3	0,29±0,1	2,7±2,3	1,5±0,8*	2,7±0,3*
		42,5					
	Сужение	7	4,8±2,1	0,82±0,31*	3,5±2	5,1±1,1	49,7±12,3
		5,8					
	Расширение	61	6,8±1,8*	0,42±0,2	4,9±2,5*	4,2±1,3	37±12,5
		50,8					
Задние рога боковых желудочков	Норма	56	5,2±2,5	0,2±0,09	3,2±2,7*	1,2±0,7*	8,5±2,3*
		46,7					
	Сужение	5	4,63±1,9	0,35±0,2	4,7±2,1	5,2±1,3	42,5±9,4
		4,2					
	Расширение	85	7,3±2,5*	0,12±0,08*	4,8±2,5	6,2±1,2	35,2±10,8
		48,3					
Тело бокового желудочка	Норма	22	6,1±2,8	0,45±0,12	3,6±1,1	1,1±0,5*	6,5±3,2*
		18,3					
	Сужение	46	5,8±2,3*	0,63±0,23	3,8±2,4	7,8±1,2	43,3±12,8
		38,3					
	Расширение	51	6,9±1,9	0,29±0,12*	5,5±2,1*	8,2±1,4	48±11,1
		42,5					
III желудочек (ширина)	Норма	78	4,8±2,3	0,56±0,13	2,2±0,46	1,6±0,3*	5,8±2,1*
		65					
	Сужение	32	6,5±1,8	0,48±0,18	5,5±3,1	6,5±1,2	39,8±8,7
		26,7					
	Расширение	5	8,4±3,2*	0,32±0,08*	7,0±0,9*	7,3±0,8	47,1±10,1
		7,5					
IV желудочек (глубина)	Норма	49	5,6±2,6*	1,2±0,3*	1,2±0,3*	1,6±0,3*	8,1±3,5*
		40,8					
	Сужение	12	8,3±3,8	0,8±0,38	4,6±2,1	8,1±1,2	58,3±15,1
		10					
	Расширение	58	8,4±2,8	0,6±0,25	5,7±1,9	6,9±1,6	42,6±12,4
		48,3					

Примечания: * - разница между выделенной группой с остальными ($p < 0,05$), критерий χ^2 .

Таблица 4.18 – Сопоставление данных НСГ с уровнем НСБ и глутамата в ранний неонатальный период (продолжение).

Показатель		n	NSE нг/мл	GFAP нг/мл	sPESAM-1 нг/мл	Лактат ммоль/л	Глутамат нг/мл
		Абс. %	M ± σ				
Большая затылочная цистерна мозга	Норма	99	4,9±1,9	0,28±0,01	3,3±2,6*	1,5±0,5*	9,3±5,6*
		82,5					
	Сужение	9	4,3±2,3	0,48±0,2*	5,8±1,9	8,5±1,2	63,9±9,5
		7,5					
	Расширение	12	7,9±4,0*	0,32±0,16	6±2,6	7,6±1,5	49,8±18,2
		10					
Субарахноидальное пространство	Норма	37	4,75±0,8	0,41±0,2*	1,3±0,4*	1,8±0,4*	12,7±3,8*
		30,8					
	Сужение	54	5,6±2,6	0,7±0,35	4,8±1,8	7,9±1,2	59,8±12,4
		45					
	Расширение	27	9,8±3,8*	0,81±0,3	4,9±0,9	8,1±1,2	63,2±8,9
		22,5					
Межполушарная щель	Норма	65	5,8±3,0	0,4±0,09	1,6±0,4*	1,6±0,5*	9,1±6,2*
		54,2					
	Сужение	27	5,1±2,8	0,86±0,16*	4,7±1,0	7,8±1,3	56,8±9,4
		22,5					
	Расширение	27	8,3±3,1*	0,33±0,16	5,9±0,8	8,2±1,1	64,4±8,9
		22,5					

Примечания: * - разница между выделенной группой с остальными ($p < 0,05$), критерий Манна-Уитни.

При этом максимальная концентрация GFAP ($0,35 \pm 0,2$ нг/мл) зафиксирована в ситуациях сужения боковых рогов. Содержание sPESAM-1 оказалось одинаково увеличенным как при сужении ($4,7 \pm 2,111$ нг/мл), так и расширении ($4,8 \pm 2,5$ нг/мл) задних рогов. Эти значения статистически значимо превышали нормальные показатели и значения, зафиксированные в случаях, когда размеры задних рогов были без изменений ($3,2 \pm 2,7$ нг/мл). Содержание лактата и глутамата в крови было сопоставимым в случаях сужения ($5,2 \pm 1,3$ ммоль/л и $42,5 \pm 9,4$ нг/мл соответственно) и расширения ($6,2 \pm 1,2$ ммоль/л и $35,2 \pm 10,8$ нг/мл соответственно) задних рогов. При этом

оно оказалось в 4-5 раз выше значений характерных для не измененных размеров.

Таблица 4.19 – Изменение уровней NSE, GFAP, sPECAM-1, глутамата в периферической крови детей с церебральной ишемией в зависимости от степени тяжести изменения в структурах головного мозга в ранний неонатальный период.

Гиперэхогенность		n	NSE нг/мл	GFAP нг/мл	sPECAM-1 нг/мл	Лактат ммоль/л	Глутамат нг/мл	
								Абс.
		%						
Коры	Легкая	19	4,2±1,2	0,23±0,08	0,16±0,07	1,5±0,5*	5,2±1,9*	
		15,8						
	Умеренная	78	4,8±1,3	0,34±0,15	3,7±0,3	5,5±1,2	24,5±10,3	
		65						
	Выраженная	17	5,3±2,1	0,44±0,23*	7,2±0,6*	8,1±1,5	45,8±12,5	
		14,1						
Подкорковых структур	Легкая	14	6,3±2,3*	0,4±0,16	1,1±0,6	2,2±0,9*	9,4±3,5*	
		11,6						
	Умеренная	66	9,8±4,5	0,58±0,18	3,0±0,4	5,8±1,2	28,9±5,6	
		55						
	Выраженная	31	9,7±3,8	0,9±0,3*	6,2±0,4*	8,2±1,9	48±9,6	
		25,8						
Отек перивентрикулярной области:	Слабый	27	5,3±2,8*	0,18±0,13	1,8±0,7	1,8±0,6	3,5±1,2*	
		22,5						
	Умеренный	54	6,4±2,6	0,22±0,08	4,0±0,2	7,8±1,4	19,4±5,2	
		45						
	Выраженный	26	8,5±3,2	0,51±0,2*	6,7±0,4*	8,2±1,1	47,2±8,1	
		21,7						

Примечания: * - разница между выделенной группой с остальными (p<0,05), критерий Манна-Уитни.

Аналогичные изменения обнаружены при анализе размеров тел боковых желудочков мозга. Расширение их размеров сопровождалось повышением концентрации в крови нейронспецифической енолазы – 6,9±1,9 нг/мл и минимальной концентрацией GFAP - 0,29±0,12 нг/мл (p<0,05),

высокой концентрацией sPECAM-1 - $5,5 \pm 2,1$ нг/мл, лактата $8,2 \pm 1,4$ ммоль/л и глутамата $48 \pm 11,1$ нг/мл ($p=0,03$).

В случаях увеличения размеров третьего желудочка зафиксировано самое высокое содержание NSE ($8,4 \pm 3,2$ нг/мл), sPECAM-1 ($7,0 \pm 0,9$ нг/мл), лактата ($7,3 \pm 0,8$ ммоль/л) глутамата ($47,1 \pm 10,1$ нг/мл), но минимальные GFAP ($0,32 \pm 0,08$ нг/мл).

Отклонения размеров IV желудочка от нормативных показателей сопровождались увеличением концентрации NSE, которая была одинаково повышенной и сопоставимой между собой ($8,4 \pm 2,8$ нг/мл при расширении и $8,3 \pm 3,8$ нг/мл при сужении), а также sPECAM-1 (при увеличении $5,7 \pm 1,9$ нг/мл и уменьшении $4,6 \pm 2,1$ нг/мл), лактата (при расширении – $6,9$ ммоль/л и при сужении – $8,1 \pm 1,2$ ммоль/л), глутамата (при расширении - $42,6 \pm 12,4$ нг/мл и при сужении - $58,3 \pm 15,1$ нг/мл) и статистически значимо более высокая, чем при нормальных размерах ($p=0,01$). Однако, максимальная концентрация GFAP - $1,2 \pm 0,3$ нг/мл определялось у пациентов с нормальными размерами IV желудочка, оставаясь повышенным и при сужении - $0,8 \pm 0,38$ нг/мл и расширении - $0,6 \pm 0,25$ нг/мл размеров.

Расширение размеров большой затылочной цистерны сопровождалось увеличением концентрации NSE ($7,9 \pm 4$ нг/мл). Любые отклонения размеров от нормальных сопровождалось статистически значимым увеличением содержания GFAP (при сужении $0,48 \pm 0,2$ нг/мл и $0,32 \pm 0,16$ нг/мл при расширении), sPECAM-1 ($6 \pm 2,6$ нг/мл в случаях увеличения размеров и $5,8 \pm 1,9$ нг/мл при уменьшении), а также лактата (при сужении $8,5 \pm 1,2$ ммоль/л и при расширении $7,6 \pm 1,5$ ммоль/л) и глутамата (при сужении $63,9 \pm 9,5$ нг/мл и при расширении $49,8 \pm 18,2$ нг/мл) по сравнению, когда размеры оставались в пределах нормы ($p=0,01$).

Повышение концентрации NSE ($9,8 \pm 3,8$ нг/мл) обнаружено у детей с расширением субарахноидального пространства. При любом отклонении размеров от нормальных происходит статистически значимое повышение концентрации GFAP ($0,81 \pm 0,3$ нг/мл при увеличении и $0,7 \pm 0,35$ нг/мл при

уменьшении размеров), sPECAM-1 (сужение - $4,8 \pm 1,8$ нг/мл, расширение - $4,9 \pm 0,9$ нг/мл), лактата (при расширении – $8,1 \pm 1,2$ ммоль/л и при сужении – $7,9 \pm 1,2$ ммоль/л), глутамата (при увеличении $63,2 \pm 8,9$ нг/мл и при уменьшении размеров $59,8 \pm 12,4$ нг/мл) ($p=0,001$).

В случаях увеличения размеров межполушарной щели зафиксировано повышение концентрации NSE до $8,3 \pm 3,1$ нг/мл. Повышение содержания GFAP установлены при любом отклонении размеров от нормальных.

При этом максимальное содержание GFAP выше при сужении межполушарной щели ($0,86 \pm 0,16$ нг/мл) ($p < 0,05$). Концентрация sPECAM-1 больше в случаях увеличения размеров межполушарной щели ($5,9 \pm 0,8$ нг/мл), чем при уменьшении ($4,7 \pm 1,0$ нг/мл) размеров ($p=0,005$) или нормальных ($1,6 \pm 0,4$ нг/мл) размерах ($p=0,001$).

Установлено, что концентрация лактата при расширении размеров межполушарной щели составила $8,2 \pm 1,1$ ммоль/л, сужении – $7,8 \pm 1,3$ ммоль/л, что статистически значимо больше, чем у пациентов с нормальными размерами ($p=0,01$). При этом уровень глутамата также значительно повышался при изменении размеров межполушарной щели (при расширении - $64,4 \pm 8,9$ нг/мл, при сужении - $56,8 \pm 9,4$ нг/мл), в отличие от ситуации, когда размеры оставались в пределах нормы ($9,1 \pm 6,2$ нг/мл) ($p=0,01$).

При отеке и подкорковых структур и коры головного мозга была выявлена прямая корреляция между концентрацией нейроспецифических белков, sPECAM-1, лактата и глутамата в крови пациентов при наличии выраженных отеков ткани головного мозга.

В ходе анализа выраженности отека различных структур головного мозга и концентраций изучаемых маркеров повреждения клеток, образующих НВЕ и глутамата установлена прямая корреляционная связь (таблица 4.20) между выраженностью отека ткани головного мозга и концентрацией нейронспецифической енолазы ($r=0,54-0,6$; $p < 0,05$), глиофибриллярного 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 ($r=0,89-0,96$; $p < 0,05$).

Таблица 4.20 – Корреляционные взаимосвязи между выраженностью отека головного мозга и маркерами повреждения клеток НВЕ в ранний неонатальный период, (r; p).

	NSE	GFAP	sPECAM-1	Лактат	Глутамат
Выраженность отека коры	r=0,56; p<0,05	r=0,62; p<0,05	r=0,89; p<0,05	r=0,9; p<0,05	r=0,93; p<0,05
Выраженность отека подкорковых структур	r=0,6; p<0,05	r=0,829; p<0,05	r=0,625; p<0,05	r=0,8; p<0,05	r=0,89; p<0,05
Отек ПВО	r=0,54; p<0,05	r=0,854; p<0,05	r=0,95; p<0,05	r=0,9; p<0,05	r=0,96; p<0,05

Примечания: r – коэффициент ранговой корреляции Спирмена, p – уровень значимости.

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 (таблица 4.21).

Таблица 4.21 – Корреляционные взаимосвязи между размерами структур ликворопроводящих путей, и маркерами повреждения клеток НВЕ в ранний неонатальный период, (r; p).

Изменение размеров	NSE	GFAP	sPECAM-1	Лактат	Глутамат
Передние рога боковых желудочков	r=0,53; p<0,05	r=0,5; p<0,05	r=0,5; p<0,05	r=0,75; p<0,05	r=0,85; p<0,05

Задние рога боковых желудочков	r=0,54; p<0,05	r=-0,27; p>0,05	r=0,546; p<0,05	r=0,9; p<0,05	r=0,95; p<0,05
Тело бокового желудочка	r=0,36; p>0,05	r=-0,42; p>0,05	r=0,575; p<0,05	r=0,85; p<0,05	r=0,75; p<0,05
III желудочек (ширина)	r=0,77; p<0,05	r=-0,68; p<0,05	r=0,772; p<0,05	r=0,8; p<0,05	r=0,79; p<0,05
IV желудочек (глубина)	r=0,62; p<0,05	r=-0,6; p<0,05	r=0,86; p<0,05	r=0,9; p<0,05	r=0,89; p<0,05
Большая затылочная цистерна мозга	r=0,52; p<0,05	r=0,26; p>0,05	r=0,69; p<0,05	r=0,9; p<0,05	r=0,93; p<0,05
Субарахноидальное пространство	r=0,82; p<0,05	r=0,65; p<0,05	r=0,75; p<0,05	r=0,9; p<0,05	r=0,92; p<0,05
Межполушарная щель	r=0,54; p<0,05	r=-0,29; p>0,05	r=0,95; p<0,05	r=0,85; p<0,05	r=0,84; p<0,05

Примечания: r – коэффициент ранговой корреляции Спирмена, p – уровень значимости.

Итак, в ходе выполнения клинической части настоящего исследование установлено:

1. Наиболее значимыми особенностями биологического анамнеза пациентов, которые причастны к развитию перинатального поражения ЦНС и которые можно обозначить как управляемые являются только антенатальные воздействия: синдром анемии у беременной женщины и наличие хронической фетоплацентарной недостаточности. Именно эти факторы оказывают непосредственное влияние на возникновение внутриутробной гипоксии плода.

2. Ведущими клиническими проявлениями в раннем неонатальном периоде у пациентов со второй и третьей степенью тяжести ЦИ следует считать снижение тонуса мышц (гипотонус) и рефлексов (гипо- и арефлексия), нарушения сознания и наличие судорожного синдрома, с последующей положительной динамикой и уменьшением доли детей с симптомами угнетения и сменой гипотонии мышц на гипертонус. Особенности ультразвукового исследования головного мозга, характеризующими состояние ликворопроводящих путей в раннем

неонатальном периоде, являются преобладание детей с увеличением размеров (расширением) боковых и четвертого желудочков, сужение субарахноидального пространства при церебральной ишемии III степени с сохранением обозначенных особенностей в позднем неонатальном периоде, что может быть обусловлено как избыточной ликворопродукции, так и начальными явлениями атрофии паренхимы головного мозга. Среди структурных нарушений ЦНС в раннем неонатальном периоде преобладает умеренно выраженный отек в коре головного мозга, перивентрикулярных отделах и подкорковых структурах с наиболее частой выявляемостью у новорожденных со II и III степенью ЦИ. Выраженный отек преобладал в корковых отделах и перивентрикулярных областях. В поздний неонатальный период, при тенденции к положительной динамике во всех группах новорожденных, отмечается увеличение доли пациентов с выраженными отечными изменениями корковых структур при III степени ЦИ.

3. Поражение ЦНС новорожденных в следствии гипоксически-ишемического воздействия сопровождается разнонаправленными изменениями концентраций маркеров нейронов и астроглии и дисфункции эндотелиальных клеток, а также лактата и глутамата: значительное повышение NSE в сыворотке крови детей с церебральной ишемией III степени и на фоне выраженной неврологической симптоматики (нарушение сознания, судороги, а- и гипорефлексия, мышечная дистония), а также увеличении размеров ликворопроводящих путей, выраженном отеке коры головного мозга, что свидетельствует о преимущественном повреждении нейронов. Повреждение астроглии отмечается при церебральной ишемии любой степени тяжести, при этом максимальная концентрация GFAP наблюдается у новорожденных с тяжелой неврологической симптоматикой (нарушение сознания, судороги и необходимость проведения искусственной вентиляции легких), а также характерна для уменьшения размеров ликворопроводящей системы выраженного отека ткани мозга. В целом, это может соответствовать вовлечению в патологический процесс подкорковых

структур мозга и развитию астроглиоза. Выраженное повреждение клеток эндотелиальной природы характерно для церебральной ишемии II и III степени с максимальным повреждением в случаях развития нарушения сознания, судорог, гипертонуса, гипорефлексии, выраженного отека ткани головного мозга (всех изученных структур) и расширении ликворопроводящей системы. Максимальная концентрация лактата и глутамата наблюдается при церебральной ишемии II и III степени, выраженной клинической симптоматике (нарушение сознания, судорожный синдром, нарушение рефлексов и тонуса мышц, изменения размеров ликворопроводящих путей и отек вещества головного мозга). Увеличение размеров ликворопроводящих путей сопровождается повышением концентрации нейронспецифической енолазы ($r=0,53-0,84$) и sPECAM-1 ($r=0,5-0,95$), а сужение – повышением содержания глиофибрилярного кислого белка ($r=0,5-0,68$). Увеличение содержания лактата и глутамата присутствует при любых изменениях размеров ликворопроводящих путей ($r=0,75-0,95$). В случае отека вещества головного мозга наблюдается повышение концентрации всех изучаемых маркеров повреждения НВЕ в сыворотке крови ($r=0,54-0,96$).

ГЛАВА V. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наша работа посвящена изучению молекулярных механизмов межклеточной коммуникации и метаболического сопряжения клеток, которые участвуют в формировании нейроваскулярной единицы, после перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС.

Согласно данным литературы, перинатальное поражение ЦНС способно индуцировать нейропсихические нарушения в отдаленные сроки, что определяется, в числе прочих факторов, длительностью гипоксически-ишемического повреждения [296, 474], а также является основной причиной младенческой смертности и инвалидности [396, 432, 531].

Изменения ЦНС при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении являются возраст-зависимыми. У доношенных новорожденных при гипоксии-ишемии страдают преимущественно нейроны, т.е. кора. Для детей, родившихся раньше срока, характерно избирательное поражение белого вещества мозга с развитием перивентрикулярной лейкомаляции [194, 448, 547, 548].

Перивентрикулярная лейкомаляция является преобладающей формой травмы головного мозга у недоношенных детей и основой для развития, впоследствии, детского церебрального паралича. Детская инвалидность, развивающаяся вследствие поражения ЦНС в перинатальный период, составляет 65% [480, 355]. Также особую проблему представляет тот факт, что в перивентрикулярных областях находятся «нейрогенные ниши», которые являются источником нейрогенеза у взрослых. То есть, в результате перинатального поражения ЦНС у недоношенных детей снижается регенеративный потенциал для нейрогенеза в будущем. Это отчасти и может объяснить развитие отсроченной неврологической патологии.

Одновременно с этим сохраняются трудности с диагностикой, терапией и прогнозом исходов перинатального гипоксически-ишемического

поражения. Использование традиционных подходов к диагностике церебральной ишемии предоставляет специалистам недостаточно информации для выявления ранних и отсроченных изменений метаболизма в ткани мозга.

Например, использование стандартных неврологических методов обследования, позволяющих установить нормальный или измененный неврологический статус ребенка, эффективны, в контексте прогностической оценки, лишь в 15-20%. Использование нейросонографического исследования позволяет увеличить прогностическую ценность до 60%.

В настоящее время имеются возможности использования биохимических методов диагностики и оценки глубины молекулярно-клеточных изменений, происходящих в ткани головного мозга. С этой целью определяют концентрацию нейроспецифических белков в сыворотке периферической крови. Так как эти белки синтезируются клетками ЦНС и не определяются в крови в физиологических условиях, то их обнаружение может свидетельствовать о повреждении, нарушениях проницаемости ГЭБ на молекулярно-клеточном уровне, еще до формирования глубоких структурных изменений в головном мозге.

Однако до настоящего времени не до конца изучена роль молекулярных механизмов, обеспечивающих анатомическую целостность ГЭБ, а также метаболическое сопряжение клеток НВЕ. Ответив на вопросы о роли молекул, участвующих в обеспечении молекулярных механизмов межклеточной коммуникации и метаболического сопряжения клеток нейроваскулярной единицы в пато(физио)логических условиях, а также изучив изменения в указанных механизмах, происходящих при перинатальном гипоксически-ишемическом повреждении, можно определить ведущие молекулы маркеры для разработки новых методов диагностики, а также молекулы-мишени для терапевтического воздействия.

С точки зрения практической медицины, необходимо знать при каких изменениях в ЦНС нейроспецифические белки появляются в периферической крови.

Нейронспецифическая енолаза или NSE является белком-маркером дифференцированных клеток нейрональной природы, глиальный кислый фибриллярный белок или GFAP – белок-маркер зрелых астроцитов, а sPECAM-1 - маркер дисфункции и гибели эндотелиальных клеток.

Первые две молекулы являются одними из распространенных маркеров при оценке повреждения ЦНС. Роль sPECAM-1 при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении практически не изучена.

С другой стороны, необходимо понимать механизмы появления в периферической крови изучаемых нейроспецифических белков. Логично сделать вывод, что появление «забарьерных» белков возможно при повреждении ГЭБ. Однако не всегда очевидно, что это повреждение носит только лишь морфологический характер. Возможно, изменение функциональной активности и межклеточных взаимодействий элементов НВЕ могут привести к таким же изменениям, как и прямое механическое повреждение ГЭБ. Например, из-за изменения функциональной активности белков плотных контактов и клеточной адгезии.

Известно, что в ответ на гипоксию-ишемию в организме запускаются компенсаторные реакции, которые направлены на обеспечение адекватного снабжения тканей субстратами, энергией и кислородом - альтернативных путей энергетического обеспечения, изменения работы транспортных систем. Однако компенсаторные возможности ограничены. При продолжающемся или длительном повреждении наступает декомпенсация. При этом компенсаторные механизмы могут приобретать характер патологических и вызывать дополнительное повреждение ткани мозга.

Изменения белков, обеспечивающих уникальное свойство эндотелиальных клеток головного мозга, вполне может быть областью интереса с точки зрения изучения особенностей механизмов, приводящих к

нарушению проницаемости ГЭБ. С другой стороны, необходимо понимать какие именно изменения механизмов межклеточной коммуникации и метаболического сопряжения клеток нейроваскулярной единицы происходят при патологическом воздействии гипоксии-ишемии.

Изучение этих маркеров при перинатальном поражении ЦНС различной степени тяжести, а также их значение в определении прогноза при патологии ЦНС остается предметом дискуссий и множества исследований. Таким образом, исследования в области фундаментальных процессов, происходящих на молекулярном и клеточном уровнях, непосредственно можно внедрить в практическое здравоохранение.

Дополнение общепринятой диагностики (с использованием NSE и GFAP) оценкой уровня sPESAM-1, концентрации лактата и глутамата, на наш взгляд, позволяет оптимизировать подходы к изучению характера повреждения клеток головного мозга и ГЭБ в клинической практике, учитывать индивидуальные особенности, оценивать эффективность проводимой терапии при проведении динамических исследований.

Учитывая все перечисленные вопросы, была поставлена клиническая задача по изучению и анализу особенностей клинических проявлений, лабораторных показателей и нейросонографических признаков повреждения ЦНС у новорожденных пациентов с гипоксически-ишемическим поражением головного мозга и, с использованием современного научного подхода, с учетом особенностей межклеточных коммуникаций нейроваскулярной единицы, обозначить молекулы-мишени и молекулы-маркеры и предложить разработку подходов к таргетной терапии.

Для достижения поставленной цели в ходе работы проводились экспериментальные и клинические исследования.

Одним из ведущих механизмов развития клеточного и субклеточного повреждения в пределах нейроваскулярной единицы, в результате воздействия различных патогенных факторов, в том числе гипоксически-ишемического генеза, являются нарушения метаболического сопряжения и

разобщение межклеточных взаимодействий [154, 370]. Указанные механизмы являются также важными компонентами нормального развития головного мозга [257, 508]. А, следовательно, нарушение этих механизмов может привести к нарушениям репаративных процессов и возникновению остаточных проявлений и осложнений после перенесенной перинатальной гипоксии-ишемии. Межклеточная коммуникация и энергетическое сопряжение осуществляется различными белками-рецепторами (CD38), транспортерами (SLC1A5, EAAT2, Pgp, MCT1, MCT4, GLUT4), нуклеотидами (НАД⁺, АТФ), коннексинами (т.н. щелевые контакты) и транспортируемыми ими соединениями и молекулами (АДФ, АТФ, НАД⁺, глутамат, глутамин) [59, 142, 208, 511]. Анатомическая целостность и функциональная уникальность, в контексте избирательности проницаемости ГЭБ, обеспечивается эндотелиальными белками плотных контактов (JAM, ZO1, CLDN5). Однако, в настоящее время все еще недостаточно информации о роли этих механизмов в регуляции и дисфункции нейроваскулярной единицы при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС.

В ходе работы мы определили роль НАД⁺-конвертирующего фермента – CD38 в межклеточной коммуникации при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении. CD38 обеспечивает образование циклической АДФ-рибозы в клетках.

В свою очередь циклическая АДФ-рибоза оказывает либераторный эффект на внутриклеточный кальций [340], а также меняет активность калиевых ионных каналов М-типа в клетках нейрональной природы [197, 206] и, таким образом, участвует в секреции нейротрансмиттеров, синаптической передаче, электровозбудимости и нейропластичности.

Таким образом, возможным механизмом усиления экспрессии CD38 при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении является увеличение обеспечения субстратом (НАД⁺) с последующим образованием цАДФР, обладающей либераторным эффектом на кальций внутриклеточных депо [91, 409].

Кроме этого участие CD38 в механизмах межклеточной коммуникации может быть обусловлено глутаматными воздействиями и сопряжением с Cx43 в процессах клеточной миграции, вследствие взаимодействия с рианодиновыми рецепторами внутриклеточных кальциевых депо в астроцитах [479].

Ранее было показано, что при совместном культивировании нейронов и астроцитов, увеличение экспрессии CD38 в последних связано с действием глутамата, который высвобождается из активированных нейронов [277]. Обнаруженное нами увеличение экспрессии CD38 в клетках астроглиальной природы является маркером проявлений нарушений транспорта глутамата между клетками нейроваскулярной медицины и реализации феномена эксайтотоксичности. Как доказательство этого предположения, в ходе экспериментов *in vitro* мы зарегистрировали изменение количества астроцитов, которые экспрессируют глутаматные транспортеры после перенесенной «химической гипоксии».

Мы впервые обнаружили экспрессию CD38 на эндотелии церебральных сосудов. Присутствие CD38⁺-клеток в этой популяции может быть обусловлено как присутствием «примеси» перicyтов, так и экспрессией CD38 собственно клетками развивающегося эндотелия (прогениторными клетками), как это было недавно показано для PECAM-1⁺/Sca1⁺/CD38⁺ клеток сосудов кожи, дифференцирующихся в миофибробластоподобные клетки в процессе развития сосудов или при репарации поврежденного участка [428].

Интересно, что экспрессия CD38 на клетках церебрального эндотелия оказалась устойчивой к действию острой гипоксии.

Мы предполагаем, что присутствие CD38⁺-прогениторных клеток эндотелия (или периваскулярных клеток) может отражать их активацию т.н. глиотрансмиттерами, высвобождающимися из активированной астроглии в очаге повреждения, как это было показано для HMGB1 белков, высвобождающихся из астроцитов и действующих на эндотелиальные

прогениторные клетки, что вызывает нейроваскулярное ремоделирование [123, 237].

Еще одним белком, участвующим в межклеточной коммуникации и метаболическом сопряжении нейроваскулярной единицы, является коннексин-43, который формирует каналы, опосредующие равновесный транспорт НАД⁺ из цитозоля к активному сайту НАД⁺-конвертирующих ферментов, к CD38, а также транспорт ионов кальция, калия, лактата и глутамата [529].

Таким образом, функционирование Sx43 может обеспечивать усиление активности АДФ-рибозилциклазы через увеличение доступности НАД⁺ в качестве субстрата, что отражает особенности межклеточной коммуникации и энергетического сопряжения в пределах нейроваскулярной единицы.

Мы обнаружили высокий уровень экспрессии Sx43 в астроцитах и клетках эндотелия, что не противоречит литературным данным [223]. Значительное количество (до $\frac{3}{4}$) клеток одновременно экспрессируют CD38 и Sx43, что можно расценить, как свидетельство функционального сопряжения этих двух молекул на клетках астроглиальной природы.

На фоне перинатального гипоксически-ишемического поражения совместная экспрессия CD38 и Sx43 практически не меняется и остается в пределах $76,6 \pm 7,4\%$. Но при этом через 72 часа после гипоксии-ишемии увеличивается общее количество Sx43-иммунопозитивных клеток с максимальным показателем $15 \pm 1,2\%$ через 10 суток после гипоксии-ишемии и постепенным снижением к 28 дню постнатального развития. При этом у животных контрольной группы, с возраста 10 суток, происходит уменьшение клеток, экспрессирующих Sx43.

Таким образом, полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что в ранние сроки после развития перинатального поражения ЦНС, основными Sx43-иммунопозитивными клетками являются клетки астроглиальной природы. Это может свидетельствовать о том, что при астроглиозе, развивающемся при гипоксически-ишемическом поражении,

происходит повышение экспрессии CD38 и функционально сопряженного белка Cx43.

Роль коннексина-43 заключается в регулировании доступности энергетических субстратов (АТФ, НАД⁺) для взаимодействия с молекулой CD38. Собственно молекула CD38 обеспечивает превращение никотинамидадениндинуклеотида в цАДФР. В свою очередь цАДФР мобилизует Ca²⁺ в цитозоль из депо внутри клеток, что является необходимым для процессов активации астроцитов и миграции клеток в область повреждения.

Также благодаря CD38/Cx43-опосредованным межклеточным взаимодействиям может реализовываться влияние астроглии на нейроны. Например, путем изменения внутриклеточной концентрации кальция, а также изменением высвобождения ГАМК и глутамата [104, 250].

Однако роль таких изменений нуждается в дополнительных исследованиях. Имеются работы, доказывающие нейропротективное действие коннексина-43, что связано с ограничением выраженности астроглиоза в областях с повышенным количеством Cx43-иммунопозитивных клеток [479]. При этом даже предлагаются терапевтические методики лечения гипоксически-ишемического поражения, опосредованные через механизмы увеличения уровня Cx43 в головном мозге [311].

С другой стороны, одномоментное и синхронное увеличение экспрессии CD38 и коннексинов может обеспечивать развитие «кальциевой волны» и реализацию глутаматной эксайтотоксичности, когда глутамат, поступающий из нейронов во внеклеточное пространство, стимулирует экспрессию фермента на астроцитах, усиливает гипоксически-ишемические повреждения.

Известно, что функциональное разобщение CD38 и Cx43 приводит к уменьшению межклеточной передачи НАД⁺ и уровня внутриклеточного

кальция. Доказана ауторегуляция Сх43-иммунопозитивных клеток посредством фосфорилирования Сх43.

Фосфорилированная форма Сх43 не обладает активностью транспортировки НАД⁺. Поэтому повышение уровня внутриклеточного кальция обеспечивает активацию кальций-зависимой протеинкиназы С, с последующим фосфорилированием Сх43. При этом молекула теряет способность к транспортировке НАД⁺.

Биологический смысл такого механизма ауторегуляции заключается в том, что он позволяет уменьшить потери внутриклеточного НАД⁺ и, следовательно, полного истощения его запасов, которое может возникнуть вследствие избыточной биологической активности молекулы CD38 или повышенной продукции цАДФР, приводящей к увеличению концентрации кальция до токсических значений [89, 384, 468]. Резкое понижение внутриклеточного НАД⁺, которое связано с гиперактивацией поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) при окислительном стрессе, приводит к индукции митохондриальной дисфункции и апоптозу астроцитов [494]. Поэтому, изменение экспрессии НАД⁺-транспортирующих и НАД⁺-метаболизирующих молекул является ограничивающим фактором при регуляции электровозбудимости нейронов и клеток астроглии, а также их выживаемости после перенесенной гипоксии-ишемии.

Итак, изменение количества клеток ЦНС, экспрессирующих молекулы CD38 и Сх43, при перинатальном поражении ЦНС, является маркером развившихся нарушения межклеточных взаимодействий в пределах нейроваскулярной единицы. На рисунке 20 изображена схема сопряжения клеток нейроваскулярной единицы посредством молекул CD38 и Сх43.

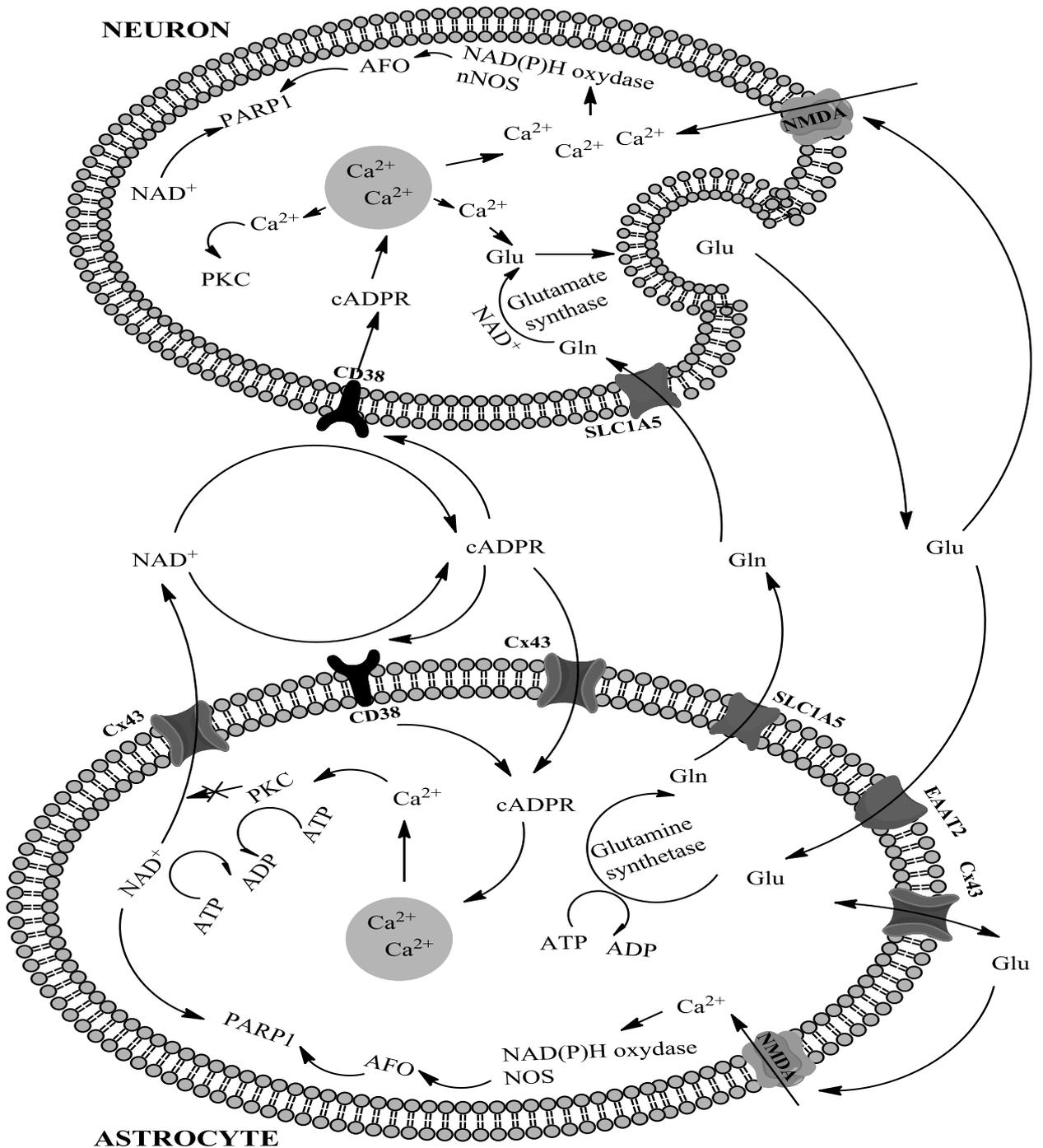


Рисунок 20 – Схема внутриклеточных молекулярных взаимодействий с участием CD38 и Cx43 (AFO-активные формы кислорода, Glu-глутамат, Gln-глутамин, PKC-протеин киназа C, nNOS-нейрональная NO-синтаза, NOS-NO-синтаза)

Так как изменения межклеточных взаимодействий, связанные с молекулами Cx43 и CD38, вызывающие изменения энергетического сопряжения, а также поступление/выведение субстратов и токсических

метаболитов в нейроваскулярной единице при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении происходят вследствие нарушений проницаемости ГЭБ, нами были проанализированы транспортные системы, обеспечивающие клетки НВЕ субстратами (SLC1A5, EAAT2, MCT1, MCT4, GLUT4) и оказывающие протективное действие (Р-гликопротеин).

У животных, находившихся в физиологических условиях количество астроцитов и эндотелиоцитов, экспрессирующих MCT1, прогрессивно снижается в гиппокампе, коре и миндалине, но остается на высоком уровне в эндотелиальных клетках коры головного мозга: P7 – $35,1 \pm 3,9\%$ и P28 – $27,8 \pm 2,7\%$.

В результате перенесенной гипоксии-ишемии наблюдается быстрое (в течение 8 часов) увеличение количества MCT1-иммунопозитивных клеток в коре головного мозга с $5,5 \pm 1,6\%$ (контрольная группа) до $20,3 \pm 2\%$ (опытная группа) с одновременным снижением количества MCT1+-астроцитов в миндалине с $26,6 \pm 3,4\%$ до $10,1 \pm 1,7\%$. К 28 суткам жизни количество астроцитов, с интересующим белком, восстановилось и достигло нормальных показателей в миндалине. Но в коре и гиппокампе оставалось значительно более высоким по сравнению с группой контроля. Подобные изменения были обнаружены [153], когда в клетках, подвергшихся острому гипоксическому воздействию, было зафиксировано увеличение мРНК монокарбоксилатных транспортеров (MCT1 и MCT4). В работе [226] доказано, что повышение экспрессии монокарбоксилатных транспортеров можно рассматривать, как компенсаторный и адаптивный механизм при гипоксических воздействиях. При этом изменения экспрессии белков семейства MCT носят тканеспецифичный характер.

Интересные результаты обнаружены в исследовании [445]. Авторы убедительно показали, что астроциты подвергшиеся гипоксически-ишемическому воздействию способны активироваться и приобретают устойчивость к дальнейшему гипоксическому воздействию в результате увеличения экспрессии MCT1. Таким образом, увеличение количества

МСТ1+-астроцитов можно рассматривать, как один из механизмов компенсации повреждающего воздействия.

Количество клеток (астроциты и эндотелиальные клетки), экспрессирующих транспортер лактата МСТ4 у животных опытной группы увеличилось практически сразу (подгруппа Р7), но к 28 суткам значительно уменьшилось за счет клеток астроглиального происхождения по сравнению с группой контроля, в которой в процессе онтогенеза зафиксировано увеличение МСТ4-иммунопозитивных клеток.

Обнаруженные данные, с учетом изменения количества клеток, экспрессирующих ЕААТ2, которое сразу после гипоксически-ишемического воздействия снизилось, а к 28 суткам жизни животных значительно увеличилось, можно объяснить функциональной ролью указанных транспортеров.

Действительно имеются сведения, что МСТ4 может непосредственно модулировать транспортеры класса ЕААТ1 в астроцитах. При этом оба класса транспортных белков действуют синергично и обладают нейропротекторным эффектом при гипоксических воздействиях.

Так авторы показали, что гипоксия вызывает повышенную гибель клеток в монокультурах нейронов при увеличении экспрессии МСТ4 и ЕААТ. Однако в нейрон-астроцитарных сокультурах, а также в монокультуре астроцитов при повышении экспрессии МСТ4 и ЕААТ клеточная гибель была значительно ниже [379, 380].

Кроме этого имеются сведения, что МСТ4 способствует уменьшению концентрации глутамата в ткани головного мозга (опосредованно через усиление экспрессии транспортеров глутамата (ЕААТ)), внутриклеточной концентрации лактата и снижает выраженность апоптоза нейронов. При этом более низкие значения количества МСТ+ клеток обнаружены в эпилептогенных очагах, по сравнению со здоровыми [143, 485].

Эти результаты показывают, что повышение количества МСТ4-иммунопозитивных и ЕААТ-иммунопозитивных клеток в НВЕ может

повышать устойчивость к гипоксическому поражению и носить защитный характер. Уменьшение астроцитов, несущих на своей поверхности МСТ4 может говорить о декомпенсации и нарастании гибели нейронов, либо о полной компенсации перенесенной раннее гипоксии-ишемии.

Интересно, что у животных, находившихся в физиологических условиях в процессе онтогенез в гиппокампе, коре и миндалине увеличивается количество клеток (нейроны и эндотелиальные клетки), экспрессирующих транспортер глюкозы GLUT4.

Указанные изменения не противоречат литературным данным. Наличие GLUT4+-нейронов доказано в области гиппокампа, коры головного мозга и миндалины [327]. В работе [164] показано, что экспрессия мРНК GLUT4 постепенно увеличивается с момента рождения до 28 суток в 5 раз, в том числе и за счет GLUT4-иммунопозитивных нейронов.

При этом транспортерам GLUT4 отводится важная роль в реализации "гиппокамп-зависимого обучения" и процессах формирования памяти. Также повышение экспрессии GLUT4 в области гиппокампа наблюдается при активации нейронов [313]. Глутамат обеспечивает энергией работу синапсов [273].

После перенесенной гипоксии-ишемии практически сразу увеличивается количество эндотелиальных клеток, экспрессирующих GLUT4 в области гиппокампа и миндалине и остается высоким до 28 суток жизни, значительно превышая показатели в группе контроля. Что касается GLUT4-иммунопозитивных нейронов, то их количество у животных, перенесших гипоксически-ишемическое воздействие, в области гиппокампа и миндалины уменьшается к 28 суткам жизни.

Обнаруженные динамические изменения свидетельствуют о нарушениях межклеточных взаимодействий и метаболического сопряжении клеток НВЕ. То есть одновременно с увеличением числа эндотелиальных клеток, несущих на своей поверхности GLUT4, уменьшается количество GLUT4+-нейронов.

В настоящее время точно установлено, что уменьшение экспрессии GLUT4 приводит к уменьшению электрической активности клеток при гипоксии [95]. Одновременно с этим повышение экспрессии GLUT4 отмечается в области репарации нервной ткани, а отсутствие повышения экспрессии является неблагоприятным прогностическим признаком [272, 335].

В исследованиях, посвященных изучению влияния хронической гипоксии, установлено, что повышение GLUT4 в клетках миокарда, скелетной мускулатуры является адаптивным механизмом - повышается активность клеток, уменьшается их гибель и возрастает устойчивость к гипоксическому воздействию [99]. Однако имеются данные, что острая гипоксия вызывает снижение экспрессии GLUT4 в скелетной мускулатуре [225].

Экспрессия GLUT4 в клетках эндотелия определяет особенности транспорта глюкозы через ГЭБ и биодоступность глюкозы для реакций гликолиза. С учетом данных о том, что неонатальный мозг преимущественно утилизирует лактат, что впоследствии сменяется использованием глюкозы в качестве доминирующего энергетического субстрата, мы сравнили особенности экспрессии транспортеров глюкозы и лактата в клетках церебрального эндотелия на разных этапах онтогенеза.

Мы установили, что гипоксическое повреждение и стресс раннего периода жизни вызывают увеличение экспрессии MCT4 в астроцитах в период P7-P28 в гиппокампе и коре головного мозга, хотя в физиологических условиях экспрессия этого транспортера увеличивается в период с P7 до P70, закономерно отражая возрастающую способность астроглиальных клеток к утилизации глюкозы и транспорту лактата.

Так как экспрессия GLUT4 клетками эндотелия определяет особенности транспорта глюкозы через ГЭБ, а нейронами - биодоступность глюкозы для реакций гликолиза, то обнаруженные в ходе работы особенности экспрессии изучаемого транспортера глюкозы в опытной

группе, могут объяснить развивающийся отсроченный неврологический дефицит после перенесенного гипоксически-ишемического повреждения ЦНС.

Учитывая, что сходная динамика изменений зарегистрирована при анализе экспрессии МСТ1 в клетках астроглиальной природы в гиппокампе и коре головного мозга, то можно предположить, что у астроцитов возрастает способность к утилизации глюкозы и транспорту лактата.

В целом это отражает изменения метаболического сопряжения в клетках НВЕ и механизм энергетического обеспечения клеток, в первую очередь нейронов, у которых в процессе онтогенеза (в физиологических условиях) увеличивается потребность в глюкозе.

Учитывая, что у животных контрольной группы уровень концентрации лактата в клетках гиппокампа оказался максимальным к 28 суткам постнатального развития, а после перенесенного гипоксически-ишемического повреждения концентрация лактата в клетках гиппокампа и миндалины уменьшилась и абсолютно соответствует динамике экспрессии МСТ4 клетками астроглии, можно говорить об изменении метаболического сопряжения в клетках НВЕ.

Известно, что лактат достаточно активно используется клетками головного мозга в качестве энергетического субстрата. При этом сразу после повышения активности клеток головного мозга, скорость гликолиза превышает скорость окисления, что приводит к чистой продукции лактата, в том числе и в физиологических условиях. При этом лактат используется клетками головного мозга как источник энергии, а также для формирования миелина. При этом транспортеры лактата регулируют поступление лактата в клетки (МСТ1) или выведение его из клеток (МСТ4). В дальнейшем, в физиологических условиях, усиливается аэробное окисление и эффекты гликолиза не оказывают негативного влияния [143].

С учетом недавних данных о роли коннексинов в высвобождении лактата из активированных астроцитов, полученные нами данные

свидетельствуют о возможной вовлеченности Sx43-опосредованного транспорта лактата в клетках НВЕ при перинатальном повреждении головного мозга.

Таким образом, гипоксически-ишемическое повреждение головного мозга ассоциировано с сохранением высокой экспрессии транспортеров лактата, что, однако, не препятствует физиологическому нарастанию транспорта глюкозы. Логично предположить, что одним из механизмов адаптации клеток нейроваскулярной единицы является обеспечение сочетанного использования лактата и глюкозы в качестве энергетических субстратов в неонатальном периоде.

Действительно, уровень лактата в клетках гиппокампа максимален к 28 суткам постнатального развития. При гипоксии и стрессе раннего периода жизни уровень лактата в гиппокампе снижается в период с 7 до 28 суток постнатального развития, а затем увеличивается после стресса раннего периода жизни, что абсолютно соответствует динамике экспрессии MCT4 клетками астроглии. Аналогичная тенденция зарегистрирована в клетках миндалина головного мозга.

Можно сказать, что миндалина 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. Насколько это соответствует повреждению структурно-функциональной целостности ГЭБ в развивающемся мозге?

В контексте ответа на этот вопрос нами выявлены ключевые изменения, маркирующие нарушение целостности ГЭБ в развивающемся головном мозге в (пато)физиологических условиях. В физиологических условиях количество клеток церебрального эндотелия, экспрессирующих

белки тесных контактов, достаточно высоко и постепенно увеличивается от P7 к P28. После перенесенного перинатального гипоксически-ишемического повреждения головного мозга нарушается формирование тесных контактов между клетками церебрального эндотелия (дисбаланс в экспрессии белков плотных контактов и адапторных белков).

Так, после перенесенного гипоксически-ишемического воздействия у экспериментальных животных произошло парадоксальное увеличение белка CLDN5 по сравнению с группой контроля, которое описывается некоторыми авторами. Указанные изменения наблюдались во всех возрастных группах животных.

Однако указанные изменения могут быть связаны с тем, что при выраженном повреждении в цитоплазму эндотелиоцитов освобождаются молекулы CLDN5, которые регистрируются при иммуногистохимическом исследовании. Одновременно с этим локализация CLDN5 в клеточной мембране уменьшается, т.е. происходит диссоциация белков с мембраной клеток [292]. Указанная диссоциация может быть связана с действием металлопротеиназ класса ADAM, активность которых увеличивается при гипоксически-ишемическом воздействии [100].

Действительно, о развитии диссоциации белков плотных контактов говорит наличие дисбаланса в экспрессии белков CLDN5 и ZO1. Так в острый период произошло увеличение количества ZO1+-эндотелиальных клеток, которое к 28 суткам постнатального развития животных сменилось статистически значимым уменьшением ZO1-иммунопозитивных клеток в области гиппокампа и коры головного мозга, что не противоречит последним исследованиям [293].

Имеются результаты исследований, которые объясняют возможность увеличения количества эндотелиальных клеток с повышенной экспрессией белков плотных контактов [302]. Авторы приводят доказательства того, что активированные гипоксией-ишемией астроциты активируют и повышают пролиферативную активность эндотелиоцитов. Несмотря на увеличение

числа эндотелиоцитов они остаются слабо интегрированными, а диссоциация экспрессии белков плотных контактов и адапторных белков приводит к структурным нарушениям связей между клетками.

Еще одним объяснением найденных результатов, может быть теория о том, что у экспериментальных животных выраженность морфологических нарушений плотных контактов не всегда напрямую ассоциирована с количеством белков плотных контактов, т.е. функциональная активность отдельных плотных белков и их связь между собой имеет большее значение, чем их количество [543].

Что касается изменений экспрессии JAM, то можно сказать, что увеличение количества JAM⁺-эндотелиоцитов произошло только в области гиппокампа и миндалина в подгруппе P28 после перенесенного гипоксически-ишемического повреждения. Наряду с этим есть информация, что JAM является белком, отражающей активность ангиогенеза, а не только плотность межклеточных контактов [113, 234]. Таким образом, найденные изменения могут носить компенсаторный характер и отражать активный ангиогенез в области гиппокампа и миндалина.

Выявленные в ходе исследования особенности экспрессии белков плотных контактов достаточно четко согласуются с особенностями изменения проницаемости ГЭБ, происходящими в первые часы (подгруппа P7) после перенесенного перинатального гипоксически-ишемического повреждения ЦНС и частичным восстановлением к 17 суткам жизни (подгруппа P17).

Через 8 часов после воздействия гипоксии-ишемии наблюдается двухкратное превышение содержания красителя Evans blue в головном мозге животных опытной группы. При этом основными регионами мозга, в которых наблюдается пятикратное увеличение содержания красителя Evans blue, являются гиппокамп и миндалина. Через 7 суток после перенесенного гипоксически-ишемического повреждения зафиксирована нормализация проницаемости ГЭБ в области миндалина с сохранением патологически

повышенной проницаемости для красителя Evans blue в области гиппокампа. Обнаруженные особенности проницаемости ГЭБ подтверждают теорию о том, что гиппокамп и миндалина являются отделами мозга, демонстрирующими высокую степень чувствительности к действию гипоксии-ишемии.

Результаты, не противоречащие нашему исследованию, продемонстрированы в работе, посвященной изучению особенностей проницаемости ГЭБ при ишемическом поражении ЦНС. Авторы доказали, что проницаемость для Evans blue повышается тотально в ткани головного мозга в обоих полушариях, несмотря на одностороннее поражение. При этом со стороны поражения повышение проницаемости было более выраженным [181].

Кроме этого появились работы доказывающие, что проникновение Evans blue в ткань головного мозга не всегда связаны с повреждением плотных контактов или нарушениями экспрессии белков плотных контактов [149].

Имеются данные о повышении проницаемости ГЭБ при патологических воздействиях, в первую очередь, именно в области гиппокампа [148], миндалевидного тела, и паравентрикулярных ядрах гипоталамуса [462].

Еще одним механизмом восстановления и управления проницаемостью ГЭБ, является система активного транспорта – эффлюксных, АТФ-зависимых белков, например, Р-гликопротеина.

При перинатальном гипоксически-ишемическом поражении на всех клетках НВЕ *in vivo* происходит увеличение экспрессии Р-гликопротеина. Клетками, которые реагируют первыми, являются астроциты. Через 8 часов их количество максимальное - $17,1 \pm 3,5\%$ и в дальнейшем происходит медленное снижение числа Рgp-позитивных астроцитов.

Повышение экспрессии Рgp на эндотелиоцитах и нейронах идет медленнее, но более выражено по сравнению с астроцитами. Максимальные

показатели экспрессии Pgp наблюдается через 72 часа после гипоксии-ишемии (Pgp-позитивные нейроны - $18,0 \pm 5,5\%$, Pgp-позитивные эндотелиоциты - $20,8 \pm 1,7\%$). При этом эндотелиоциты являются клетками с самым длительным повышением экспрессии белка лекарственной устойчивости. На 21 сутки после гипоксически ишемического поражения (P28) количество Pgp-позитивных клеток в 5 раз выше контрольных показателей и больше, чем нейронов и астроцитов. В клеточной модели НВЕ *in vitro* происходят однотипные, с вышеуказанными, изменения экспрессии Pgp.

Таким образом, результаты исследования подтверждают факт, что клетками, на которых экспрессия Pgp максимальна, являются эндотелиоциты. При этом в условиях гипоксии происходит увеличение уровня Р-гликопротеина на всех клетках НВЕ.

Биологический смысл увеличения Pgp лежит в его роли. Р-гликопротеин является защитным транспортером, который ограничивает проникновение из крови в ткань мозга, а также выводит из цитоплазмы клеток различные химические вещества. При этом ряд авторов указывает, что субстратами этого транспортера является, примерно, половина всех лекарственных веществ, вследствие чего, развивается лекарственная резистентность [173, 372].

Таким образом, локализация белка Р-гликопротеина на клетках нейроваскулярной единицы имеет важное значение в обеспечении биодоступности различных веществ для клеток головного мозга.

Увеличение экспрессии Pgp, характерное для перинатального гипоксически-ишемического поражения, может обладать защитным эффектом. Такое протективное действие реализуется через защиту клеток нейроваскулярной единицы от избыточного содержания метаболитов, которые появляются внутри клеток. Кроме этого, Pgp ограничивает проникновение различных ксенобиотиков в ткань головного мозга (рисунок 21).

Представлены доказательства участия Р-гликопротеина при развитии гидроцефалии, вазогенного отека головного мозга у крыс в возрасте 1-60 суток жизни. С использованием модели гидроцефалии на животных было представлено, что у крыс с гидроцефалией наблюдается уменьшение экспрессии и активности Р-гликопротеина, по сравнению с интактными животными, где активность и экспрессия Pgp не изменены [88, 501], усиление отека головного мозга, а также развитие гидроцефалии наблюдалось у животных нокаутных по гену *mdr1* (кодирует Р-гликопротеин).

Одним из существующих механизмов усиления экспрессии Pgp при патологии ЦНС заключается в регуляторном действии субтоксических доз глутамата. В случае увеличения содержания глутамата через 8 часов происходит усиление экспрессии гена *mdr1*, кодирующего Pgp, а также активности Р-гликопротеина. Такой эффект сохраняется до 24 часов. Это связывают с действием глутамата через NMDA рецепторы и образованием субтоксических концентраций активных форм кислорода в клетках, что и вызывает усиление экспрессии *mdr1*, Pgp и их активности, что приводит к понижению проницаемости ГЭБ [562]. Однако при продолжающемся патологическом воздействии и дальнейшем увеличении концентрации глутамата, наблюдается усиление проницаемости [403, 447].

Таким образом, роль Р-гликопротеина более широка, чем принято считать. Она не ограничивается реализацией феномена лекарственной устойчивости, экструзией ксенобиотиков и метаболитов. Pgp является активным участником ограничения отека головного мозга. Его отсутствие, как и сниженная биологическая активность, вызывают усиление вазогенного эффекта, образование кист и развитие гидроцефалии.

Вследствие гипоксически-ишемического поражения ЦНС физиологическая проницаемость ГЭБ нарушается и наблюдается патологическая проницаемость. Это связано с изменением просвета и проницаемости капилляров головного мозга, повреждением базальной

пластинки, нарушением плотных контактов, межэндотелиальных связей и щелевых контактов, гиперактивацией протеолитических ферментов и металлопротеиназ, запуском некроза, изменением работы глутамат-транспортных систем [93, 361, 564].

При этом изменения проницаемости носят избирательный характер и могут привести к неэффективности фармакотерапии [138, 139]. Именно вследствие нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера в периферической крови появляются «забарьерные» нейроспецифические белки (NSE, GFAP), попадающие в периферическую кровь при массивном разрушении клеток ЦНС (феномен "прорыва" ГЭБ) [77].

Однако, вместе с нейропротективным эффектом при гипоксически-ишемическом поражении белок лекарственной устойчивости проявляет и негативные влияния, препятствуя проникновению лекарственных веществ из крови в ткань головного мозга в целом и клеткам нейроваскулярной единицы в частности.

То есть одновременно с протективным влиянием при гипоксически-ишемическом поражении центральной нервной системы реализуется механизм отрицательного влияния.

Таким образом, молекула Pgr может рассматриваться как возможная молекула-мишень для управляемой регуляции проницаемости ГЭБ.

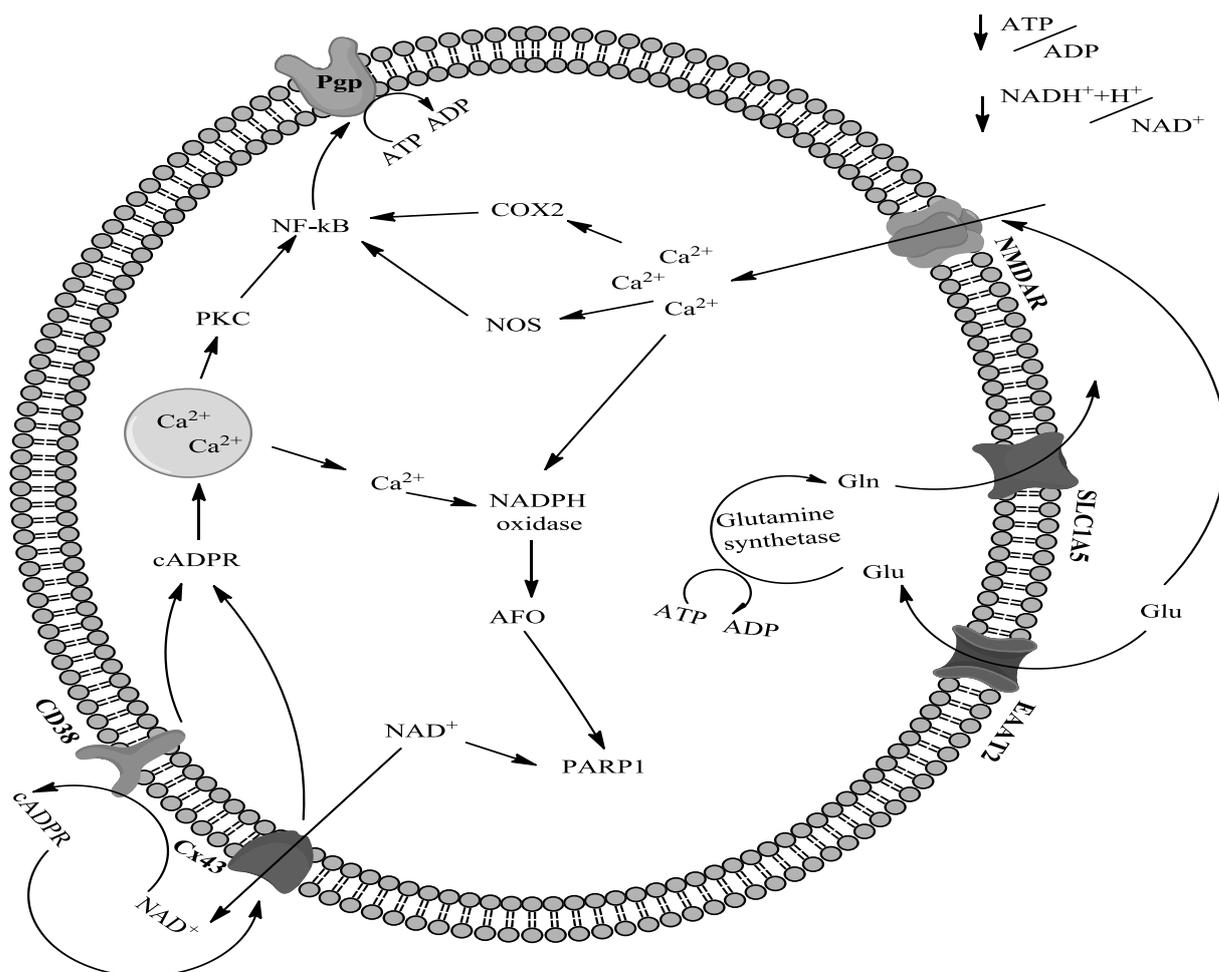


Рисунок 21 – Роль Pgp в патогенезе повреждения НВЕ при гипоксии-ишемии (NOS - NO-синтаза, COX2 – циклооксигеназа 2, Glu - глутамат)

Изменение экспрессии белков, транспортирующих глутамин, при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении *in vivo* носит фазный характер. При этом изменения со стороны транспортера глутамин (SLC1A5) в клеточной модели НВЕ *in vitro* носят однотипный характер с результатами, полученными *in vivo*. В результате воздействия острой гипоксии увеличилось число нейронов и астроцитов экспрессирующих SLC1A5 в пять раз. Но изменения экспрессии транспортеров глутамата астроглиальными клетками в условиях *in vivo* имеют разнонаправленный характер.

Интересным доказательством участия Cx43 в межклеточной коммуникации и энергетическом сопряжении являются результаты, полученные при культивировании клеток в присутствии блокатора щелевых

контактов – карбеноксолона, как при гипоксии, так и в стандартных условиях.

При культивировании клеток в стандартных условиях в присутствии блокатора коннексина-43, одновременно с уменьшением экспрессии коннексина-43 на всех клетках происходит уменьшение числа нейронов экспрессирующих CD38 и SLC1A5; астроцитов, несущих на своей поверхности CD38, SLC1A5 и EAAT2; эндотелиоцитов экспрессирующих CD38.

Объяснить снижение экспрессии CD38 можно тем, что при блокировании Cx43 происходит снижение доступности субстратов (НАД⁺, АТФ), которые доставляются посредством коннексинов к CD38.

Уменьшение CD38 приводит к снижению накопления внутриклеточного кальция, уменьшению потерь клетками НАД⁺, активности NMDA-каналов и уменьшению секреции глутамата нейронами. Снижение концентрации глутамата, приводит к уменьшению количества астроцитов, экспрессирующих глутаматные транспортеры (EAAT2). Результатом уменьшения поступления в астроциты глутамата, который является субстратом для глутамин-синтетазы, ее активность в клетках понижается и происходит уменьшение или полное прекращение биосинтеза глутамина, который в нормальных условиях, посредством транспортеров глутамина (SLC1A5) выводится из астроцитов и поступает в нейроны [343]. В ситуации сниженного синтеза глутамина, а также его секреции клетками астроглии происходит снижение экспрессии транспортеров глутамина (SLC1A5) на астроцитах и нейронах.

В условиях химической гипоксии клеток НВЕ, в присутствии карбеноксолона, одновременно с уменьшением количества всех клеток экспрессирующих Cx43 происходит снижение CD38, Pgp, EAAT2, SLC1A5 на астроцитах, уменьшение транспортера глутамина на нейронах с одновременным увеличением экспрессии Pgp. Число эндотелиоцитов, несущих на своей поверхности Pgp, увеличилось.

Таким образом, при химической гипоксии в присутствии блокатора коннексина-43 число нейронов и эндотелиоцитов, экспрессирующих CD38, не изменилось. В целом результатом блокирования щелевых полуканалов в условиях гипоксии являются изменения, сходные с влиянием карбеноксолона без гипоксии. То есть карбеноксолон блокирует коннексин-43 в физиологических и патологических условиях. В то же время имеются отличия результатов воздействия карбеноксолона на другие изучаемые молекулы, между сокультурами клеток, которые культивировались без карбеноксолона и его присутствии.

То есть при действии карбеноксолона в условиях химической гипоксии происходит более глубокое разобщение Cx43 и CD38, а также значительное уменьшение экспрессии транспортных систем на нейронах (SLC1A5) и астроцитах (Pgp, SLC1A5, EAAT2). При этом разобщение Cx43 и CD38, наряду с уменьшением транспорта глутамина и глутамата могут приобретать не протективный, а дополнительный повреждающий эффект.

Патологическое действие указанных изменений может заключаться в снижении энергетического сопряжения между астроцитами и нейронами, когда при гипоксии, при недостатке кислорода происходит переключение на анаэробный гликолиз с образованием большого количества глутамата. Но при отсутствии транспорта глутамата в астроциты происходит уменьшение синтеза глутамина, который используется нейронами при недостатке кислорода. То есть на фоне гипоксии и нехватки энергетических субстратов, снижается утилизация глутамата как возможного энергетического субстрата [339, 368, 408].

Итак, подавление функциональной активности или уменьшения количества молекул EAAT2 на астроцитах может негативно влиять на размер пораженной области ЦНС при гипоксии-ишемии, а также выраженность клинической симптоматики. При увеличении продолжительности гипоксического воздействия превалирует дополнительное высвобождение глутамата из астроцитов.

В условиях гипоксии и ишемии глутаматные транспортеры могут осуществлять транспорт глутамата в обратном направлении, что приводит к быстрому его накоплению во внеклеточном пространстве, что способствует эксайтотоксичности и усугубляет гипоксическое поражение [120, 195, 196, 307, 308, 371, 411, 477, 499].

Таким образом, регуляция уровней глутамата во внеклеточном пространстве осуществляется транспортерами глутамата и необходима для обеспечения нормального функционирования синапсов и обеспечения нейропротекции путем предотвращения токсичности. При этом транспортеры глутамата являются АТФ-независимыми и их функционирование обеспечивается трансмембранным градиентом ионов натрия и калия [198].

Увеличение экспрессии и активности EAAT2 можно рассматривать как протективный, так и повреждающий механизм. Показано, что увеличение экспрессии EAAT2 зафиксировано при астроглиозе в белом веществе в зонах перивентрикулярного отека и очагах некроза [276].

Установлено, что нокаутные по EAAT2 животные являются более чувствительными к гибели нейронов, и у них зафиксирована более высокая внеклеточная концентрация глутамата при пятиминутной гипоксии, по сравнению с животными дикого типа, однако при увеличении времени патологического воздействия до 20 минут зафиксирована более выраженная гибель нейронов и возрастание уровней глутамата именно у животных дикого типа по сравнению с нокаутными [376].

Также есть работы, указывающие на то, что в физиологических условиях, экспрессия EAAT2 фиксируется только после рождения при астроглиозе, что может быть связано именно с протективным механизмом [130, 254, 471]. При том астроглиоз может развиваться в ответ на самые разные повреждающие воздействия: черепно-мозговая травма, вирусные и прионные заболевания, токсические влияния, гипоксия-ишемия [203, 253, 274, 283, 539].

Таким образом, можно сделать предположение, что астроглиоз и увеличение экспрессии EAAT2 носят защитный характер, по крайней мере, на начальных этапах повреждения, что проявляется в уменьшении накопления внеклеточного глутамата, в том числе за счет активации глутамин-синтетазы и повышении синтеза глутамина в астроцитах, который является субстратом для нейронов условиях гипоксии-ишемии. Однако в условиях продолжающейся гипоксии-ишемии или иного повреждения повышенная экспрессия EAAT2 вызывает дополнительные повреждения.

Зарегистрированные нами изменения транспортера глутамина - SLC1A5 - можно объяснить тем, что метаболическое сопряжение между клетками НВЕ осуществляется и посредством глутамат-глутаминового цикла. В ходе глутамат-глутаминового цикла происходит снижение внеклеточной концентрации глутамата и снижается риск развития эксайтотоксичности. Посредством EAAT2 глутамат из синаптической щели проникает в астроциты, где посредством глутамин-синтетазы превращается в глутамин, а глутамин, в свою очередь, высвобождается из астроцитов и поступает в нейроны за счет активности транспортера SLC1A5.

В нейронах глутамин метаболизируется до глутамата, который хранится в везикулах до последующего освобождения. Таким образом, транспортер глутамина играет важную роль в двух точках действия в этом цикле: выведение глутамина из астроцитов и обеспечение проникновения его в нейроны [157, 362]. Учитывая такое сопряжение между глутамином и глутаматом, становятся объяснимыми зарегистрированные нами изменения экспрессии EAAT2 и SLC1A5.

Интересно, что недавно [497] было показано, что избыточная экспрессия транспортера глутамина (SLC1A5) обеспечивает выживаемость, пролиферацию и устойчивость опухолевых клеток при онкологических заболеваниях, а также быстропролиферирующих тканях [362].

По аналогии с этим можно выдвинуть предположение, что доля астроцитов, которые увеличивают экспрессию транспортера глутамина,

представляет собой пул активированных клеток-предшественников при вызванной гипоксии активации процессов нейрогенеза, и измененный характер межклеточного обмена глутамина и глутамата может быть необходим для обеспечения пролиферации клеток.

В начальной стадии гипоксически-ишемического поражения астроциты оказывают защитное действие на нейроны, длительное гипоксически-ишемическое повреждение способствует дополнительному повреждению и гибели нейронов, но при этом устойчивость астроцитов возрастает [486].

Основные изменения изучаемых параметров, которые происходят вследствие влияния гипоксически-ишемического воздействия в условиях *in vivo* и *in vitro*, представлены в сводных таблицах 5.1-5.3.

Таблица 5.1 – Направленность изменений экспрессии целевых молекул у экспериментальных животных с гипоксически-ишемическим повреждением головного мозга *in vivo*: регион-специфические изменения

Область головного мозга	Целевая молекула	Постнатальный возраст	
		P7	P28
Гиппокамп	JAM	→	↑
	ZO1	↑	↓
	CLDN5	↑	↑
	PCNA	→	→
	GFAP+/MCT1+	→	↑
	CD31+/MCT1+	↑	↓
	GFAP+/MCT4+	↑	↓
	CD31+/MCT4+	↑	↓
	NSE+/GLUT4+	→	↓
CD31+/GLUT4+	↑	→	
Миндалевидное тело	JAM	↑	→
	ZO1	↑	↓
	CLDN5	↑	↑
	PCNA	↑	↓
	GFAP+/MCT1+	↓	↑
	CD31+/MCT1+	→	↑
	GFAP+/MCT4+	↑	↓

	CD31+/MCT4+	→	↓
	NSE+/GLUT4+	→	↓
	CD31+/GLUT4+	↑	→
Кора	JAM	→	→
	ZO1	↑	↓
	CLDN5	↑	↑
	PCNA	↑	↓
	GFAP+/MCT1+	↑	↓
	CD31+/MCT1+	→	↑
	GFAP+/MCT4+	↑	↓
	CD31+/MCT4+	→	↑
	NSE+/GLUT4+	→	→
	CD31+/GLUT4+	→	→

Примечания: ↑ - статистически значимое увеличение экспрессии; ↓ - статистически значимое уменьшение экспрессии; → отсутствие изменений.

Таблица 5.1 – Направленность изменений экспрессии целевых молекул у экспериментальных животных с гипоксически-ишемическим повреждением головного мозга *in vivo*: особенности экспрессии в клетках различной природы (продолжение).

Вид клетки	Исследуемая молекула	Постнатальный возраст				
		P7	P7	P10	P17	P28
Астроциты	GFAP+ клетки	→	↑	→	→	↓
	CD38+	↑	→	→	→	→
	Pgp+	↑	→	→	→	↓
	SLC1A5+	→	↑	↑	→	↓
	EAAT2+	↓	→	↑	→	↓
	Cx43+	→	→	↑	→	→
	Cx43+/CD38+	→	→	→	→	→
Нейроны	Pgp+	↑	↑	↑	↓	→
	SLC1A5+	→	↑	→	→	↓
Эндотелиоциты	Pgp+	↑	↑	→	→	→

Примечания: ↑ - статистически значимое увеличение экспрессии; ↓ - статистически значимое уменьшение экспрессии; → отсутствие изменений.

Проанализировав полученную информацию, мы обнаружили регион-специфический характер изменений состояния ГЭБ, которые развиваются при гипоксически-ишемическом повреждении. Наиболее выраженные изменения экспрессии изучаемых молекул представлены на рисунке 22.

Максимальной чувствительностью из исследуемых регионов к действию повреждающих факторов гипоксической природы обладает гиппокамп и миндалина. Именно эти области головного мозга демонстрируют высокую степень чувствительности к действию факторов, нарушающих процессы барьерогенеза и репарации в отсроченные сроки (P28), что может объяснить развитие отсроченных неврологических нарушений.

Таблица 5.2 – Основные изменения экспрессии целевых молекул клетками НВЕ при гипоксическом воздействии *in vitro*.

Изучаемая молекула	Вид клетки		
	Нейроны	Астроциты	Эндотелиоциты
CD38	↓	↑	→
Cx43	→	↑	→
Pgp	↑	↑	↑
SLC1A5	↑	↑	→
EAAT2	↑	↓	→
CD38 (подавление функции коннексина)	↓	→	→
Cx43 (подавление функции коннексина)	↓	↓	↓
Pgp (подавление функции коннексина)	↑	↑	↑
SLC1A5 (подавление функции коннексина)	↑	→	→
EAAT2 (подавление функции коннексина)	→	→	→
MCT1	не экспрессируют	↑	↑
MCT4	не экспрессируют	↑	↑
JAM	не экспрессируют	не экспрессируют	↓
ZO1	не экспрессируют	не экспрессируют	↓
CLDN5	не экспрессируют	не экспрессируют	↓

Примечания: ↑ - статистически значимое увеличение экспрессии по сравнению с контрольной группой; ↓ - статистически значимое уменьшение экспрессии по сравнению с контрольной группой; → отсутствие изменений по сравнению с контрольной группой.

Таблица 5.3 – Основные изменения изучаемых параметров при моделировании гипоксии с использованием модели НВЕ/ГЭБ *in vitro*.

Изучаемый параметр	Изменение
Трансэндотелиальное электрическое сопротивление	↓
Пролиферативная активность клеток НВЕ <i>in vitro</i>	↓
Пролиферативная активность при блокировании МСТ1, МСТ4	↑
Концентрация лактата	↓
Концентрация глутамата	↑

Примечания: ↑ - статистически значимое увеличение по сравнению с контрольной группой; ↓ - статистически значимое уменьшение по сравнению с контрольной группой.

Схема межклеточных взаимодействий при гипоксии-ишемии при компенсации представлена на рисунке 23.

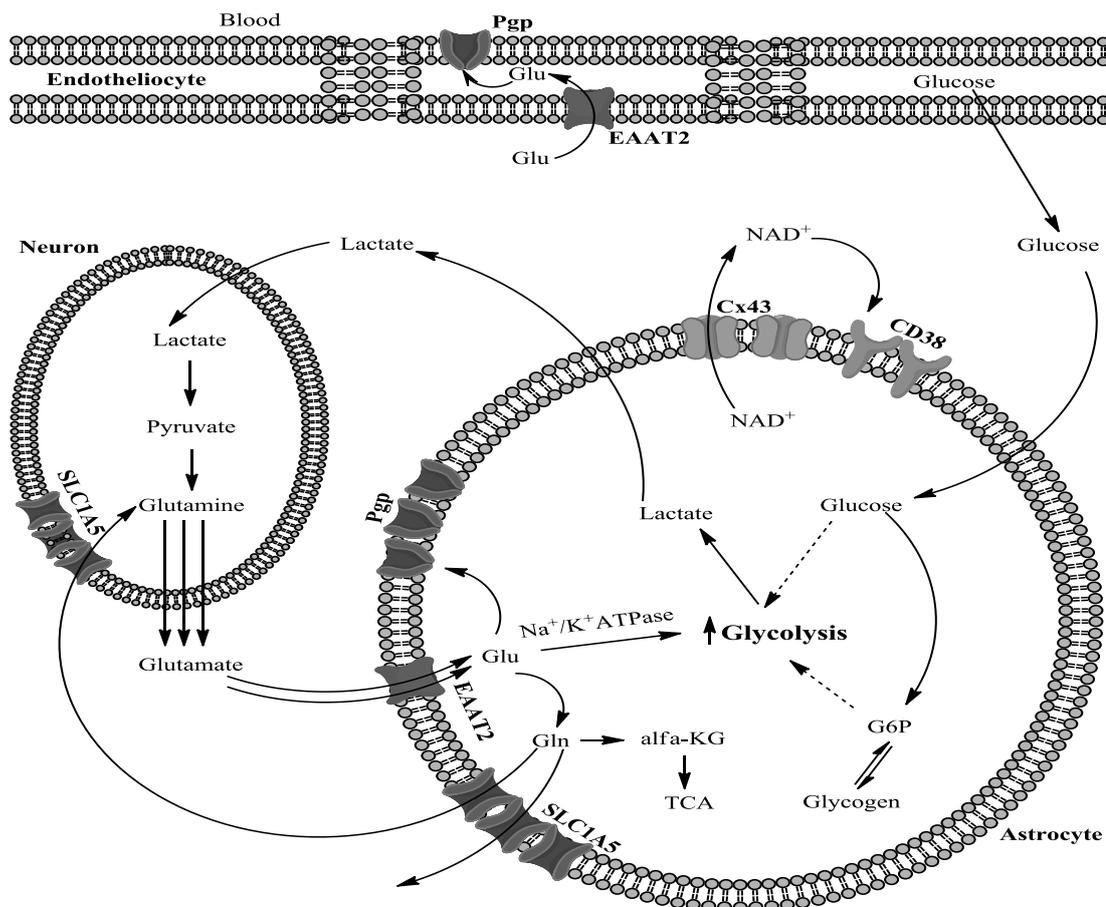


Рисунок 23 – Межклеточные взаимодействия при гипоксии-ишемии при компенсации (alfa-KG – α -кетоглутарат, TCA – цикл трикарбоновых кислот, G6P – глюкоза-6-фосфат, Glu-глутамат, Gln-глутамин)

Это связано не только с глутамат-глутаминовым циклом, но и активацией анаэробного гликолиза, когда в качестве субстрата используется лактат. Поэтому при продолжающемся дефиците кислорода, с течением времени происходит накопление лактата, что приводит к развитию ацидоза и дополнительному повреждению клеток, в первую очередь нейронов. Межклеточная коммуникация и энергетическое сопряжение клеток при декомпенсации представлена на рисунке 24.

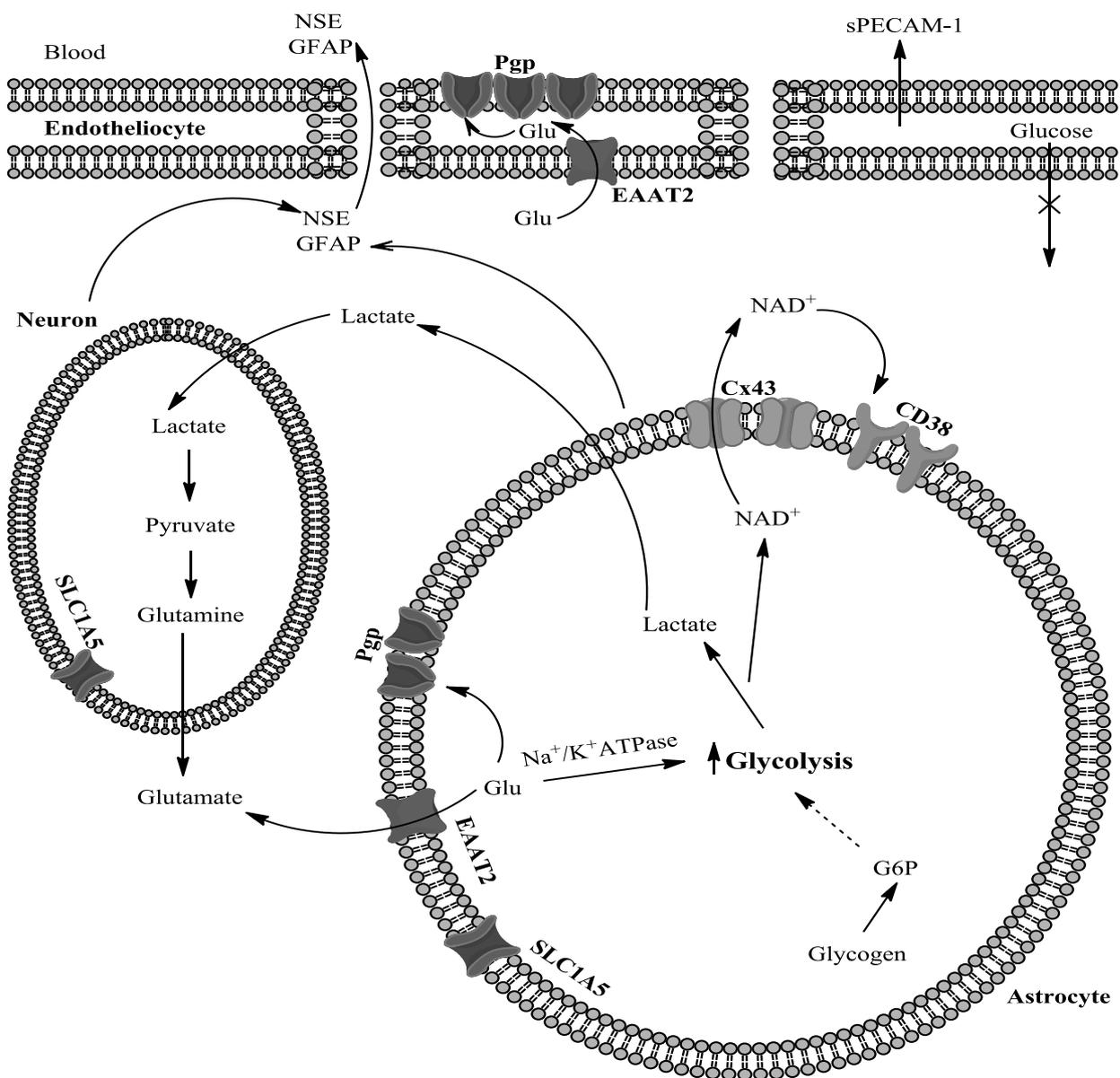


Рисунок 24 – Межклеточные взаимодействия при гипоксии-ишемии при декомпенсации (alpha-KG – α -кетоглутарат, ТСА – цикл трикарбоновых кислот, G6P – глюкоза-6-фосфат, Glu-глутамат, Gln-глутамин)

Учитывая обнаруженные в процессе исследования, 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.

Принимая во внимание особенности функционирования нейроваскулярной единицы, а также результаты настоящего исследования, 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 нейrogenеза. В этом случае происходит увеличение экспрессии молекул CD38 и Cx43 (обеспечивают функциональную активность астроглиального синцития и контроль пуриnergических 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, Pgp. Эндотелиальные клетки изменяют экспрессию Р-гликопротеина и коннексина-43. Указанные скоординированные процессы влияют на степень повреждения и восстановления клеток нейроваскулярной единицы, что находит свое отражение при регистрации изменения содержания в периферической крови или спинномозговой жидкости специфических белков-маркеров.

Также степень выраженности изменений в клетках нейроваскулярной единицы оказывает влияние на характер повреждения ткани мозга и ликвородинамику. При длительном гипоксически-ишемическом воздействии, в результате истощения компенсаторных возможностей происходит гибель нейронов. При этом гибель, некоторой доли нейронов, можно рассматривать, как вынужденную и приспособительную реакцию ЦНС при гипоксическом воздействии, так как у астроглиальных клеток существует возможность трансформации в нейроны или выполнения их функций [116, 123, 398].

При оценке клинико-анамнестических особенностей детей с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС установлено, что наиболее значимыми особенностями биологического анамнеза ребенка, причастными к развитию перинатального поражения мозга являются: анемия матерей во время беременности и хроническая фетоплацентарная недостаточность. При этом и анемия, и ХФПН имеют непосредственное отношение к возникновению внутриутробной гипоксии и являются управляемым состояниями. Из неуправляемых причин, способствующими развитию более тяжелой энцефалопатии, можно выделить угрозу прерывания беременности в первой половине. Результаты нашего исследования не противоречат данным других исследователей и являются ожидаемыми [14, 75].

Принимая во внимание факт того, что главная патогенетическая роль в развитии церебральной ишемии принадлежит хронической и острой гипоксии, то любые состояния, приводящие к гипоксемии и гипоксии, могут спровоцировать или утяжелить церебральную ишемию у ребенка. При этом кратковременные воздействия, вызывающие гипоксию плода могут оказывать нейропротективный эффект, посредством феномена прекондиционирования [19].

Суть феномена прекондиционирования в том, что после кратковременного эпизода гипоксии и/или ишемии происходит активация генетически детерминированных механизмов, направленных на повышение устойчивости клеток к возможному последующему, более выраженному

повреждающему действию неблагоприятных факторов. В целом это приводит к повышению резистентности нейронов и астроцитов к отсроченному повреждающему воздействию гипоксии-ишемии и уменьшению клеточной гибели.

Однако при длительном воздействии происходят патологические изменения, а при истощении компенсаторных механизмов и необратимые изменения. Таким образом, результаты, полученные в нашем исследовании, не противоречат другим работам [59, 81].

Тяжесть клинических и морфологических проявлений напрямую зависит от степени повреждения клеток головного мозга [60, 72]. Ведущими симптомокомплексами в раннем неонатальном периоде у детей со второй и третьей степенью тяжести церебральной ишемии являются: гипотонус, гипорефлексия, нарушение сознания и судороги, изменение размеров ликворопроводящих путей и отек головного мозга, что является следствием повреждения клеток ЦНС. Интересным результатом анализа данных нейросонографического исследования является то, что у пациентов с ЦИ 3 степени зафиксировано увеличение размеров (расширение) боковых и IV желудочков, и сужение субарахноидального пространства, а также преобладание выраженного отека коры и перивентрикулярного пространства. В то же время при более легкой церебральной ишемии преобладали умеренно выраженные отечные изменения коры, подкорковых структур и перивентрикулярных областей.

При динамическом исследовании, на фоне терапии, несмотря на наличие положительной динамики со стороны клинических проявлений у детей с ЦИ 1 и 2 степеней, у пациентов с ЦИ 3 степени сохранялись выраженные клинические и параклинические изменения: гипотонус сменился гипертонусом, сохранилось расширение ликворопроводящих путей, а также увеличилось число новорожденных с выраженными отечными изменениями корковых структур. Все это свидетельствует о

продолжающемся повреждении ЦНС и является фактором риска развития неблагоприятных исходов.

Однако, согласно Н.Н. Володину [17], при ишемическом поражении ЦНС у новорожденных в ранний неонатальный период преобладает сужение основных структур ликворопроводящих путей из-за отека окружающих тканей. В более отдаленные сроки жизни ребенка происходит расширение ликворопроводящих путей за счет атрофических изменений в ткани головного мозга, а степень отека коррелирует с тяжестью перинатального гипоксически-ишемического поражения головного мозга [11, 23, 27].

Таким образом, расширение ликворопроводящих путей - более тяжелая клиническая симптоматика. Выраженный отек головного мозга в ранний неонатальный период, а также отсутствие положительной динамики у пациентов с тяжелым перинатальным гипоксически-ишемическим поражением ЦНС степени могут свидетельствовать о более 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.

Повреждение клеток ЦНС в целом и клеток-компонентов НВЕ в частности, происходящее при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении сопровождается появлением забарьерных белков-маркеров в периферической крови. Регистрацию уровня отдельных белков возможно использовать для диагностики, оценки терапевтических мероприятий, а также прогнозирования исходов различной патологии ЦНС и подтверждения повреждения клеток НВЕ. Однако остается достаточно много спорных моментов при оценке роли изучаемых белков-маркеров при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС [21, 42, 43, 60, 73, 72].

Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о повышении концентрации НСБ и sPESAM-1 при церебральной ишемии 2 и 3 степени, тяжелой клинической симптоматике (арефлексия, гипорефлексия,

судорожный синдром, нарушение сознания), а также нарушении размеров ликворопроводящих путей и 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) указывает на повреждение клеток астроглиальной природы и является неблагоприятным прогностическим маркером. Молекула sPECAM-1 является маркером повреждения и дисфункции эндотелиоцитов.

Таким образом, в раннем неонатальном периоде наибольшая диагностическая значимость при оценке степени тяжести поражения ЦНС принадлежит нейронспецифической енолазе. Данный показатель позволяет решить вопросы дифференциальной диагностики и патогенетической терапии на начальных этапах ведения пациента и отражает гибель нейронов. При продолжающемся патологическом воздействии и тяжелом гипоксическим поражением ЦНС происходит повышение уровня глиального фибриллярного белка, что сопряжено с истощением компенсаторных механизмов, прогрессированием неврологической симптоматики.

Представленная в ходе исследования связь клинических проявлений и метаболических нарушений в ЦНС указывает на то, что астроциты вовлекаются в патологический процесс, преимущественно, при тяжелом поражении и истощении компенсаторных механизмов, что сопровождается астроглиозом и повышенной гибелью нейронов. Есть интересные работы, показывающие, что у животных увеличение экспрессии GFAP ассоциировано с гидроцефалией, а выраженный астроглиоз обнаружен при развитии тяжелой гидроцефалии [373].

В мировой литературе приводятся доказательства ключевой роли глии при развитии повреждения ЦНС после гипоксии-ишемии, инфекций и воспаления. В первую очередь имеются ввиду астроцитарные коннексиновые полуканалы (Cx43), которым принадлежит роль распространения повреждения нейронов и олигодендроцитов. Возможные механизмы, опосредуемые полуканалами Cx43, могут быть реализованы через нарушения обмена кальция и энергетических субстратов, потерю функциональной целостности ГЭБ, что приводит к чрезмерной активации пуринергических рецепторов микроглии и астроцитов и, по сути, вызывает воспаление. Распространение зоны повреждения в ранее не пострадавшие области мозга, в течение недель и месяцев, после перенесенного повреждения является, главной особенностью перинатальной энцефалопатии [269, 432]

У взрослых, при наличии неврологических нарушений и заболеваний ЦНС, установлено одновременное повышение уровня GFAP и A β в головном мозге [190, 306], что может быть связано с тем, что астроциты поглощают A β и транспортируют его в лизосомы. Учитывая роль A β в синаптической пластичности, астроглиоз в данной ситуации можно расценивать как нейропротективное свойство [351]. Таким образом, повышение экспрессии GFAP можно рассматривать как маркер развившегося астроглиоза, отражающего выраженность повреждение ткани головного мозга.

Повышение в периферической крови концентрации sPECAM-1, наблюдается при выраженной неврологической симптоматике, отеке коры и подкорковых структур головного мозга, расширении ликворопроводящих путей, и, в целом, является маркером структурных повреждений НВЕ и повышенной проницаемости ГЭБ. При этом 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.

Ценность определения sPECAM-1 обусловлена тем, что увеличение содержания этого маркера эндотелиальной дисфункции подтверждает структурное повреждение и повышение проницаемости ГЭБ, а также сопряжено с тяжелой неврологической симптоматикой.

Таким образом, в ходе работы установлено, что все три маркера повреждения клеток НВЕ (NSE, GFAP, sPECAM-1) максимально повышаются в ситуациях 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.

Учитывая полученные нами в ходе работы результаты, представляем предполагаемую схему, характеризующую взаимосвязь клинических и экспериментальных данных (рисунок 25).

Выявленные в ходе исследования особенности межклеточных взаимодействий и метаболического сопряжения в пределах НВЕ, характеризуют нарушение структурно-функциональной целостности ГЭБ и могут объяснить развивающиеся клинические проявления ГИП ЦНС.

С клинической точки зрения, нарушение целостности ГЭБ проявляется в виде двигательных нарушений, а также нарушениями рефлекторной и моторно-сенсорной деятельности у животных (P7-P17). Развившиеся неврологические нарушения восстанавливались к 28 суткам постнатального развития (P28). Однако к указанному возрасту, начинали проявляться отдаленные последствия нарушений функционирования ГЭБ/НВЕ. У животных после моделирования ГИП, в 28 суток жизни, отмечается более высокий уровень тревожности, по сравнению с интактными животными, о чем свидетельствуют результаты тестов «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт».

Также формирование неврологической дисфункции после перенесенного в раннем постнатальном периоде повреждения головного мозга, патогенетически сопряжено с нарушениями развития и восстановления ГЭБ/НВЕ. Это можно отметить по процессам «переключения» утилизации лактата клетками головного мозга (до P17) на утилизацию, преимущественно, глюкозы. Это «переключение» подтверждается изменением спектра экспрессии транспортеров лактата и глюкозы в клетках астроглии развивающегося ГЭБ/НВЕ в (пато)физиологических условиях.

В частности, сохраняется высокий уровень экспрессии лактатных транспортеров MCT1, при более низкой экспрессии транспортера глюкозы GLUT4 после перенесенного повреждения (до P28) в отличие от динамики экспрессии этих молекул в клетках ГЭБ/НВЕ при физиологическом развитии.

Одновременно с этим при ГИП ЦНС у экспериментальных животных наблюдается снижение концентрации лактата (энергетического субстрата) в клетках изученных областей головного мозга в ранние сроки (P7) после патологического воздействия. Это можно объяснить резким увеличением экспрессии лактатных транспортеров MCT4, ответственного за выведение лактата из клеток. С другой стороны, повышение MCT4 защищает клетки ЦНС от повреждающего воздействия глутамата, концентрация которого повышается при ГИП ЦНС, что подтверждается результатами, полученными в экспериментах *in vitro* (концентрация глутамата, экспрессия транспортеров глутамата), а также в клинической части эксперимента (концентрация глутамата). То есть, развивающееся на фоне ГИП ЦНС, недостаточное энергетическое обеспечение клеток ГЭБ/НВЕ может быть причастным к развитию неврологических проявлений, в том числе и отсроченных.

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:

1. Гипоксия является триггером активации астроцитов за счет секреции глутамата нейронами, многократного усиления экспрессии коннексина-43 и функционально сопряженной молекулы CD38 на поверхности астроцитов. В совокупности это обеспечивает ускоренный транспорт молекулы НАД⁺ из клеток коннексинами. Во внеклеточном пространстве НАД⁺ становится субстратным лигандом для молекулы CD38. Конверсия НАД⁺ посредством активности НАД⁺-гликогидролазы/CD38 вызывает снижение количества и истощение внутриклеточных запасов этого кофермента и ингибирует гликолиз, который обеспечивает потребности астроцитов в энергии. Понижение концентрации НАД⁺ в клетках астроглии также может способствовать угнетению биоконверсии глутамата в глутамин и альфа-кетоглутарат. Такой же эффект наблюдается при уменьшении захвата глутамата клетками астроглии. В этом случае, обнаруженное нами уменьшение экспрессии транспортера глутамата EAAT2 астроцитарными клетками при одновременном увеличении экспрессии транспортера глутамин SLC1A5 вызывает преобладание потерь глутамин над захватом глутамата. Одновременное повышение экспрессии транспортера глутамин SLC1A5 клетками нейрональной природы, контактирующих с астроцитами в нейроваскулярной единице, вероятнее всего, является отражением стимуляции захвата ГАМК и глутамин, а также биосинтеза глутамата нейронами, подвергшимися гипоксическому воздействию. В совокупности, указанные процессы усугубляют нарушения глутамат-глутаминового обмена между клетками НВЕ. В этой ситуации, зафиксированное нами при гипоксии угнетение экспрессии молекулы CD38 при одновременно измененной экспрессии коннексина-43 в нейронах, вероятнее всего, свидетельствует об уменьшении содержания НАД⁺ во внеклеточном пространстве, что может являться следствием усиления экспрессии CD38 рядом расположенными клетками астроглиальной природы. Принимая во внимание, что в физиологических условиях транспорт глутамата из нейронов в астроциты напрямую сопряжен с повышением концентрации НАДН в астроцитах и

активацией гликолиза, за счет увеличения активности фермента глутаматдегидрогеназы. Глутаматдегидрогеназа – фермент, конвертирующий глутамат в альфа-кетоглутарат НАД⁺-зависимым способом. Нарушение указанного механизма нейрон-астроглиального метаболического сопряжения в условиях гипоксии дополнительно ингибирует гликолитическую продукцию астроцитарной АТФ и усугубляет энергетическую недостаточность. Изменение монокарбоксилатных транспортеров (MCT1 и MCT4) отражает изменение метаболического сопряжения клеток НВЕ вследствие накопления избыточной концентрации лактата и глутамата и, по сути, может являться компенсаторным и адаптивным механизмом. Активация эндотелиоцитов, под влиянием активированной астроглии приводит к увеличению транспортеров глюкозы (GLUT4), что отражает повышение потребности в энергетических субстратах при развившейся гипоксии-ишемии. Однако уменьшение числа GLUT4-иммунопозитивных нейронов, свидетельствует о недостаточной компенсации развивающихся патологических изменений и объясняет развивающийся впоследствии неврологический дефицит.

2. Известно, что высвобождение глиотрансмиттеров из клеток астроглии (глутамат, глутамин, серин, АТФ) регулируется Cx43. Наши данные свидетельствуют об участии Cx43 в высвобождении лактата из активированной астроглии. Обнаруженное нами значительное увеличение экспрессии Cx43 на астроцитах и увеличение экспрессии SLC1A5 на астроцитах и нейронах НВЕ при гипоксии может отражать процесс активации гликолиза в астроцитах в участках повреждения ГЭБ. Таким образом, секреторная активность астроглиальных клеток, входящих в состав НВЕ, определяемая эффективностью секреции во внеклеточное пространство НАД⁺, АТФ, лактата, контролируется активностью коннексиновых (Cx43) транспортных систем и нейрон-астроглиальным метаболическим сопряжением.

Применение фармакологического блокатора активности Sx43 предотвращает нарушения экспрессии CD38, глутаматных и глутаминовых транспортеров в клетках ГЭБ и может способствовать поддержанию структурно-функциональной целостности ГЭБ.

3. Развивающаяся при гипоксически-ишемическом повреждении эндотелиоцитов НВЕ диссоциация белков плотных контактов отражает развитие патологической проницаемости, с другой стороны, является отображением компенсаторной активации ангиогенеза в областях головного мозга максимально подверженных влиянию гипоксически-ишемических воздействий (гиппокамп и миндалина). Усиление экспрессии Р-гликопротеина клетками НВЕ является компенсаторным и ограничивающим проницаемость ГЭБ в направлении «кровь-ткань головного мозга», а также способствует выведению продуктов метаболизма.

Итак, результаты, полученные в ходе настоящего исследования, позволяют сформулировать новые представления о механизмах повреждения клеток центральной нервной системы, которые обусловлены изменениями активности и экспрессии молекул CD38, Sx43, а также транспортных систем глюкозы, глутамата, глутамина, лактата, белков плотных контактов, нарушением метаболизма НАД⁺, а также о вкладе повреждения нейронов и астроцитов в указанные процессы в физиологических условиях и при гипоксически-ишемическом воздействии.

Полученные в ходе работы данные расширяют существующие представления о роли Sx43 в регуляции энергетического сопряжения, которое осуществляется через CD38, транспортеры глюкозы, глутамата, глутамина, лактата, что влияет на возможность выживаемости клеток нейрональной и глиальной природы в незрелом мозге в патологических и физиологических условиях, а также клеточно-молекулярных механизмах повреждения нейронов при ишемии, уточняют возможности терапевтического воздействия на ключевые механизмы межклеточной коммуникации и метаболического сопряжения клеток нейроваскулярной

единицы, могут учитываться при разработке новых протоколов для проведения доклинических исследований нейротропных препаратов, в частности, оценке их способности проникать через ГЭБ, а также при разработке подходов к управлению проницаемостью ГЭБ.

Основные результаты работы, полученные нами в ходе и отражающие клеточно-молекулярные особенности межклеточных взаимодействий в пределах нейроваскулярной единицы в физиологических условиях и при перинатальном гипоксически-ишемическом повреждении головного мозга представлены на рисунках 26 и 27.

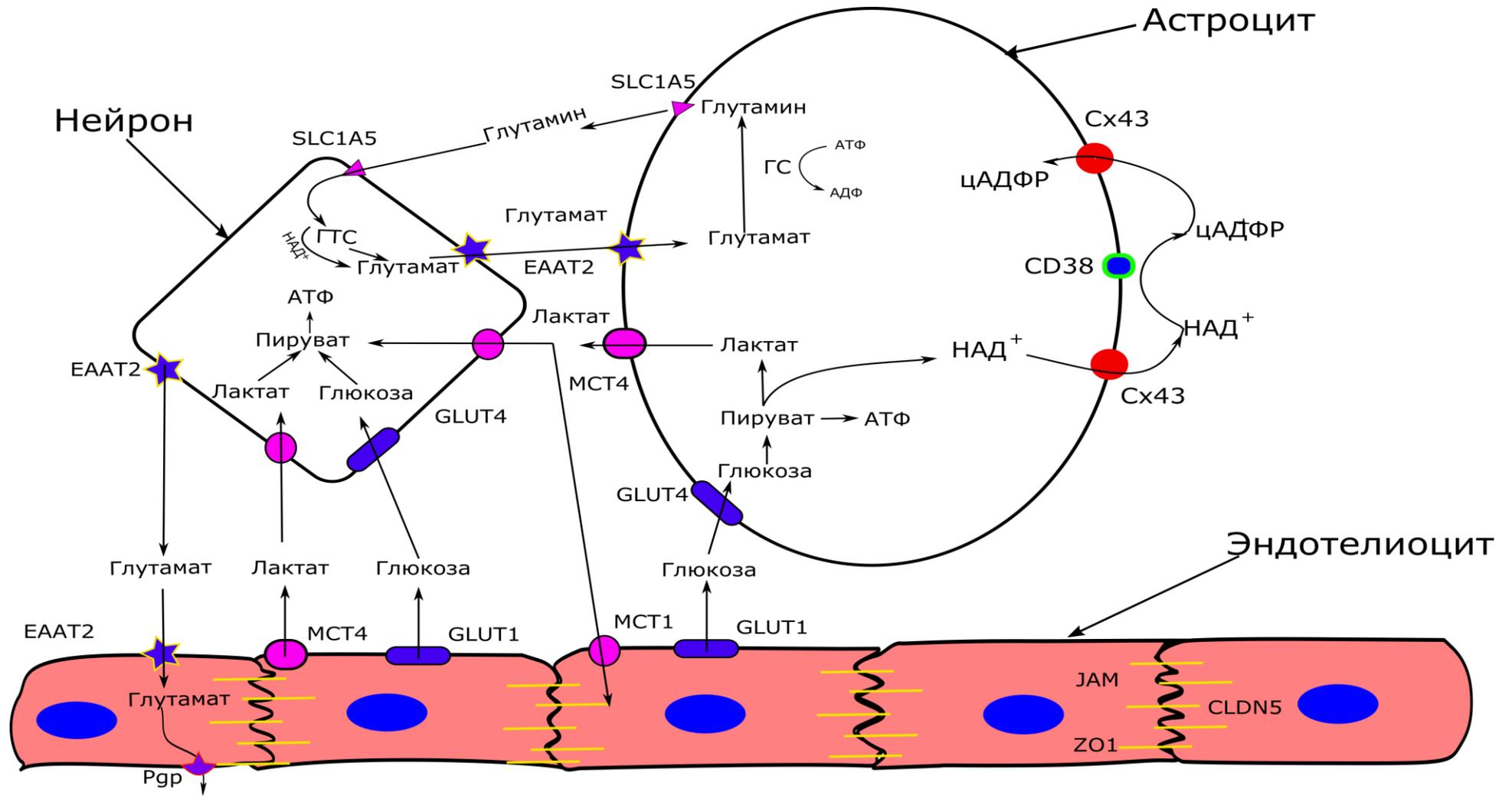


Рисунок 26 – Особенности межклеточных взаимодействий в пределах НВБ в развивающемся постнатальном мозге в физиологических условиях

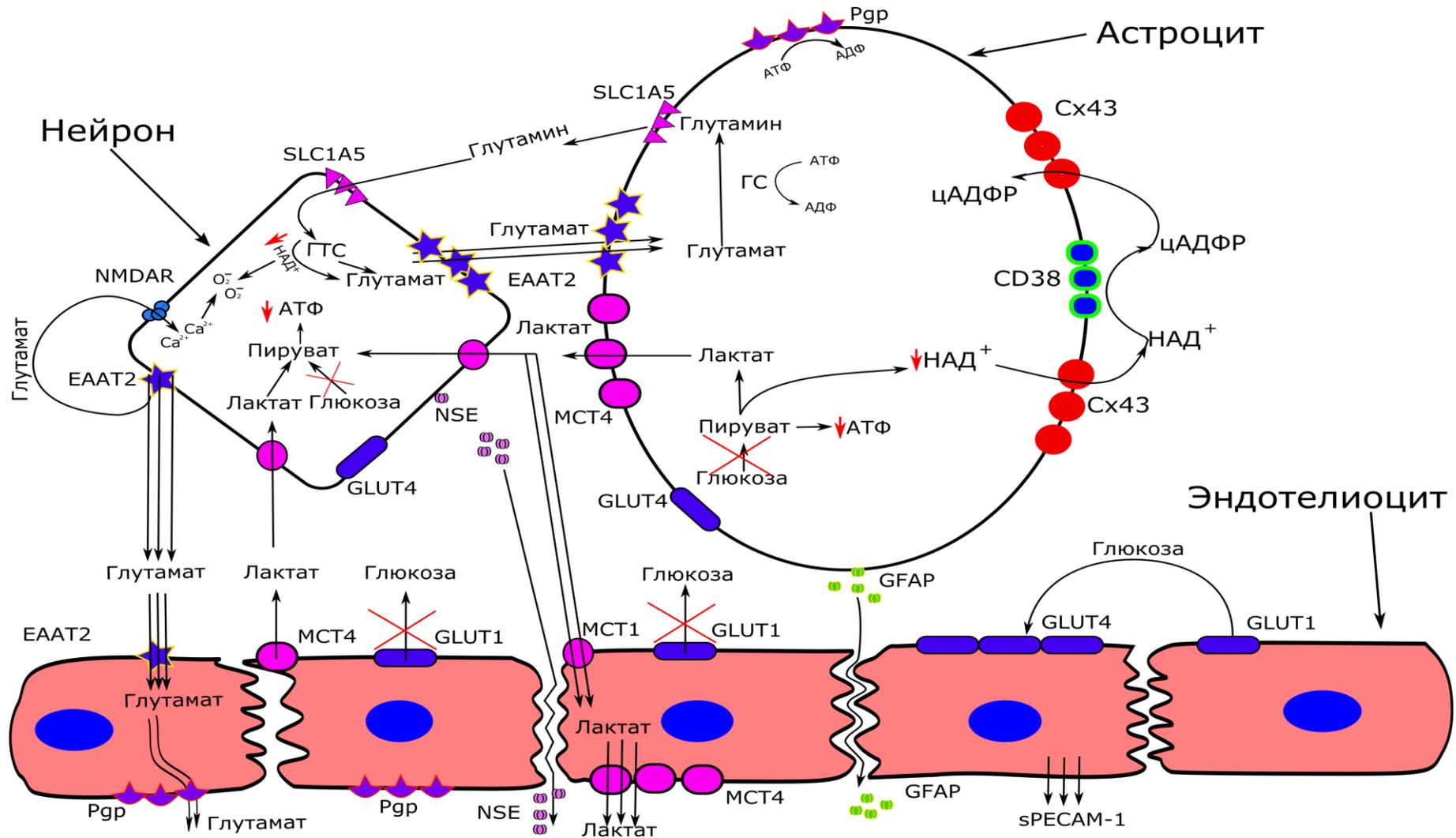


Рисунок 27 – Нарушение межклеточных взаимодействий в пределах НВЕ при гипоксически-ишемическом повреждении развивающегося мозга

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 миндалины; астроциты характеризуются разнонаправленными изменениями экспрессии MCT1 - через 8 часов происходит резкое увеличение количества в коре, со снижением в области миндалины и усилением экспрессии в гиппокампе и коре к 28 суткам жизни, с одновременным увеличением числа MCT4-иммунопозитивных клеток в области гиппокампа, коры и миндалины с последующим уменьшением к 28 суткам жизни; эндотелиоциты реагируют увеличением экспрессии GLUT4 в 1,5-2 раза в области гиппокампа и миндалины 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 Сх43, прогрессивно уменьшается. У экспериментальных животных в течение 72 часов после перенесенного перинатального гипоксически-ишемического повреждения головного мозга происходит изменение экспрессии CD38 и Сх43, 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 миндаины, 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, индуцированным 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 Cx43 и транспортеров глутамата EAAT2 на фоне низкого уровня экспрессии НАД⁺-гликогидролазы/CD38 и транспортера глутамин SLC1A5; пребывание в условиях гипоксии индуцирует в астроцитах НВЕ значительное увеличение экспрессии Cx43, CD38, SLC1A5 в 2-15 раз, но снижение экспрессии EAAT2 в 1,5 раза; нейроны, входящие в состав клеточной модели НВЕ *in vitro*, демонстрируют высокий уровень экспрессии CD38, но низкий уровень экспрессии Cx43 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 Cx43, который практически не меняется при

действии гипоксии *in vitro*; подавление активности Сх43 карбеноксолоном вызывает снижение экспрессии CD38, Сх43, SLC1A5 в нейронах, контактирующих с астроцитами, а также снижение экспрессии CD38, Сх43 и EAAT2 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, Pgp, 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 Sx43 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 сокращений

АДФ / ADP	– аденозиндифосфат;
АТФ / АТР	– аденозинтрифосфат;
АФК	– активная форма кислорода;
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека;
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения;
ВПО	– высшее профессиональное образование;
ГАМК	– гамма-аминомасляная кислота;
ГБОУ	– государственное бюджетное образовательное учреждение;
ГИП	- гипоксически-ишемическое повреждение
ГИЭ	– гипоксически–ишемическая энцефалопатия;
ГТФ	– Гуанозинтрифосфат
ГЭБ	– гематоэнцефалический барьер;
ДЦП	– детский церебральный паралич;
ЕААТ	– excitatory amino acid transporter / транспортер возбуждающих аминокислот
ИВЛ	– искусственная вентиляция легких;
ИЛ	– интерлейкин;
КГБУЗ КККЦОМД	– Красноярское краевое бюджетное учреждение здравоохранения «Красноярский краевой клинический центр охраны материнства и детства»
КрасГМУ	– Красноярский государственный медицинский университет;
мг	– миллиграмм;
МГц	– мегагерц;
мкг	– микрограмм;
мкМ	– микромоль;
мл	– миллилитр;

мм	– миллиметр;
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота;
МСТ	– monocarboxylate transporter / транспортер монокарбоксилатов;
НАД	– никотинамидадениндинуклеотид;
НАДН	– восстановленная форма кофермента никотинамидадениндинуклеотида;
НВЕ	– нейроваскулярная единица;
нг	– нанограмм;
НИИ	– научно–исследовательский институт;
НСБ	– нейроспецифические белки;
НСГ	– нейросонографическое исследование;
ПВО	– перивентрикулярная область;
ПСК	– плюрипотентные стволовые клетки;
Р	– день постнатального развития;
P2X7	– нуклеотидные рецепторы P2X7 подтипа;
РКС	–протеинкиназа С;
РЛДЦ ИХМИ	– региональный лабораторно–диагностический центр иммунохимических методов исследования;
С°	– градус по шкале Цельсия;
СНГ	– Содружество Независимых Государств;
СО ₂	– углекислый газ;
Сх	– connexin / коннексин;
СЭФР	– сосудисто–эндотелиальный фактор роста;
ТСА	– цикл трикарбоновых кислот
ФЗП	– Федеральная целевая программа;
ХФПН	– хроническая фетоплацентарная недостаточность;
ЦИ	– церебральная ишемия;
ЦНС	– центральная нервная система;

ЭЭГ	– электроэнцефалография;
ABC–транспортер	– АТФ–ассоциированный транспортер;
ALCAM	– Activated leukocyte cell adhesion molecule / молекула клеточной адгезии активированных лейкоцитов;
Alfa–KG	– α –кетоглутарат
AMPA	– α –амино–3–гидрокси–5–метил–4–изоксазолпропионовая кислота;
AQP	– aquaporin / аквапорин;
A β	– амилоидный белок;
BCRP	– breast cancer resistance protein / белок резистентности рака груди;
BDNF	– brain–derived neurotrophic factor / нейротрофический фактор мозга;
BMP	– bone morphogenetic protein / костный морфоген;
BSA	– bovine serum albumin / Бычий сывороточный альбумин;
Ca ²⁺	– ионы кальция;
CD	– cluster of differentiation/кластер дифференцировки;
CNTF	– ciliary neurotrophic factor / цилиарный нейротрофический фактор;
COX2	– циклооксигеназа 2;
DMEM	– Dulbecco's Modified Eagle Medium / модифицированная по способу Дульбекко среда Игла;
E	– день имплантации в стенку матки;
FasL	– Fas–лиганд;
FasR	– Fas–рецептор;
FGF	– fibroblast growth factor / фактор роста фибробластов;
FITC	– fluorescein isothiocyanate (флюоресцеинизотиоционат);

G6P	– глюкоза–6–фосфат
GDNF	– glial cell derived neurotrophic factor / глиальный нейротрофический фактор;
GFAP	– glial fibrillary acidic protein/глиальный фибриллярный кислый белок;
GLAST	glutamate and aspartate transporter / транспортер глутамата и аспартата;
Gln	– глутамин;
Glu	– глутамат;
GLUT	– glucose transporter / транспортер глюкозы;
GP8	–
GS	– glutamine synthase / глутамин–синтаза
hCMEC	– human brain capillary endothelial cell / эндотелиоциты капилляров человеческого мозга
HIF	– hypoxia inducible factor / гипоксия индуцибельный фактор;
HUVEC	– пуповинные эндотелиальные клетки человека
ICAM	– intercellular adhesion molecule / молекула межклеточной адгезии;
IGF	– insulin–like growth factor / инсулиноподобный фактор роста
LIF	– leukemia inhibitory factor / лейкемия–ингибирующий фактор;
MDCK	– Madin Darby canine kidney / культура клеток почки собаки
MMP	– matrix metalloproteinase / матричные металлопротеиназы;
NF–κB	– nuclear factor kappa–light–chain–enhancer of activated B cells / ядерный фактор «каппа–би»;

NLRP	– Nod-like-receptor / Nod подобный рецептор;
NMDA	– N-methyl-D-aspartic acid/ N-метил-D-аспартат;
NMNAT	– никотинамидмононуклеотидаденилилтрансфераза
nNOS	– нейрональная NO-синтаза;
NO	– оксид азота;
NOS	– синтаза оксида азота;
NSE	– neuron specific enolase/нейрон-специфическая енолаза;
NSS	– Neurological Severity Score / шкала оценки степени неврологического повреждения;
PARP	– poly (ADP-ribose) polymerase/поли-АДФ-рибоза- полимераза;
PBS	– phosphate buffered saline/фосфатно-солевой буфер;
PDS	– plasma derived serum / плазма сыворотки ;
PECAM	– platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 / молекула клеточной адгезии тромбоцитов / эндотелиоцитов;
Pgp	– P-glycoprotein/P-гликопротеин;
pH	– водородный показатель;
RBE	– rat brain endothelial cell / эндотелиальные клетки головного мозга крысы
SIRT	– silent information regulator/регулятор замалчивания информации/сиртуин;
SLC	– solute-linked carrier / транспортеры нейтральных аминокислот;
sPECAM-1	– soluble platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 / растворимая форма молекулы клеточной адгезии тромбоцитов / эндотелиоцитов;
TGF	– transforming growth factor / трансформирующий ростовой фактор;

TNF	– tumor necrosis factor/фактор некроза опухоли;
TRITC	– tetramethyl–rhodamine isothiocyanate / тетраметилродамин изотиоцианат;
VEGF	– vascular endothelial growth factor /сосудисто– эндотелиальный фактор роста;
WGS	– whole goat serum/инактивированная козья сыворотка;
ZO	– zonula occludens / белки плотных контактов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева, Г.Ю. Оценка факторов риска, участвующих в развитии ДЦП у детей-инвалидов / Г.Ю. Алексеева, И.И. Шоломов // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2011. - Т.7, № 2. - С. 446-450.
2. Андреева, Н.Г. Структурно-функциональная организация нервной системы / Н.Г. Андреева. - СПб.: СПбГУ, 2003. - 264 с.
3. Андреева, Н.Г. Белок S100B как маркер перинатального поражения ЦНС у новорожденных детей / Н.Г. Андреева // Вестник военно-медицинской академии. - 2012. - № 40 (4). - С. 276–278.
4. Афанасьева, Н.В. Исходы беременности и родов при фетоплацентарная недостаточности различной степени тяжести / Н.В. Афанасьева, А.А. Стрижаков // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. - 2004. - Т. 3, № 2. - С. 7–13.
5. Ахмадеева, Э.Н. Особенности ранней адаптации новорожденных, извлеченных путем операции кесарева сечения / Э.Н. Ахмадеева, Ю.Д. Еникеева // Практическая медицина. - 2009. - Т. 7, № 39. - С. 78-81.
6. Балданова, М.Ц. Фетоплацентарная недостаточность / М.Ц. Балданова // Вестник Бурятского государственного университета. - 2010. - № 12. - 267-271.
7. Барашнев, Ю.И. Ключевые проблемы перинатальной неврологии / Ю.И. Барашнев // Акушерство и гинекология : Научно-практический журнал. - 2007. - № 5. - С. 51–54.
8. Барашнев, Ю.И. Перинатальная неврология / Ю.И. Барашнев. - М.: Триада-Х, 2011. - 672 с.
9. Блинов, Д.В. Современные подходы к патогенезу и прогнозированию исходов гипоксически-ишемического поражения ЦНС в перинатальном периоде / Д.В. Блинов // Акушерство, гинекология и репродукция. - 2012. - Т. 6, № 3. - С. 34-38.
10. Блинов, Д.В. Пациенты с неврологическими расстройствами: обоснование необходимости фармакоэкономической оценки оптимизации

затрат на ведение с использованием нейроспецифических белков в качестве маркеров повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера / Д.В. Блинов // Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. - 2014. - Т. 7, № 1. - С. 40–45.

11. Ватолин, К.В. Ультразвуковая диагностика заболеваний головного мозга у детей / К.В Ватолин. - М.: Идар, 1995. - 120 с.

12. Взаимодействие нейротрофических и проапоптотических факторов в патогенезе гипоксического поражения головного мозга у новорожденных / Г.С. Голосная, А.С. Петрухин, Т.М. Красильщикова [и др.] // Педиатрия. - 2010. - Т. 89, № 1. - С. 20–25.

13. Власюк, В.В. Родовая травма и перинатальные нарушения мозгового кровообращения / В.В. Власюк. - СПб.: Нестор-История, 2009. - 252 с.

14. Возможности и перспективы фармакотерапии фетоплацентарной недостаточности / С.В. Новикова, В.А. Туманова, А.В. Микаелян [и др.] // Охрана материнства и детства. - 2008. - Т 2, № 12. – С. 53-56.

15. Возрастные особенности состояния здоровья детей с синдромом дефицита внимания и гиперактивностью / О.Ю. Кочерова, О.М. Филькина, Н.Ю. Сотникова [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. - 2010. - Т.39, № 1. - С. 41-45.

16. Володин, Н.Н. Актуальные проблемы неонатологии / Н.Н. Володин. - М. : ГЭОТАР-МЕД, 2004. - 448 с.

17. Володин, Н.Н. Судороги новорожденных - семиотика и дифференциальная диагностика / Н.Н. Володин, М.И. Медведев, Н.Д. Суворова // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. - 2004. - № 11. - С. 64–69.

18. Володин, Н.Н. Неонатология: Национальное руководство / Н.Н. Володин. - М. : «ГЭОТАР-Медиа», 2007. - 848 с.

19. Гипоксическое прекондиционирование, как новый подход к профилактике ишемических и реперфузионных повреждений головного

- мозга и сердца / Л.Н. Маслов, Ю.Б. Лишманов, Т.В. Емельянова [и др.] // *Ангиология и сосудистая хирургия*. - 2011. - № 3. - С. 27-36.
20. Гнусаев, С.Ф. Сердечно-сосудистые нарушения у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию / С.Ф. Гнусаев, А.Н. Шibaев, О.Б. Федерякина // *Педиатрия*. - 2006. - № 1. - С. 9–14.
21. Гришанова, Т.Г. Повреждение головного мозга при тяжелой травме: значимость клинических шкал и нейрональных маркеров / Т.Г. Гришанова, А.В. Будаев, Е.В. Григорьев // *Медицина неотложных состояний*. - 2011. - Т. 1-2, № 32–33. - С. 86–89.
22. Громада, Н.Е. Иммунные нарушения и биоэнергетическая недостаточность у детей с перинатальными гипоксическими поражениями ЦНС и их коррекция / Н.Е. Громада, О.П. Ковтун // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. - 2007. - № 1. - С. 26–30.
23. Допплерометрическая оценка гемодинамики в сосудах вертебрально-базиллярной системы плода при физиологическом и отягощенном течении беременности / А.Н. Стрижаков, И.В. Игнатко, Г.А. Гасангаджиева [и др.] // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. - 2007. – Т.6, № 1. – С. 5-13.
24. Жебентяев, А.И. Современные иммунохимические методы анализа / А.И. Жебентяев, Е.Н. Каткова // *Вестник фармации*. - 2013. - Т.59, № 1 (59). - С. 81–88.
25. Жукова, И.А. Нейронспецифическая енолаза как неспецифический маркер нейродегенеративного процесса / И.А. Жукова, В.М. Алифирова, Н.Г. Жукова // *Бюллетень сибирской медицины*. - 2011. - № 2. - С. 15–21.
26. Значение маркеров прогрессии при остеосаркомах у детей / А.В. Андрианов, А.В. Моргун, Т.Е. Таранушенко, А.Б. Салмина // *Сибирский онкологический журнал*. - 2008. - № 5. - С. 37–40.
27. Зубарева, Е.А. Комплексная, ультразвуковая оценка перинатальных цереброваскулярных нарушений у детей первого года жизни : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.19, 14.00.09 / Е.А. Зубарева. - М., 2006. - 52 с.

28. Ианг, И. Повреждение гематоэнцефалического барьера при острых и хронических цереброваскулярных заболеваниях / И. Ианг, Г.А. Розенберг // Stroke. Российское издание. - 2012. - № 1. - С. 91–96.
29. 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 [и др.] // Нейрохимия. – 2009. – Т.26, № 3. – С. 237-244.
30. Ипполитова, Л.И. Особенности ранней адаптации и вскармливания детей, извлеченных кесаревым сечением / Л.И. Ипполитова, Я.А. Туровский // Вестник новых медицинских технологий. - 2009. - Т.XVI, № 3. - С. 50–52.
31. Кадржанова, Г.Б. Компьютерно-томографические изменения у детей со спастической диплегией в зависимости от гестационного возраста / Г.Б. Кадржанова, Г.А. Мухамбетова, А.Р. Смагулова // Вестник Казахского Национального медицинского университета. - 2015. - № 2. - С. 393-394.
32. Кореновский, Ю. В. Биохимические маркеры гипоксических перинатальных поражений центральной нервной системы у новорожденных (обзор литературы) / Ю.В. Кореновский, С.А. Ельчанинова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2012. - № 2. - С. 3-7.
33. Кравцов, Ю.И. Характеристика речевого развития в процессе нейропсихологического тестирования детей с перинатальным поражением головного мозга средней и легкой степени тяжести / Ю.И. Кравцов, Е.Л. Жарныльская // Специальное образование. - 2012. - № 1. - С. 72-79.
34. Кравцов, Ю.И. Электроэнцефалографические показатели и речевое развитие в динамике до 3-летнего возраста у детей с перинатальным поражением мозга легкой и средней степени / Ю.И. Кравцов, Е.Л. Жарныльская // Казанский медицинский журнал. - 2011. - Т.92, № 6. - С. 813-816.

35. Кузнецов, С.Л. Гистология, цитология и эмбриология [Текст] : учебник для мед. вузов / С.Л. Кузнецов, Н.Н. Мушкамбаров. – М. : МИА, 2005. - 600 с.
36. Кулаков, В.И. Новорожденные высокого риска [Текст] / В.И. Кулаков, Ю.И. Барашнев. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 528 с.
37. Лабораторные возможности дифференциальной диагностики вирусных и бактериальных нейроинфекций у детей / Е.М. Мазаева, Л.А. Алексеева, Н.В. Скрипченко, Т.В. Бессонова // Здоровье - основа человеческого потенциала - проблемы и пути их решения. - 2013. - №2. - С.605-606.
38. Лазарева, Г.А. Современный взгляд на проблему фетоплацентарной недостаточности / Г.А. Лазарева, А.Б. Хурасева, О.И. Клычева // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. - 2014.- Т.189, №18. - С. 5-10.
39. Лебедев, А.Т. Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / А.Т. Лебедев. - М.: Техносфера, 2013. - 632 с.
40. Логинова, И.Г. Роль оксида азота и пероксинитрита в развитии перинатальных гипоксически-ишемических поражений ЦНС у новорожденных детей / И.Г. Логинова, А.А. Афонин, Н.А. Друккер // Современные проблемы науки и образования. - 2013. - № 2. - С. 21-29.
41. Маркеры апоптоза и нейроспецифические белки в диагностике перинатальных поражений центральной нервной системы у новорожденных детей / А.В. Моргун, Н.В. Овчаренко, Т.Е. Таранушенко [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2013. - Т.81, № 3. – С. 3-10.
42. Маркеры повреждения головного мозга при тяжелой сочетанной травме / Е.В. Григорьев, Е.А. Каменева, Т.Г. Гришанова [и др.] // Общая реаниматология. - 2010. - Т. 6, № 2. - С. 71–74.
43. Маркеры повреждения нейронов и астроцитов в плазме крови новорожденных при церебральной ишемии разной степени тяжести / И.М. Демьянова, Т.Е. Таранушенко, А.Б. Салмина [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. - 2008. - Т.50, № 2. - С. 27–31.

44. Мелашенко, Т.В. Диагностическая и прогностическая ценность ЭЭГ при перивентрикулярной лейкомаляции у недоношенных детей в остром и отдаленном периодах / Т.В. Мелашенко, В.В. Гузева, О.В. Гузева // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. - 2013. - № 2. - С. 58-67.
45. Метаболические нарушения при гипоксически-ишемическом поражении центральной нервной системы у новорожденных / С.Р. Гуламова, С.А. Алиева, Х.М. Нагиева, А.Г. Багирова // Мир медицины и биологии. - 2011. - Т. 7, № 3. - С. 55–58.
46. Моргун, А.В. Значение уровня экспрессии Р-гликопротеина при остеосаркомах у детей / А.В. Моргун, Т.Е. Таранушенко, А.Б. Салмина // Врач-аспирант. – 2006. - № 15. – С.519-524.
47. Морозов, Д.В. Роль современных методов исследования в диагностике пароксизмальных состояний у младенцев / Д.В. Морозов, В.Ф. Прусаков, Е.А. Морозова // Практическая медицина. - 2012. - Т.60, № 5. - С. 58-61.
48. Морозова, Е.А. Современный подход к пониманию и лечению неонатальных судорог / Е.А. Морозова // Практическая медицина. - 2011. - Т.53, № 5. - С. 93-95.
49. Мурач, Е.И. Принципы формирования защитных эффектов при использовании различных режимов гипоксического прекондиционирования / Е.И. Мурач, Е.И. Ерлыкина // Современные технологии в медицине. - 2013. - Т.5, № 1. - С. 21–26.
50. НАД⁺-зависимые механизмы нарушения жизнеспособности клеток головного мозга в остром периоде гипоксически-ишемического перинатального поражения / А.Б. Салмина, О.С. Окунева, Н.А. Малиновская [и др.] // Нейрохимия. - 2008. - Т.25, № 3. - С. 247-254.
51. Нейронспецифическая енолаза в диагностике перинатальных поражений центральной нервной системы у недоношенных детей / Е.Г. Новопольцева, В.А. Воробьева, О.Б. Овсянникова [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2010. – Т.7, № 3. - С. 66-70.

52. Нейроспецифические биомаркеры при перинатальных церебральных поражениях у детей первого года жизни / Ю.В. Ровенская, И.Е. Смирнов, Ю.С. Акоев, Р.С. Зайниддинова // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2010. - Т.19, № 3. - С. 54–55.
53. Обухов, Д.К. Современные представления о развитии, структуре и эволюции неокортекса конечного мозга млекопитающих и человека / Д.К. Обухов // Вестн. СПбГУ. - 2005. - №6. - С. 200-223.
54. Особенности перинатального периода при внутриутробном инфицировании / В.Б. Цхай, Е.И. Прахин, А.В. Даценко [и др.] // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. – 2002. - №6. – С. 14-18.
55. Особенности состояния здоровья, мозговой гемодинамики, биоэлектрической активности мозга и вегетативной регуляции у детей с последствиями перинатального поражения центральной нервной системы в возрасте одного года / О.Ю. Кочерова, О.М. Филькина, Е.Н. Курбанова [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. - 2012. - Т. XIX, № 1. - С. 62-64.
56. Особенности течения беременности и родов у женщин с анемией / С.В. Апресян, А.С. Арутюнян, А.Н. Крижановская, М.Б. Тамаркин // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. - 2009. - № 7. - С. 379-387.
57. Пальчик, А.Б. Эволюционная неврология [Текст] / А.Б. Пальчик. - СПб. : Питер, 2002. - 384 с.
58. Пальчик, А.Б. Гипоксически-ишемическая энцефалопатия новорожденных [Текст] / А.Б. Пальчик, Н.П. Шабалов. - М. : МЕДпресс-информ, 2013. - 288 с.
59. 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 [и др.] // Бюллетень

экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т.150, № 11. – С. 511-515.

60. Перинатальное гипоксически-ишемическое поражение 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 [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т.146, № 12. – С. 641-645.

61. Перинатальные поражения центральной нервной системы в структуре заболеваемости новорожденных детей г. Томска / Е.В. Михалев, Т.С. Кривоногова, Т.Е. Тропова [и др.] // Мать и дитя в Кузбассе. – 2011. - № 4. – С. 40-42.

62. Пилипенко, В.В. Бактериальные гнойные менингиты (клинико-лабораторная характеристика и патогенетические предикторы тяжелых форм заболеваний) : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.09 / В.В. Пилипенко. - СПб., 2011. - 43 с.

63. Последствия перинатальных гипоксически-ишемических поражений головного мозга у доношенных новорожденных: диагностика и принципы восстановительного лечения / М.И. Медведев, М.Г. Дегтярева, А.В. Горбунов [и др.] // Педиатрия. - 2011. - Т. 90, № 1. - С. 66-70.

64. Практическое руководство по неонатологии / под ред. Г. В. Яцык. – М. : МИА, 2008. – 344 с.

65. Проницаемость гематоэнцефалического барьера в норме, при нарушении развития головного мозга и нейродегенерации / Н.В. Кувачева, А.Б. Салмина, Ю.К. Комлева [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2013. – Т. 113, № 4. – С. 80-85.

66. Развитие апоптоза и изменение активности АДФ-рибозилциклазы при ишемическом повреждении головного мозга / А.Б. Салмина, А.А. Фурсов, С.В. Михуткина [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2006. – Т.41, № 4. – С. 22-27.

67. Ранняя диагностика и терапия перинатального поражения центральной нервной системы у новорождённых из группы риска / Е.А. Папшева, А.А. Афонин, И.Г. Логинова [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2010. – Т. 19, № 3. – С. 46-47.
68. Ранняя диагностика неблагоприятных последствий перинатальных гипоксически-ишемических поражений головного мозга у недоношенных детей и оптимизация их лечения / Н.Н. Володин, М.И. Медведев, А.В. Горбунов, С.О. Рогаткин // Педиатрия. - 2010. - Т. 89, № 2. - С. 101–106.
69. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : Медиа Сфера, 2006. – 312 с.
70. Регенеративный потенциал головного мозга: популяционный состав и формирование регуляторного микроокружения в нейрогенных нишах / Ю. К. Комлева, Н. В. Кувачева, Н. А. Малиновская [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. - 2014.-Т.8, №4. - С.44-52.
71. Роль гипоксически-травматических повреждений головного мозга в формировании инвалидности с детства / Ю.И. Барашнев, А.В. Розанов, В.О. Панов, А.И. Волобуев // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2006. - № 4. - С. 41–46.
72. Роль нейрон-астроглиальных взаимодействий в дизрегуляции энергетического метаболизма при ишемическом перинатальном поражении головного мозга / А.Б. Салмина, О.С. Окунева, Т.Е. Таранушенко [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2008. – Т.2, № 3. – С. 44-51.
73. Современные биохимические критерии диагностики перинатальных гипоксических поражений ЦНС у новорожденных детей / О.В. Гончарова, М.И. Баканов, А.А. Грешилов [и др.] // Российский педиатрический журнал. - 2007. - № 4. - С. 13–18.
74. Современные подходы к диагностике и лечению гипоксически-ишемических поражений ЦНС у доношенных детей первого года жизни / Л.

- И. Ильенко, Е. А. Зубарева, И. Н. Холодова [и др.] // Педиатрия. – 2003. - № 2. - С. 87-92.
75. Стенина, О. И. Этиология и структура судорожного синдрома у детей первых двух лет жизни / О.И. Стенина, А.К. Углицких, С.С. Паунова // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. - 2013. - Т. 92, № 1. – С. 77-83.
76. Сурков, Д.Н. Влияние искусственной вентиляции легких на церебральный статус у новорожденных в остром периоде гипоксически-ишемической энцефалопатии / Д.Н. Сурков, О.Г. Капустина, О.Д. Иванов // Вестник современной клинической медицины. - 2014. - №6. - С. 46-55.
77. Технологии изучения и моделирования гематоэнцефалического барьера // 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. Танащян. Т. III.- Москва, АТМО. - 2015. – С. 376.
78. Фармакологическая коррекция гипоксически-опосредованных нарушений центральной нервной и сердечно-сосудистой систем у детей, рожденных путем кесарева сечения / Т.С. Тумаева, Л.А. Балыкова, А.В. Герасименко [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2011. - № 6. – С. 1-11.
79. Флетчер, Р. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины: пер. с англ. [Текст] / Р. Флетчер, С. Флетчер, Э. Вагнер. – М. : Медиа Сфера, 2004. – 352 с.
80. Фундаментальные и прикладные аспекты изучения гематоэнцефалического барьера / В.П. Чехонин, В.П. Баклаушев, Г.М. Юсубалиева [и др.] // Вестник РАМН. – 2012. – №8. – С. 66-78.
81. Чурилова, А.В. Изменение экспрессии антиапоптотического белка BCL-2 в неокортексе и гиппокампе у крыс под влиянием различных режимов гипобарической гипоксии / А.В. Чурилова, Т.С. Глущенко, М.О.Самойлов // Морфология. - 2014. - № 5. - С. 7–13.
82. Экспрессия Р-гликопротеина на лимфоцитах периферической крови при тяжелых формах бронхиальной астмы и его роль в определении

- чувствительности к терапии глюкокортикостероидам / И.В. Демко, А.Б. Салмина, А.В. Моргун, Н.А. Малиновская // Пульмонология. - 2007. - № 3. - С. 41–46.
83. Янушанец, Н. Ю. Анализ уровня и структуры детской инвалидности вследствие заболеваний нервной системы в Санкт-Петербурге / Н. Ю. Янушанец // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. – 2006. – Т. 51, № 4. – С. 53-55.
84. A cytotoxic, co-operative interaction between energy deprivation and glutamate release from system xc⁻ mediates aglycemic neuronal cell death / T.L. Thorn, Y. He, N.A. Jackman [et al.] // ASN neuro. - 2015. - Vol.7, № 6. - P. 1759091415614301. doi: 10.1177/1759091415614301.
85. A detailed method for preparation of a functional and flexible blood-brain barrier model using porcine brain endothelial cells / A. Patabendige, R.A. Skinner, L. Morgan [et al.] // Brain Res. – 2013. – Vol. 1521. – P. 16-30.
86. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis / S. Renolleau, D. Aggoun-Zouaoui, Y. Ben-Ari [et al.] // Stroke. – 1998. – Vol. 29, № 7. – P. 1454-1460.
87. A neurovascular blood-brain barrier in vitro model / C.M. Zehendner, R. White, J. Hedrich, H.J. Luhmann // Methods in Molecular Biology. - 2014. - № 1135. - P. 403–413.
88. A proposed role for efflux transporters in the pathogenesis of hydrocephalus / S. Krishnamurthy, M.D. Tichenor, A.G. Satish, D.B. Lehmann [et al.] // Croatian Medical Journal. - 2014. - Vol.55, № 4. - P. 366–376.
89. A self-restricted CD38-connexin 43 cross-talk affects NAD⁺ and cyclic ADP-ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts / S. Bruzzone, L. Franco, L. Guida [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, № 51. – P. 48300-48308.
90. A three-dimensional model of the human blood-brain barrier to analyse the transport of nanoparticles and astrocyte/endothelial interactions / P.

- Sreekanthreddy, R. Gromnicova, H. Davies [et al.] // F1000Research. - 2015. - № 4. - P. 1279. doi: 10.12688/f1000research.7142.2.
91. A transport mechanism for NAADP in a rat basophilic cell line / R.A. Billington, E.A. Bellomo, E.M. Floriddia [et al.] // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. - 2006. - Vol.20, № 3. - P. 521–523.
92. Abbott, N.J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability / N.J. Abbott // J. Anat. – 2002. – Vol. 200. – P. 629-638.
93. Abbott, N.J. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier / N.J. Abbott, L. Ronnback, E. Hansson // Nat. Rev. Neurosci. – 2006. – № 7. – P. 41-53.
94. ABC and SLC transporter expression and proton oligopeptide transporter (POT) mediated permeation across the human blood--brain barrier cell line, hCMEC/D3 [corrected] / S.M. Carl, D.J. Lindley, D. Das [et al.] // Molecular Pharmaceutics. - 2010. - Vol.7, № 4. - P. 1057–1068.
95. Absence of glucose transporter 4 diminishes electrical activity of mouse hearts during hypoxia / K. Sohn, A.R. Wende, E.D. Abel [et al.] // Exp Physiol. – 2013. – Vol. 98. № 3. – P. 746-757.
96. Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes / N.M. Uwechue, M.C. Marx, Q. Chevy [et al.] // J. Physiol. – 2012. – Vol. 590, № 10. – P. 2317–2331.
97. Activation of PKC-alpha is required for migration of C6 glioma cells / J.G. Hu, X.F. Wang, J.S. Zhou [et al.] // Acta Neurobiol. Exp. – 2010. – Vol. 70. – P. 239-245.
98. Activation of Wnt signaling promotes hippocampal neurogenesis in experimental autoimmune encephalomyelitis / R. Schneider, B. Koop, F. Schröter [et al.] // Molecular Neurodegeneration. - 2016. - Vol. 11, № 1. - P. 53. doi: 10.1186/s13024-016-0117-0.

99. Acute effect of exercise-hypoxia challenge on GLUT4 protein expression in rat cardiac muscle / L.L. Chiu, Y.L. Tsai, W.C. Lee // *High Alt Med Biol.* – 2005. – Vol. 6, № 3. – P. 256-262.
100. ADAM12 and ADAM17 are essential molecules for hypoxia-induced impairment of neural vascular barrier function / D. Cui, M. Arima, K. Takubo [et al.] // *Scientific Reports.* - 2015. - № 5. - P. 12796. doi: 10.1038/srep12796.
101. Adenosine A2A receptor contributes to ischemic brain damage in newborn piglet / Z.J. Yang, B. Wang, H. Kwansa [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2013. – Vol. 33, № 10. – P. 1612-1620.
102. Adult neurogenesis: ultrastructure of a neurogenic niche and neurovascular relationships / P.G. da Silva, J.L. Benton, B.S. Beltz, S. Allodi // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 6. e39267.
103. Al Haj Zen, A. Notch signalling in ischaemia-induced angiogenesis / A. Al Haj Zen, P. Madeddu // *Biochem. Soc. Trans.* – 2009. – Vol. 37, № 6. – P. 1221-1227.
104. Alefishat, E. Effects of NAD at purine receptors in isolated blood vessels / E. Alefishat, S.P.H. Alexander, V. Ralevic // *Purinergic Signalling.* - 2015. - Vol.11, № 1. - P. 47–57.
105. Alonso-Alconada, D. Cannabinoid as a neuroprotective strategy in perinatal hypoxic-ischemic injury / D. Alonso-Alconada, A. Alvarez, E. Hilario // *Neurosci. Bull.* – 2011. – Vol. 27, № 4. – P. 275-285.
106. Amelioration of oxidative stress and protection against early brain injury by astaxanthin after experimental subarachnoid hemorrhage / X.S. Zhang, X. Zhang, M.L. Zhou [et al.] // *Journal of Neurosurgery.* - 2014. - Vol.121, № 1. - P. 42–54.
107. Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease / K.E. Biron, D.L. Dickstein, R. Gopaul, W.A. Jefferies // *PloS One.* - 2011. - Vol.6, № 8. - e23789.
108. An isogenic blood-brain barrier model comprising brain endothelial cells, astrocytes, and neurons derived from human induced pluripotent stem cells / S.G.

- Canfield, M.J. Stebbins, B.S. Morales [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. - 2017. - Vol.140, № 6. - P. 874–888.
109. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier / Y. Serlin, I. Shelef, B. Knyazer, A. Friedman // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. - 2015. - № 38. - P. 2–6.
110. Anderson, V. Do children really recover better? Neurobehavioural plasticity after early brain insult / V. Anderson, M. Spencer-Smith, A. Wood // *Brain*. – 2011. – Vol. 134, № 8. – P. 2197-2221.
111. Angiogenesis but not neurogenesis is critical for normal learning and memory acquisition / A. L. Kerr, E. L. Steuer, V. Pochtarev [et al.] // *Neuroscience*. – 2010. – Vol. 171, № 1. – P.214-226.
112. Animal models of periventricular leukomalacia / E.K. Choi, D. Park, T.K. Kim [et al.] // *Lab. Anim. Res.* – 2011. – Vol. 27, № 2. – P. 77-84.
113. Antibody against junctional adhesion molecule-C inhibits angiogenesis and tumor growth / C. Lamagna, K.M. Hodivala-Dilke, B.A. Imhof [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, № 13. – P. 5703-5710.
114. Approach to the sonographic evaluation of fetal ventriculomegaly at 11 to 14 weeks gestation / G. Manegold-Brauer, A. Oseledchyk, A. Floeck [et al.] // *BMC pregnancy and childbirth*. - 2016. - № 16. - P. 3. doi: 10.1186/s12884-016-0797-z.
115. Aquaporin-4 mediates communication between astrocyte and microglia: Implications of neuroinflammation in experimental Parkinson’s disease / H. Sun, R. Liang, B. Yang [et al.] // *Neuroscience*. - 2016. - № 317. - P. 65–75.
116. Arias-Carrión, O. Neurogenesis in the adult brain / O. Arias-Carrion, T. Olivares-Bunuelos, R. Drucker-Colin // *Rev. Neurol.* – 2007. - Vol.44, № 9. – P. 541-550.
117. Arteaga O. [и др.]. Pretreatment with resveratrol prevents neuronal injury and cognitive deficits induced by perinatal hypoxia-ischemia in rats / O. Arteaga, M. Revuelta, L. Urigüen [et al.] // *PloS One*. - 2015. -Vol.10, № 11. - e0142424. doi: 10.1371/journal.pone.0142424. eCollection 2015.

118. Arthur, F. E. Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model / F.E. Arthur, R.R. Shivers, P.D. Bowman // *Brain Research*. – 1987. – Vol. 433. – P. 155-159.
119. Ashfaq, M. Effects of maternal smoking on placental morphology / M. Ashfaq, M. Z. Janjua, M. Nawaz // *J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad*. – 2003. – Vol.15, №3. – P. 12-15.
120. Astrocyte differentiation of human pluripotent stem cells: new tools for neurological disorder research / A. Chandrasekaran, H.X. Avci, M. Leist [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. - 2016. - № 10. - P. 215.
121. Astrocyte-mediated regulation of multidrug resistance p-glycoprotein in fetal and neonatal brain endothelial cells: age-dependent effects / S. Baello, M. Iqbal, W. Gibb, S.G. Matthews // *Physiological Reports*. - 2016. - Vol.4, № 16. - e12853.
122. Astrocytes and pericytes differentially modulate blood-brain barrier characteristics during development and hypoxic insult / A.Al Ahmad, C.B. Taboada, M. Gassmann [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab*. – 2011. – Vol. 31, № 2. – P. 693-705.
123. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus / B. Seri, J.M. García-Verdugo, B.S. McEwen [et al.] // *J. Neurosci*. – 2001. – Vol. 21, № 18. – P. 7153-7160.
124. Astrocytes surviving severe stress can still protect neighboring neurons from proteotoxic injury / A.M. Gleixner, J.M. Posimo, D.B. Pant // *Molecular Neurobiology*. - 2016. - Vol.53, № 7. - P. 4939–4960.
125. Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood-brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions / C. Chapouly, A.A. Tadesse, S. Horng [et al.] // *Brain: A Journal of Neurology*. - 2015. - Vol.138, № 6 (138). - P. 1548–1567.
126. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions / C. Giaume, A. Koulakoff, L. Roux [et al.] // *Nat. Rev. Neurosci*. – 2010. – Vol. 11, № 2. – P. 87-99.

127. ATP-binding cassette transporters in immortalised human brain microvascular endothelial cells in normal and hypoxic conditions/ C. Lindner, A. Sigrüner, F. Walther [et al.] // *Exp. Transl. Stroke Med.* – 2012. – Vol. 4, № 1. – P. 9. doi: 10.1186/2040-7378-4-9.
128. Autoantibody-induced internalization of CNS AQP4 water channel and EAAT2 glutamate transporter requires astrocytic Fc receptor / S.R. Hinson, I.C. Clift, N. Luo [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* - 2017. - Vol.21, № 114. - P. 5491-5496. doi: 10.1073/pnas.1701960114.
129. Back, S.A. Brain injury in the preterm infant: new horizons for pathogenesis and prevention / S.A. Back // *Pediatric Neurology.* - 2015. - Vol.53, № 3. - P. 185–192.
130. Back, S.A. Pathophysiology of glia in perinatal white matter injury / S.A. Back, P.A. Rosenberg // *Glia.* - 2014. - Vol.62, № 11. - P. 1790–1815.
131. Bacterial pore-forming cytolysins induce neuronal damage in a rat model of neonatal meningitis / A. Reiss, J.S. Braun, K. Jager [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases.* 2011. № 3 (203). C. 393–400.
132. Ballabh, P. The blood-brain barrier an overview: structure, regulation, and clinical implications / P. Ballabh, A. Braun, M. Nedergaard // *Neurobiol. Dis.* – 2004. № 16. – P. 1-13.
133. Barkovich, A. J. Magnetic resonance techniques in the assessment of myelin and myelination / A. J. Barkovich // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2005. – № 28. – P. 311–343.
134. Barriers in the developing brain and neurotoxicology / C.J. Ek, K.M. Dziegielewska, M.D. Habgood [et al.] // *Neurotoxicology.* – 2012. – Vol. 33, № 3. – P. 586-604.
135. Barros, L.F. Metabolic signaling by lactate in the brain / L.F.Barros // *Trends in Neurosciences.* - 2013. - Vol.36, № 7. - P. 396–404.
136. Basavaraj, S. Can formulation and drug delivery reduce attrition during drug discovery and development-review of feasibility, benefits and challenges / S.

Basavaraj, G.V. Betageri // *Acta Pharmaceutica Sinica. B.* - 2014. - Vol.4, № 1. - P. 3–17.

137. Becerra-Calixto, A. The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: potential in cell therapy / A. Becerra-Calixto, G.P. Cardona-Gomez // *Frontiers in Molecular Neuroscience.* - 2017. - № 10. - P. 88. doi: 10.3389/fnmol.2017.00088.

138. Begley, D. J. ABC transporters and the blood-brain barrier / D.J. Begley // *Curr. Pharm. Des.* – 2004. – № 10. – P. 1295-1312.

139. Begley, D.J. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities / D.J. Begley // *Pharmacol. Ther.* – 2004. – Vol.104, №1. – P. 29-45.

140. Bel, F. Drugs for neuroprotection after birth asphyxia: Pharmacologic adjuncts to hypothermia / F. Bel, F. Groenendaal // *Seminars in Perinatology.* - 2016. -Vol.40, № 3. - P. 152–159.

141. Berg, C. Quantitative analysis of nanoparticle transport through in vitro blood-brain barrier models / C. Berg // *Tissue Barriers.* - 2016. - Vol.4, № 1. - e1143545.

142. Bergersen, L.H. Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle / L.H. Bergersen // *Neuroscience.* - 2007. - Vol.145, № 1. P. 11–19.

143. Bergersen, L.H. Lactate transport and signaling in the brain: potential therapeutic targets and roles in body-brain interaction / L.H. Bergersen // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* - 2015. - Vol.35, № 2. - P. 176–185.

144. Bickel, U. How to measure drug transport across the blood-brain barrier / U. Bickel // *NeuroRx.* – 2005. – Vol. 2. – P. 15-26.

145. Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy / L.F. Chalak, P.J. Sanchez,

- B. Adams-Huet et al. // *J Pediatr.* – 2014. Vol. 164, №3. – P. 468–474. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.10.067.
146. Biphasic mechanisms of neurovascular unit injury and protection in CNS diseases / T. Maki, K. Hayakawa, L.D. Pham et al. // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* - 2013. - Vol. 12, №3. - P. 302-315.
147. Blood glutamate scavenging: insight into neuroprotection / A. Leibowitz, M. Boyko, Y. Shapira [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13, № 8. – P. 10041-10066.
148. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus / A. Montagne, S.R. Barnes, M.D. Sweeney [et al.] // *Neuron.* – 2015. – Vol. 85, № 2. – P. 296-302.
149. Blood-brain barrier breakdown involves four distinct stages of vascular damage in various models of experimental focal cerebral ischemia / M. Krueger, I. Bechmann, K. Immig et al. // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2015. – Vol. 35, № 2. – P. 292-303.
150. Blood-brain barrier modeling with co-cultured neural progenitor cell-derived astrocytes and neurons / E.S. Lippmann, C. Weidenfeller, C.N. Svendsen [et al.] // *J. Neurochem.* – 2011. – Vol. 119, № 3. – P. 507-520.
151. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line / B.B. Weksler, E.A. Subileau, N. Perriere [et al.] // *FASEB J.* – 2005. – № 19. – P. 1872-1874.
152. Bonate, P. L. Animal models for studying transport across the blood-brain barrier / P.L. Bonate // *J. Neurosci. Methods.* – 1995. – Vol. 56. – P. 1-15.
153. Both butyrate incubation and hypoxia upregulate genes involved in the ruminal transport of SCFA and their metabolites / F. Dengler, R. Rackwitz, F. Benesch et al. // *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* – 2015. – Vol. 99№ 2. - P. 379-390.
154. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke / K. Arai, G. Jin, D. Navaratna [et al.] // *FEBS J.* – 2009. – Vol. 276, № 17. – P. 4644-4652.

155. Brain intracellular pH and metabolism during hypercapnia and hypocapnia in the new-born lamb / E.B. Cady, A. Chu, A.M. Costello [et al.] // *J Physiol.* – 1987. – Vol. 382. – P. 1-14.
156. Brekke, E. Glucose metabolism and astrocyte-neuron interactions in the neonatal brain / E. Brekke, T.S. Morken, U. Sonnewald // *Neurochemistry International.* - 2015. - №82. - P. 33–41.
157. Bröer, S. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms / S. Bröer, A. Bröer // *The Biochemical Journal.* - 2017. - Vol.474, № 12. -P. 1935–1963.
158. Cabaj, A. MRI patterns of hypoxic-ischemic brain injury in preterm and full term infants - classical and less common MR findings / A. Cabaj, M. Bekiesińska-Figatowska, J. Mądzik // *Pol. J. Radiol.* – 2012. – Vol. – 77, № 3. – P. 71-76.
159. Casanova, M.F. Canonical circuits of the cerebral cortex as enablers of neuroprosthetics / M.F. Casanova // *Frontiers in Systems Neuroscience.* - 2013. - № 7. - P. 77. doi: 10.3389/fnsys.2013.00077.
160. Casanova, M.F. Cortical organization: a description and interpretation of anatomical findings based on systems theory / M.F. Casanova // *Transl. Neurosci.* – 2010. – Vol. 1, № 1. – P. 62-71.
161. Caviness, V.S. Histogenetic processes leading to the laminated neocortex: migration is only a part of the story / V.S. Caviness, P.G. Bhide, R.S. Nowakowski // *Dev. Neurosci.* – 2008. – Vol.30, № 1-3. – P. 82-95.
162. *Cell Biology: A Laboratory Handbook* / ed. E. Julio. – Celis. Academic Press,1998. – 533 p.
163. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage / A. E. Wurmser, K. Nakashima, R. G. Summers [et al.] // *Nature.* – 2004. – Vol. 430, № 6997. – P. 350-356.
164. Cerebellar neurons possess a vesicular compartment structurally and functionally similar to Glut4-storage vesicles from peripheral insulin-sensitive tissues / K. Bakirtzi, G. Belfort, I. Lopez-Coviella [et al.] // *J Neurosci.* – 2009. – Vol. 29, № 16. – P. 5193-5201.

165. Cerebral blood flow and oxygenation in ovine fetus: responses to superimposed hypoxia at both low and high altitude / J.P. Pena, T. Tomimatsu, D.P. Hatran [et al.] // *J. Physiol.* – 2007. – Vol. 578, № 1. – P. 359-370.
166. Cerebral inflammation and mobilization of the peripheral immune system following global hypoxia-ischemia in preterm sheep / R.K. Jellema, V. Lima Passos, A. Zwanenburg [et al.] // *J. Neuroinflammation.* – 2013. – Vol. 10. – P. 13. doi: 10.1186/1742-2094-10-13.
167. Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture: II. Establishment, identification, and preliminary characterization of an endothelial cell line / L.E. DeBault, E. Henriquez, M.N. Hart [et al.] // *In Vitro.* – 1981. – Vol. 17. – P. 480-494.
168. Cerebral ventricular system in fetuses with open spina bifida at 11-13 weeks' gestation / T. Loureiro, F. Ushakov, N. Montenegro [et al.] // *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology.* - 2012. - Vol.39, № 6. - P. 620–624.
169. Cerebromicrovascular endothelial cells are resistant to L-glutamate / F. Domoki, B. Kis, T. Gaspar [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2008. – Vol. 295, № 4. – P. 1099-1108.
170. Chaitanya, G.V. Neuronal and astrocytic interactions modulate brain endothelial properties during metabolic stresses of in vitro cerebral ischemia / G.V. Chaitanya, A. Minagar, J.S. Alexander // *Cell communication and signaling: CCS.* - 2014. - № 12. - P. 7. doi: 10.1186/1478-811X-12-7.
171. Chaitanya, G.V. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration / G.V. Chaitanya, A.J. Steven, P.P. Babu // *Cell Commun. Signal.* – 2010. - № 8. – P. 31. doi: 10.1186/1478-811X-8-31
172. Characterization of microvascular basal lamina damage and blood-brain barrier dysfunction following subarachnoid hemorrhage in rats / K. Scholler, A. Trinkl, M. Klopotoski [et al.] // *Brain Res.* – 2007. – Vol. 1142. – P. 237–246.

173. Chen, Y. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier / Y. Chen, L. Liu // *Advanced Drug Delivery Reviews*. - 2012. - Vol.64, № 7. - P. 640–665.
174. Cheng, S.C. The interplay between central metabolism and innate immune responses / S.C. Cheng, L.A.B. Joosten, M.G. Netea // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. - 2014.- Vol.25, № 6. - P. 707–713.
175. Cingulin and paracingulin show similar dynamic behaviour, but are recruited independently to junctions / S. Paschoud, D.Yu, P. Pulimeno [et al.] // *Mol. Membr. Biol.* – 2011. – Vol. 28, № 2. – P. 123-135.
176. Cioni, G. Perinatal brain damage in children: neuroplasticity, early intervention, and molecular mechanisms of recovery / G. Cioni, G. D'Acunto, A. Guzzetta // *Prog. Brain Res.* – 2011. – Vol. 189. – P. 139-154.
177. Circulating brain microvascular endothelial cells (cBMECs) as potential biomarkers of the blood-brain barrier disorders caused by microbial and non-microbial factors / S.H. Huang, L. Wang, F. Chi [et al.] // *PloS One*. - 2013. - Vol.8, № 4. - P. 62164. doi: 10.1371/journal.pone.0062164.
178. Claudin-1, -2 and -3 are selectively expressed in the epithelia of the choroid plexus of the mouse from early development and into adulthood while claudin-5 is restricted to endothelial cells /A. Steinemann, I. Galm, S. Chip [et al] // *Frontiers in Neuroanatomy*. - 2016. - № 10. - P. 16. doi: 10.3389/fnana.2016.00016.
179. Cohen-Kashi-Malina, K. Mechanisms of glutamate efflux at the blood-brain barrier: involvement of glial cells / K. Cohen-Kashi-Malina, I. Cooper, V.I. Teichberg // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2012. – Vol. 32, № 1. – P. 177-189.
180. Combined effects of prenatal inhibition of vasculogenesis and neurogenesis on rat brain development / Q.Y. Fan, S. Ramakrishna, N. Marchi [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2008. – Vol. – 32, № 3. – P. 499-509.
181. Compromised blood-brain barrier competence in remote brain areas in ischemic stroke rats at the chronic stage / S. Garbuzova-Davis, E. Haller, S.N. Williams et al. // *J Comp Neurol.* – 2014. – Vol. 522, № 13. – P. 3120-3137.

182. Concurrent vasculogenesis and neurogenesis from adult neural stem cells / M. Ii, H. Nishimura, H. Sekiguchi [et al.] // *Circ. Res.* – 2009. – Vol. 105, № 9. – P. 860-868.
183. Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection / R. Schulz, P.M. Gorge, A. Gorbe A [et al.] // *Pharmacology & Therapeutics.* - 2015. - № 153. - P. 90–106.
184. Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons / M.V. Bennett, J.M. Garre, J.A. Orellana [et al.] // *Brain Res.* – 2012. – № 1487. – P. 3-15.
185. Connexin hemichannel blockade is neuroprotective after asphyxia in preterm fetal sheep / J.O. Davidson, P.P. Drury, C.R. Green [et al.] // *PloS One.* - 2014. - Vol.9, № 5. - P. 96558. doi: 10.1371/journal.pone.0096558.
186. Connexin-43 hemichannels contributes to the disassembly of cell junctions through modulation of intracellular oxidative status / Y. Chi, X. Zhang, Z. Zhang [et al.] // *Redox Biology.* - 2016. - № 9. -P. 198–209.
187. Connexin-43 hemichannels mediate cyclic ADP-ribose generation and its Ca²⁺-mobilizing activity by NAD⁺/cyclic ADP-ribose transport / E.K. Song, S.Y. Rah, Y.R. Lee [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 52. – P. 44480-44490.
188. Consensus paper: cerebellar development / K. Leto, M. Arancillo, E.B. Becker [et al.] // *Cerebellum.* - 2016. - Vol.15, № 6. - P. 789–828.
189. Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier / V. Berezowski, C. Landry, MP. Dehouck [et al.] // *Brain Res.* – 2004. – Vol. 1018. – P. 1-9.
190. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease / R.G. Nagele, J. Wegiel, V. Venkataraman [et al.] // *Neurobiology of Aging.* - 2004. - Vol.25, № 5. - P. 663–674.
191. Controversies in preterm brain injury / A.A. Penn, P. Gressens, B. Fleiss [et al.] // *Neurobiology of Disease.* - 2016. - Vol.92, Pt A. - P. 90–101.

192. Cornford, E.M. Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy / E.M. Cornford, S. Hyman // *NeuroRx*. – 2005. – Vol. 2, № 1. – P. 27-43.
193. Correlation between umbilical cord PH and Apgar score in high-risk pregnancy / M. Ahmadpour-Kacho, N. Asnafi, M. Javadian // *Iran J. Pediatr.* – 2010. – Vol. 20, № 4. – P. 401-406.
194. Correlation between white matter microstructure and executive functions suggests early developmental influence on long fibre tracts in preterm born adolescents / B. Vollmer, A. Lundquist, G. Martensson [et al.] // *PloS One*. - 2017. - Vol.13, № 6. - P. 0178893. doi: 10.1371/journal.pone.0178893.
195. Cortical expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase is decreased in schizophrenia / A.E. Steffek, R.E. McCullumsmith, V. Haroutunian [et al.] // *Schizophr. Res.* – 2008. – Vol. 103, № 1-3. – P. 71-82.
196. Coulter, D.A. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy / D.A. Coulter, T. Eid // *Glia*. – 2012. – Vol. 60, № 8. – P. 1215-1226.
197. Cyclic ADP-ribose as a second messenger revisited from a new aspect of signal transduction from receptors to ADP-ribosyl cyclase / H. Higashida, M. Hashii, S. Yokoyama [et al.] // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2001. – Vol. 90. – P. 283-296.
198. Danbolt, N. C. Glutamate uptake / N. C. Danbolt // *Prog. Neurobiol.* – 2001. – Vol. 65. – P. 1-105.
199. Daneman, R. The blood-brain barrier / R. Daneman, A. Prat // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. - 2015. - Vol.7, № 1. - P. 020412. doi: 10.1101/cshperspect.a020412.
200. Dauchy, S. Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells / S. Dauchy, F. Miller, P.O. Couraud // *Biochem. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 77. – P. 897-909.

201. Death receptors DR6 and TROY regulate brain vascular development / S.J. Tam, D.L. Richmond, J.S. Kaminker [et al.] // *Dev Cell*. – 2012. – Vol. – 22, № 2. – P. 403-417.
202. DeBault, L.E. Gamma-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro / L.E. DeBault, P.A. Cancilla // *Science*. – 1980. – Vol. 207. – P. 653-655.
203. Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury / F.K. van Landeghem, T. Weiss, M. Oehmichen [et al.] // *J. Neurotrauma*. – 2006. – Vol. 23. – P. 1518–1528.
204. Deferoxamine decreases the excitatory amino acid levels and improves the histological outcome in the hippocampus of neonatal rats after hypoxia-ischemia / G. Papazisis, C. Pourzitaki, C. Sardeli [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2008. – Vol. 57, № 1. – P. 73–78.
205. Deleterious effects of high dose connexin 43 mimetic peptide infusion after cerebral ischaemia in near-term fetal sheep / J.O. Davidson, C.R. Green, L.F. Nicholson [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13, № 5. – P. 6303-6319.
206. Design and synthesis of cyclic ADP-4-thioribose as a stable equivalent of cyclic ADP-ribose, a calcium ion-mobilizing second messenger / T. Tsuzuki, N. Sakaguchi, T. Kudoh [et al.] // *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013 Jun 24;52(26):6633-7. doi: 10.1002/anie.201302098.
207. Design, synthesis, and chemical and biological properties of cyclic ADP-4-thioribose as a stable equivalent of cyclic ADP-ribose / T. Tsuzuki, S. Takano, N. Sakaguchi [et al.] // *Messenger*. - 2014. - Vol.3, № 1–2. - P. 35–51.
208. Development and function of the blood-brain barrier in the context of metabolic control / R. Haddad-Tóvolli, N.R.V. Dragano, A.F.S. Ramalho, L.A. Velloso // *Frontiers in Neuroscience*. - 2017. - № 11. - P. 224. doi: 10.3389/fnins.2017.00224.
209. Development of cerebral gray and white matter injury and cerebral inflammation over time after inflammatory perinatal asphyxia / H.J. Bonestroo,

- C.J. Heijnen, F. Groenendaal [et al.] // *Developmental Neuroscience*. - 2015. - Vol.37, № 1. - P. 78–94.
210. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia / J. Stone, A. Itin, T. Alon [et al.] // *J. Neurosci.* – 1995. – Vol. 15, № 7 (Pt 1). – P. 4738-4747.
211. Developmental regulation of the neuroinflammatory responses to LPS and/or hypoxia-ischemia between preterm and term neonates: An experimental study / M. E. Brochu, S. Girard, K. Lavoie [et al.] // *J. Neuroinflammation*. – 2011. – Vol. 8. – P. 55. doi: 10.1186/1742-2094-8-55.
212. Dhar, K.K. Significance of nuchal cord / K.K. Dhar, S.N. Ray, G.I. Dhall // *J. Indian Med. Assoc.* – 1995. – Vol. 93, № 12. – P. 451-453.
213. Differential effects of energy deprivation on intracellular sodium homeostasis in neurons and astrocytes / N.J. Gerkau, C. Rakers, G.C. Petzold, C.R. Rose // *Journal of Neuroscience Research*. - 2017. doi:10.1002/jnr.23995
214. Differential responses of blood-brain barrier associated cells to hypoxia and ischemia: a comparative study / S. Engelhardt, S.F. Huang, S. Patkar [et al.] // *Fluids and barriers of the CNS*. - 2015. - № 12. - P. 4. doi: 10.1186/2045-8118-12-4.
215. Distefano, G. Actualities on molecular pathogenesis and repairing processes of cerebral damage in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy / G. Distefano, A. D. Praticò // *Ital. J. Pediatr.* – 2010. – Vol. 36. – P. 63. doi: 10.1186/1824-7288-36-63.
216. DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation / M. Cohen-Armon, L. Visocek, D. Rozensal [et al.] // *Mol. Cell*. – 2007. – Vol. 25, № 2. – P. 297-308.
217. Does prenatal stress alter the developing connectome? / D. Scheinost, R. Sinha, S.N. Cross [et al.] // *Pediatric Research*. - 2017. - Vol.81, № 1–2. - P. 214–226.

218. Dynamic behaviour of human neuroepithelial cells in the developing forebrain / L. Subramanian, M. Bershteyn, M.F. Paredes, A.R. Kriegstein // *Nature Communications*. - 2017. - № 8. - P. 14167. doi: 10.1038/ncomms14167.
219. Early adverse life events are associated with altered brain network architecture in a sex- dependent manner / A. Gupta, E.A. Mayer, J.R. Acosta [et al.] // *Neurobiology of Stress*. - 2017. - № 7. - P. 16–26.
220. Early age-related functional connectivity decline in high-order cognitive networks / T. Siman-Tov, N. Bosak, E. Sprecher [et al.] // *Frontiers in Aging Neuroscience*. - 2016. - № 8. - P. 330. doi: 10.3389/fnagi.2016.00330.
221. Early brain injury, an evolving frontier in subarachnoid hemorrhage research / M. Fujii, J. Yan, W.B. Rolland [et al.] // *Translational Stroke Research*. - 2013. - Vol.4, № 4. - P. 432–446.
222. Early life programming and neurodevelopmental disorders / T.L. Bale, T.Z. Baram, A.S. Brown [et al.] // *Biol. Psychiatry*. – 2010. – Vol. 68, № 4. – P. 314-319.
223. Ebong, E.E. Specificity in the participation of connexin proteins in flow-induced endothelial gap junction communication / E.E. Ebong, N. Depaola // *Pflugers Arch*. – 2013. – Vol. 465, № 9. – P. 1293-1302.
224. EEG for predicting early neurodevelopment in preterm infants: an observational cohort study / N. Hayashi-Kurahashi, H. Kidokoro, T. Kubota [et al.] // *Pediatrics*. – 2012. – Vol. 130, № 4. – P. 891-897.
225. Effect of intermittent hypoxia and Rimonabant on glucose metabolism in rats: Involvement of expression of GLUT4 in skeletal muscle / X. Wang, Q. Yu, H. Yue // *Med Sci Monit*. – 2015. – Vol. 21. – P. 3252-3260.
226. Effects of intermittent training on anaerobic performance and MCT transporters in athletes / G. Millet, D.J. Bentley, B. Roels [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 5. - e95092.
227. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases / L.B. Haim, M.A. Carrillo-de Sauvage, K. Ceyzeriat [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. - 2015. - №9. - P. 278.

228. Endothelial cell junctional adhesion molecules: role and regulation of expression in inflammation / N. Reglero-Real, B. Colom, J.V. Bodkin [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. - 2016. - Vol.36, № 10. -P. 2048–2057.
229. Endothelial cells and astrocytes: a concerto en duo in ischemic pathophysiology / V. Berezowski, A.M. Fukuda, R. Cecchelli [et al.] // *Int. J. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 176287. doi: 10.1155/2012/176287.
230. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells / K. Morita, H. Sasaki, M. Furuse [et al.] // *J. Cell Biol.* – 1999. – № 147. – P. 185–194.
231. Endothelial glycoconjugates: a comparative lectin study of the brain, retina and myocardium / J.G. Lawrenson, J.P. Cassella, A.J. Hayes [et al.] // *J. Anat.* – 2000. – Vol. 196, № 1. – P. 55-60.
232. Endothelial intercellular adhesion molecule (ICAM)-2 regulates angiogenesis. Endothelial intercellular adhesion molecule (ICAM)-2 regulates angiogenesis / M.T. Huang, J.C. Mason, G.M. Birdsey [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 106, № 5. – P. 1636-1643.
233. Endothelial progenitor cells physiology and metabolic plasticity in brain angiogenesis and blood-brain barrier modeling / N.A. Malinovskaya, Y.K. Komleva, V.V. Salmin [et al.] // *Frontiers in Physiology*. - 2016. - № 7. - P. 599.
234. Endothelial-specific deficiency of Junctional Adhesion Molecule-C promotes vessel normalisation in proliferative retinopathy / M. Economopoulou, N. Avramovic, A. Klotzsche-von Ameln et al. // *Thromb Haemost.* – 2015. – Vol. 114, № 6. – P. 1241-1249.
235. Enerson, B.E. The rat blood-brain barrier transcriptome / B.E. Enerson, L.R. Drewes // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2006. – Vol. 26, № 7. – P. 959-973.
236. Engineering and expression of a chimeric transferrin receptor monoclonal antibody for blood-brain barrier delivery in the mouse / R.J. Boado, Y. Zhang, Y. Wang [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2009. – Vol.102, № 4. – P. 1251-1258.

237. Enhancing Nervous System Recovery through Neurobiologics, Neural Interface Training, and Neurorehabilitation / M.O. Krucoff, S. Rahimpour, M.W. Slutzky [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. - 2016. - № 10. - P. 584. doi: 10.3389/fnins.2016.00584.
238. Epidermal growth factor prevents APOE4 and amyloid-beta-induced cognitive and cerebrovascular deficits in female mice / R. Thomas, P. Zuchowska, A.W. Morris [et al.] // *Acta Neuropathologica Communications*. - 2016. - Vol.4, № 1. P. 111.
239. Epigenomic profiling of preterm infants reveals DNA methylation differences at sites associated with neural function / S. Sparrow, J.R. Manning, J. Cartier [et al.] // *Translational Psychiatry*. - 2016. - № 6. - P. 716. doi: 10.1038/tp.2015.210.
240. Erdo, F. Age-associated physiological and pathological changes at the blood-brain barrier: A review / F. Erdo, L. Denes, E. Lange // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. - 2017. - Vol.37, № 1. - P. 4–24.
241. Erzurumlu, R.S. Development and critical period plasticity of the barrel cortex / R.S. Erzurumlu, P. Gaspar // *Eur. J. Neurosci.* – 2012. – Vol. 35, № 10. – P. 1540-1553.
242. Escartin, C. Astroglial networking contributes to neurometabolic coupling / C. Escartin, N. Rouach // *Front. Neuroenergetics*. – 2013. – Vol. 5. – P. 4. doi: 10.3389/fnene.2013.00004.
243. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury / D. J. Myer, G. G. Gurkoff, S. M. Lee // *Brain*. – 2006. – Vol. 129. – P. 2761–2772.
244. Establishment of a human blood-brain barrier co-culture model mimicking the neurovascular unit using induced pluri- and multipotent stem cells / A. Appelt-Menzel, A. Cubukova, K. Günther [et al.] // *Stem Cell Reports*. - 2017. - Vol.8, № 4. - P. 894–906.
245. Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function

/ Y. Sano, F. Shimizu, M. Abe [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2010. – Vol. 225. – P. 519-528.

246. Establishment of neurogenic microenvironment in the neurovascular unit: the connexin 43 story / A.B. Salmina, A.V. Morgun, N.V. Kuvacheva [et al.] // *Reviews in the Neurosciences.* - 2014. - Vol.25, № 1. - P. 97–111.

247. Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an in vitro cellular model of the blood-brain barrier / M.J. Bernas, F.L. Cardoso, S.K. Daley [et al.] // *Nat. Protoc.* – 2010. – Vol. 5. – P. 1265 – 1272.

248. Evaluation of Connexin 43 redistribution and endocytosis in astrocytes subjected to ischemia/reperfusion or oxygen-glucose deprivation and reoxygenation / H. Xie, Y. Cui, S. Hou [et al.] // *BioMed Research International.* - 2017. - № 2017. - P. 5064683. doi: 10.1155/2017/5064683.

249. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier / Q. Wang, J.D. Rager, K. Weinstein [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics.* - 2005. - Vol.288, № 2. - P. 349–359.

250. Evidence of a role for cyclic ADP-ribose in calcium signalling and neurotransmitter release in cultured astrocytes / C. Verderio, S. Bruzzone, E. Zocchi [et al.] // *J. Neurochem.* – 2001. Vol. 78, № 3. – P. 646-657.

251. Excitatory amino acid transporter expression by astrocytes is neuroprotective against microglial excitotoxicity / J. Liang, H. Takeuchi, Y. Doi [et al.] // *Brain Res.* – 2008. – Vol. 1210. – P. 11-19.

252. Expression and role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in multidrug resistance of canine mammary cancer cells / K.M. Pawłowski, J. Mucha, K. Majchrzak [et al.] // *BMC Vet. Res.* – 2013. – Vol. 9. – P. 119. doi: 10.1186/1746-6148-9-119.

253. Expression of EAAT1 reflects a possible neuroprotective function of reactive astrocytes and activated microglia following human traumatic brain injury / R. Beschorner, K. Dietz, N. Schauer [et al.] // *Histol. Histopathol.* – 2007. – Vol. 22. – P. 515–526.

254. Expression of EAAT2 in neurons and protoplasmic astrocytes during human cortical development / T.M. DeSilva, N.S. Borenstein, J.J. Volpe [et al.] // *J. Comp. Neurol.* – 2012. – Vol. 520, № 17. – P. 3912-3932.
255. Expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebrospinal fluid and plasma of children with meningitis and encephalitis/encephalopathy / S. Morichi, Y. Kashiwagi, K. Takekuma // *J. Neurosci.* – 2013. – Vol. 123, № 1. – P. 17-23.
256. Fabian, R.H. Perivascular nitric oxide and superoxide in neonatal cerebral hypoxia-ischemia / R.H. Fabian, J.R. Perez-Polo, T.A. Kent// *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2008. – Vol. 295, № 4. – P. 1809–1814.
257. Feliciano, D.M. Newborn cortical neurons: only for neonates? / D.M. Feliciano, A. Bordey // *Trends in Neurosciences.* - 2013. - Vol.36, № 1. - P. 51–61.
258. Fernald, R.D. Social behaviour: can it change the brain? / R.D. Fernald // *Animal Behaviour.* - 2015. - № 103. - P. 259–265.
259. Fibroblast growth factor-2 induces astroglial and microglial reactivity in vivo / D.R. Goddard, M. Berry, S.L. Kirvell [et al.] // *J. Anat.* – 2002. – Vol. 200, № 1. – P. 57-67.
260. Functional feature of a novel model of blood brain barrier: studies on permeation of test compounds / A. Cestelli, C. Catania, S. D'Agostino [et al.] // *J. Control Release.* – 2001. – Vol. 76. – P. 139-147.
261. Furuse, M. Molecular basis of the core structure of tight junctions / M. Furuse // *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – Vol. 2, № 1. – P. 002907.
262. Garnier, A. Theoretical study on the role of astrocytic activity in neuronal hyperexcitability by a novel neuron-glia mass model / A.Garnier, A. Vidal, H.A. Benali // *Journal of Mathematical Neuroscience.* - 2016. - Vol.6, № 1. - P. 10. doi: 10.1186/s13408-016-0042-0
263. Gautam, J. Laminin differentially regulates the stemness of type I and type II pericytes / J. Gautam, A. Nirwane, Y. Yao // *Stem Cell Res Ther.* - 2017. - Vol.8, № 1. - P. 28. doi: 10.1186/s13287-017-0479-4.

264. Gautam, J. The role of pericytic laminin in blood brain barrier integrity maintenance / J. Gautam, X. Zhang, Y. Yao // *Scientific Reports*. - 2016. - № 6. - P. 36450. doi: 10.1038/srep36450.
265. Generation of induced neurons via direct conversion in vivo / O. Torper, U. Pfisterer, D.A. Wolf [et al.] // *PNAS USA*. – 2013. – Vol. 110, № 17. – P. 7038-7043.
266. Gerhardt, H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting / H. Gerhardt // *Organogenesis*. – 2008. – Vol. 4, № 4. – P. 241-246.
267. Germain, N. Embryonic stem cell neurogenesis and neural specification / N. Germain, E. Banda, L. Grabel // *J. Cell Biochem*. – 2010. – Vol. 111, № 3. – P. 535-542.
268. Glass, H.C. The role of the neurointensive care nursery for neonatal encephalopathy / H.C. Glass, D.H. Rowitch // *Clinics in Perinatology*. - 2016. - Vol.43, № 3. - P. 547–557.
269. Glia and hemichannels: key mediators of perinatal encephalopathy / R. Galinsky, J. O. Davidson, J. M. Dean [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2018. – Vol. 13, № 2. – P. 181–189. doi:10.4103/1673-5374.226378.
270. Glial responses to neonatal hypoxic-ischemic injury in the rat cerebral cortex / S.V. Sizonenko, E.J. Camm, A. Dayer, J.Z. Kiss // *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. - 2008. - Vol.26, № 1. - P. 37–45.
271. GLT1, glial glutamate transporter, is transiently expressed in neurons and develops astrocyte specificity only after midgestation in the ovine fetal brain / F.J. Northington, R.J. Traystman, R.C. Koehler [et al.] // *J. Neurobiol*. – 1999. – Vol. 39, № 4. – P. 515-526.
272. Glucose transporters GLUT4 and GLUT8 are upregulated after facial nerve axotomy in adult mice / O. Gómez, B. Ballester-Lurbe, J.E. Mesonero et al. // *J Anat*. – 2011. – Vol. 219, № 4. – P. 525-530.

273. GLUT4 mobilization supports energetic demands of active synapses / G. Ashrafi, Z. Wu, R.J. Farrell, T.A. Ryan // *Neuron*. - 2017. - Vol.93, № 3. - P. 606–615.
274. Glutamate metabolism in HIV-infected macrophages: implications for the CNS / F. Porcheray, C. Leone, B. Samah [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2006. – Vol. 291. – P. 618-626.
275. Glutamate neurotransmission in rodent models of traumatic brain injury / C.R. Dorsett, J.L. McGuire, E.A. DePasquale [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. - 2017. - Vol.34, № 2. - P. 263–272.
276. Glutamate transporter EAAT2 expression is up-regulated in reactive astrocytes in human periventricular leukomalacia / T.M. Desilva, S.S. Billiards, N.S. Borenstein // *J. Comp. Neurol.* – 2008. – Vol. 508, № 2. – P. 238-248.
277. Glutamate-mediated overexpression of CD38 in astrocytes cultured with neurones / S. Bruzzone, C. Verderio, U. Schenk [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. - 2004. - Vol.89, № 1. - P. 264–272.
278. Goldberg, J.S. Diverse roles of the vasculature within the neural stem cell niche / J.S. Goldberg, K.K. Hirschi // *Regen. Med.* – 2009. – Vol. 4, № 6. – P. 879-897.
279. Gómez-González, B. Altered functional development of the blood-brain barrier after early life stress in the rat / B. Gómez-González, A. Escobar // *Brain Res. Bull.* – 2009. – Vol. 79, № 6. – P. 376-387.
280. Gotz, M. Neurogenesis in the developing and adult brain-similarities and key differences / M. Gotz, M. Nakafuku, D. // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. - 2016. - Vol.8, № 7. - P. 018853. doi: 10.1101/cshperspect.a018853.
281. Gray, S.M. Insulin regulates brain function, but how does it get there? / S.M. Gray, R.I. Meijer, E.J. Barrett // *Diabetes*. - 2014. - Vol. 63, № 12. - P. 3992-3997.
282. Gray, S.M. Unravelling the regulation of insulin transport across the brain endothelial cell / S.M. Gray, K.W. Aylor, E.J. Barrett // *Diabetologia*. - 2017. - Vol.60, № 8. - P. 1512–1521.

283. Grewer, C. SLC1 glutamate transporters / C. Grewer, A. Gameiro, T. Rauen // *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. - 2014. - Vol.466, № 1. - P. 3–24.
284. Gunn, A.J. Hypothermic neuroprotection / A.J. Gunn, M. Thoresen // *NeuroRx*. – 2006. – Vol. 3, № 2. – P. 154-169.
285. Halestrap, A.P. The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease / A.P. Halestrap // *Mol Aspects Med*. - 2013. - Vol. 34, № 2-3. - P. 337-349.
286. Hawkins, B.T. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease / B.T. Hawkins, T.P. Davis // *Pharmacol. Rev.* – 2005. - № 57. – P. 173-185.
287. Hayashi, K. Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier / K. Hayashi, S. Nakao, R. Nakaoka // *Regul. Pept.* – 2004. – Vol. 123. – P. 77-83.
288. High glucose suppresses embryonic stem cell differentiation into neural lineage cells / P. Yang, W.B. Shen, E.A. Reece [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2016. - Vol.472, № 2. - P. 306–312.
289. Hyperosmotic stress induces Axl activation and cleavage in cerebral endothelial cells / I. Wilhelm, P. Nagyoszi, A.E. Farkas [et al.] // *J. Neurochem.* – 2008. – Vol. 107. – P. 116-126.
290. Hypothermia and erythropoietin for neuroprotection after neonatal brain damage / X. Fan, F. van Bel, M. A. van der Kooij [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2013. – Vol. 73, № 1. – P. 18-23.
291. Hypoxia and stretch regulate intercellular communication in vascular smooth muscle cells through reactive oxygen species formation / D.B. Cowan, M. Jones, L.M. Garcia [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. - Vol. 23, № 10. - P. 1754-1760.
292. Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells / T. Koto, K. Takubo, S. Ishida // *Am J Pathol.* – 2007. – Vol. 170, № 4. – P. 1389-1397.

293. Hypoxia/Aglycemia-induced endothelial barrier dysfunction and tight junction protein downregulation can be ameliorated by citicoline / X.Ma, H. Zhang, Q. Pan [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 12. - e82604.
294. Hypoxia-inducible factor 1 contributes to N-acetylcysteine's protection in stroke / Z. Zhang, J. Yan, S. Taheri [et al.] // Free Radical Biology & Medicine. - 2014. - № 68. - P. 8–21.
295. Hypoxia-inducible factor-1alpha signaling in aquaporin upregulation after traumatic brain injury / J.Y. Ding, C.W. Kreipke, S.L. Speirs [et al.] // Neurosci. Lett. – 2009. – Vol. 453, № 1. – P. 68-72.
296. Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat / L.W. Fan, S. Lin, Y. Pang [et al.] // Behav. Brain Res. – 2005. – Vol. 165, № 1. – P. 80-90.
297. Hypoxic preconditioning suppresses glial activation and neuroinflammation in neonatal brain insults / C.Y. Chen, W.Z. Sun, K.H. Kang [et al.] // Mediators of Inflammation. - 2015. - № 2015. - P. 632592. doi: 10.1155/2015/632592.
298. Identification and dynamic regulation of tight junction protein expression in human neural stem cells / A.K. Watters, S. Rom, J.D. Hill [et al.] // Stem Cells and Development. - 2015. - Vol.24, № 12. - P. 1377–1389.
299. IGF-1 can either protect against or increase LPS-induced damage in the developing rat brain / Y. Pang, B. Zheng, L. R. Campbell [et al] // Pediatr. Res. – 2010. – Vol. 67, № 6. – P. 579-584.
300. Iglesias, R.M. Pannexin1-mediated ATP release provides signal transmission between Neuro2A cells/ R.M. Iglesias, D.C. Spray // Neurochem. Res. – 2012. – Vol. 37, № 6. – P. 1355-1363.
301. Immediate remote ischemic postconditioning reduces brain nitrotyrosine formation in a piglet asphyxia model / E. Rocha-Ferreira, B. Rudge, M.P. Hughes [et al.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. - 2016. - Vol.2016. - P. 5763743. doi: 10.1155/2016/5763743.
302. In the hypoxic central nervous system, endothelial cell proliferation is followed by astrocyte activation, proliferation, and increased expression of the

- alpha 6 beta 4 integrin and dystroglycan / L. Li, J.V. Welser, P. Dore-Duffy [et al.] // *Glia*. – 2010. – Vol. 58, № 10. – P. 1157-1167.
303. In vitro models of brain ischemia: the peptidergic drug cerebrolysin protects cultured chick cortical neurons from cell death / B. Gutmann, B. Hutter-Paier, G. Skofitsch [et al.] // *Neurotox. Res.* – 2002. – Vol. 4, № 1. – P. 59-65.
304. In vitro P-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates / J. Rautio, J.E. Humphreys, L.O. Webster [et al.] // *Drug Metab. Dispos.* – 2006. – Vol. 34, № 5. – P. 786-792.
305. Increased cell proliferation in the rat anterior cingulate cortex following neonatal hypoxia: relevance to schizophrenia / E.L. Schaeffern, F. Küh, A. Schmitt [et al.] // *J. Neural. Transm.* – 2012. – Vol. 120, № 1. – P. 187-195.
306. Inflammation occurs early during the A β deposition process in TgCRND8 mice / S. Dudal, P. Krzywkowski, J. Paquette [et al.] // *Neurobiol. Aging*. – 2004. – Vol. 25. – P. 861–871.
307. Inhibition of connexin43 hemichannels impairs spatial short-term memory without affecting spatial working memory / L. Walrave, M. Vinken, G. Albertini [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. - 2016. - № 10. - P. 288. doi: 10.3389/fncel.2016.00288.
308. Inhibition of mitochondrial function in astrocytes: implications for neuroprotection / L.A. Voloboueva, S.W. Suh, R.A. Swanson [et al.] // *J. Neurochem.* – 2007. – Vol. 102, № 4. – P. 1383-1394.
309. Inhibition of nNOS and iNOS following hypoxia-ischaemia improves long-term outcome but does not influence the inflammatory response in the neonatal rat brain / E. R. van den Tweel, C. M. Peeters-Scholte, F. van Bel [et al.] // *Dev. Neurosci.* – 2002. – Vol. 24, № 5. – P. 389-395.
310. Inhibition of SIRT1 impairs the accumulation and transcriptional activity of HIF-1 α protein under hypoxic conditions / A. Laemmle, A. Lechleiter, V. Roh [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 3. – P. 33433. doi: 10.1371/journal.pone.0033433.

311. Injection of neural progenitor cells attenuates decrease in level of connexin 43 in brain capillaries after cerebral ischemia / Y. Moriyama, N. Takagi, C. Itokawa [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2013. – Vol. 543. – P. 152-156.
312. Insulin-like growth factor-1 secreted by brain microvascular endothelial cells attenuates neuron injury upon ischemia / J. Wang, Y. Tang, W. Zhang [et al.] // *FEBS J.* – 2013. – Vol. 280, № 15. – P. 3658-3668.
313. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent / C.A. Grillo, G.G. Piroli, R.M. Hendry, L.P. Reagan // *Brain Research.* - 2009. - № 1296. - P. 35–45.
314. Intact and injured endothelial cells differentially modulate postnatal murine forebrain neural stem cells / J.M. Plane, A.V. Andjelkovic, R.F. Keep [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2010. – Vol. 37, № 1. – P. 218-227.
315. Interleukin-25 expressed by brain capillary endothelial cells maintains blood-brain barrier function in a protein kinase Cepsilon-dependent manner / Y. Sonobe, H. Takeuchi, K. Kataoka [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, № 46. – P. 31834-31842.
316. Intracerebral dialysis and the blood-brain barrier / I. Westergren, B. Nystrom, A. Hamberger [et al.] // *J. Neurochem.* – 1995. – Vol. 64. – P. 229-234.
317. Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990 / A.C. Lee, N. Kozuki, H. Blencowe [et al.] // *Pediatric Research.* - 2013. - Vol. 74, № 1. - P. 50–72.
318. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in expression of the water channel protein aquaporin-4 after ischemia in rat cortical astrocytes / C. Nito, H. Kamada, H. Endo [et al.] // *J. Neurotrauma.* – 2012. – Vol. 29, № 14. – P. 2404-2412.
319. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments / M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Moroi [et al.] // *J. Cell. Biol.* – 1997. – № 138. – P. 181-192.

320. Iron mediates endothelial cell damage and blood-brain barrier opening in the hippocampus after transient forebrain ischemia in rats / S.M. Won, J.H. Lee, U.J. Park [et al.] // *Exp. Mol. Med.* – 2011. – Vol. 43, № 2. – P. 121-128.
321. Janušonis, S. A receptor-based analysis of local ecosystems in the human brain / S. Janušonis // *BMC neuroscience.* - 2017. - Vol. 18, № 1. - P. 33. doi: 10.1186/s12868-017-0355-2.
322. Jiang, X. Cellular and molecular introduction to brain development / X. Jiang, J. Nardelli // *Neurobiology of Disease.* - 2016. - Vol.92, Pt A. - P. 3–17.
323. Jickling, G.C. Blood biomarkers of ischemic stroke / G.C. Jickling, F.R. Sharp // *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.* - 2011. - Vol.8, № 3. - P. 349–360.
324. Johnston, M.V. Mechanisms of hypoxic neurodegeneration in the developing brain / M.V. Johnston, W. Nakajima, H. Hagberg // *Neuroscientist.* – 2002. – Vol. 8, № 3. –P. 212-220.
325. Jones, E.G. Radial columns in cortical architecture: it is the composition that counts / E.G. Jones, P. Rakic // *Cereb. Cortex.* – 2010. – Vol. 20, № 10. – P. 2261-2264.
326. Jonsson, M.K. Impedance-based detection of beating rhythm and proarrhythmic effects of compounds on stem cell-derived cardiomyocytes / M.K. Jonsson, Q.D. Wang, B. Becker // *Assay Drug Dev. Technol.* – 2011. – Vol. 9, № 6. – P.589-599.
327. Jurcovicova, J. Glucose transport in brain - effect of inflammation / J. Jurcovicova // *Endocr Regul.* – 2014. – Vol. 48, № 1. – P. 35-48.
328. K⁺ depolarization evokes ATP, adenosine and glutamate release from glia in rat hippocampus: a microelectrode biosensor study / A. Heinrich, R.D. Andó, G. Túri [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 167, № 5. – P. 1003-1020.
329. Kasischke, K. Lactate fuels the neonatal brain / K. Kasischke // *Front Neuroenergetics.* – 2011. – Vol. 3. – P. 4. doi: 10.3389/fnene.2011.00004.

330. Kim, J. ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy / J. Kim, J.Kim, J.S.Bae [et al.] // *Experimental & Molecular Medicine*. - 2016. - Vol.48, № 11. - P. 269. doi: 10.1038/emm.2016.119.
331. Kniesel, U. Tight junctions of the blood-brain barrier / U. Kniesel, H. Wolburg // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2000. – Vol. 20, № 1. – P. 57-76.
332. Knock-down of endothelial connexins impairs angiogenesis / C. Gärtner, B. Ziegelhöffer, M. Kostelka [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2012. – Vol. 65. – P. 347-357.
333. Kriegstein, A. R. Constructing circuits: neurogenesis and migration in the developing neocortex / A. R. Kriegstein // *Epilepsia*. - 2006. - № 46. - P. 15–21.
334. Label-free monitoring of T cell activation by the impedance-based xCELLigence system / N. Guan, J. Deng, T. Li [et al.] // *Mol. Biosyst.* – 2013. – Vol. 9, № 5. – P. 1035-1043.
335. Lacombe, V.A. Expression and regulation of facilitative glucose transporters in equine insulin-sensitive tissue: from physiology to pathology / V.A. Lacombe // *ISRN veterinary science*. - 2014. - № 2014. - P. 409547. doi: 10.1155/2014/409547.
336. Lactate as a metabolite and a regulator in the central nervous system / P. Proia, C.M. Di Liegro, G. Schiera [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2016. - Vol.17, № 9. - P. 1450. doi: 10.3390/ijms17091450.
337. Lactate in the brain: an update on its relevance to brain energy, neurons, glia and panic disorder / L. Riske, R.K. Thomas, G.B. Baker, S.M. Dursun // *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*. - 2017. - Vol.7, № 2. - P. 85–89.
338. Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons / J. Yang, E. Ruchti, J.M. Petit [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2014. - Vol.111, № 33. - P. 12228–12233.
339. Lactate uptake contributes to the NAD(P)H biphasic response and tissue oxygen response during synaptic stimulation in area CA1 of rat hippocampal slices

- / F. Galeffi, K.A. Foster, M.P. Sadgrove [et al.] // *J. Neurochem.* – 2007. – Vol. 103, № 6. – P. 2449-2461.
340. Lee, H.C. Cyclic ADP-ribose and NAADP: fraternal twin messengers for calcium signaling / H.C. Lee // *Sci China Life Sci.* – 2011. – Vol. 54, № 8. – P. 699-711.
341. Lee, J.H. Neuroprotective mechanisms and translational potential of therapeutic hypothermia in the treatment of ischemic stroke / J.H. Lee, J. Zhang, S.P. Yu // *Neural Regeneration Research.* - 2017. - Vol.12, № 3. - P. 341–350.
342. Lee, M.M. Major Depression: A Role for Hippocampal Neurogenesis? / M.M. Lee, A. Reif, A.G. Schmitt // *Curr. Top Behav. Neurosci.* – 2013. - № 14. – P. 153-179.
343. Lehmann, C. High extracellular glutamate modulates expression of glutamate transporters and glutamine synthetase in cultured astrocytes / C. Lehmann, S. Bette, J. Engele // *Brain Res.* – 2009. – Vol. 1297. – P. 1-8.
344. Leonardo, C. C. Neuroinflammation and MMPs: potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury / C. C. Leonardo, K. R. Pennypacker // *J. Neuroinflamm.* – 2009. – Vol. 6. – P. 13. doi: 10.1186/1742-2094-6-13.
345. Li, Y. Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: mechanisms and possible interventions/ Y. Li, P. Gonzalez, L. Zhang // *Prog. Neurobiol.* – 2012. – Vol. 98, № 2. – P. 145-165.
346. Liddelow, S.A. Fluids and barriers of the CNS: a historical viewpoint / S.A. Liddelow // *Fluids Barriers CNS.* – 2011. – Vol. 8, № 1. – P. 2. doi: 10.1186/2045-8118-8-2
347. Lineage-dependent circuit assembly in the neocortex / P. Gao, K. T. Sultan, X. J. Zhang [et al.] // *Development.* – 2013. – Vol. 140, № 13. – P. 2645-2655.
348. Liu, Z.Q. Western blot: technique, theory and trouble shooting / Z.Q. Liu, T. Mahmood, P.C. Yang [et al.] // *North American Journal of Medical Sciences.* - 2014. - Vol.6, № 3. - P. 160. doi: 10.4103/1947-2714.128482.

349. Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain / H.C. Cooray, C.G. Blackmore, L. Maskell, M.A. Barrand // *Neuroreport*. - 2002. - vol.13, № 16. - P. 2059–2063.
350. Long-term hypoxia increases calcium affinity of BK channels in ovine fetal and adult cerebral artery smooth muscle / X. Tao, T.M. Lin, G.U. Thorington [et al.] // *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. - 2015. - Vol.308, № 7. - P.707-722.
351. Low levels of amyloid-beta and its transporters in neonatal rats with and without hydrocephalus / K.E. Deren, J. Forsyth, O. Abdullah [et al.] // *Cerebrospinal Fluid Res.* – 2009. – Vol. 6. – P. 4. doi: 10.1186/1743-8454-6-4.
352. Maas, M.B. Molecular biomarkers in stroke diagnosis and prognosis / M.B. Maas, K.L. Furie // *Biomark. Med.* – 2009. Vol. 3, № 4. – P. 363-383.
353. Mahmood, T. Western blot: technique, theory, and trouble shooting / T. Mahmood, P.C. Yang // *North American Journal of Medical Sciences*. - 2012. - Vol.4, № 9. - P. 429–434.
354. Mahringer, A. ABC transporters at the blood-brain barrier / A. Mahringer, G. Fricker // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. - 2016. - Vol.12, № 5. - P. 499–508.
355. Martínez-Lozada, Z. Glutamatergic transmission: a matter of three / Z. Martínez-Lozada, A. Ortega // *Neural Plasticity*. - 2015. - Vol.2015. - P.787396. doi: 10.1155/2015/787396.
356. Mashayekhi, F. Quantitative analysis of cerebrospinal fluid brain derived neurotrophic factor in the patients with multiple sclerosis / F. Mashayekhi, Z. Salehi, H R. Jamalzadeh // *Acta Medica*. – 2012. – Vol. 55, № 2. – P. 83-86.
357. Mason, S. Lactate shuttles in neuroenergetics-homeostasis, allostasis and beyond / S. Mason // *Frontiers in Neuroscience*. - 2017. - № 11. - P. 43. doi: 10.3389/fnins.2017.00043.
358. Mater, S. Kinetics of penetration of drugs and other foreign compounds into cerebrospinal fluid and brain / S. Mater, R.P. Maickel, B.B. Brodie // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1959. – Vol. 127. - № 205 – 211.

359. Maternal diabetes and fetal hypoxia / K. Teramo, M. Klemetti, M. Tikkanen [et al.] // *Duodecim.* – 2013. – Vol. 129, № 3. – P. 228-234.
360. Maternal smoking is associated with mitochondrial DNA depletion and respiratory chain complex III deficiency in placenta / N. Bouhours-Nouet, P. May-Panloup, R. Coutant [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2005. – Vol. 288. – P. 171-177.
361. Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke / S.E. Lakhan, A. Kirchgessner, D. Tepper [et al.] // *Front. Neurol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 32. doi: 10.3389/fneur.2013.00032.
362. McGivan, J.D. The transport of glutamine into mammalian cells / J.D. McGivan, C.I. Bungard // *Front. Biosci.* – 2007. – Vol. 12. – P. 874-882.
363. MDR1-P-Glycoprotein (ABCB1) Mediates Transport of Alzheimer's amyloid-beta peptides--implications for the mechanisms of Abeta clearance at the blood-brain barrier / D. Kuhnke D, G. Jedlitschky, M. Grube [et al.] // *Brain Pathology (Zurich, Switzerland).* - 2007. - Vol.17, № 4. - P. 347–353.
364. Measurement of cerebral glucose utilization using washout after carotid injection in the rat / W.H. Oldendorf, W.M. Pardridge, L.D. Braun [et al.] // *J. Neurochem.* – 1982. – Vol. 38. – P. 1413-1418.
365. Mechanisms of impaired mitochondrial energy metabolism in acute and chronic neurodegenerative disorders / L. Soane, S. Kahraman, T. Kristian, G. Fiskum // *Journal of Neuroscience Research.* - 2007. - Vol.85, № 15. - P. 3407–3415.
366. Meconium fluid. Significance and management / P. Debodinance, A. Hennion, D. Querleu [et al.] // *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.* – 1988. – Vol. 83, № 1. – P. 1-12.
367. Meconium-stained amniotic fluid and maternal and neonatal factors associated / R.H. Osava, F.M. da Silva, S.M. Vasconcellos de Oliveira // *Rev. Saude. Publica.* – 2012. – Vol. 46, № 6. – P. 1023-1029.

368. Metabolic communication between astrocytes and neurons via bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase / H.B. Choi, G.R. Gordon, N. Zhou [et al.] // *Neuron*. – 2012. – Vol. 75, № 6. – P. 1094-1104.
369. Metabolic inhibition activates a non-selective current through connexin hemichannels in isolated ventricular myocytes / R.P. Kondo, S.Y. Wang, S.A. John [et al.] // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2000. - Vol. 32, № 10. – P. 1859-1872.
370. Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats / M. Kanazawa, M. Miura, M. Toriyabe [et al.] // *Scientific Reports*. - 2017. - № 7. - P. 42582. doi: 10.1038/srep42582.
371. Microvascular anomaly conditions in psychiatric disease. Schizophrenia - angiogenesis connection / P. Katsel, P. Roussos, M. Pletnikov, M. Haroutunian // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. - 2017. - №77. - P. 327–339.
372. Miller, D.S. Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier / D.S. Miller // *Trends in Pharmacological Sciences*. - 2010. - Vol.31, № 6. - P. 246–254.
373. Miller, J.M. Reduction of astrogliosis and microgliosis by cerebrospinal fluid shunting in experimental hydrocephalus / J.M. Miller, J.P. McAllister // *Cerebrospinal Fluid Res.* – 2007. - № 4. – P. 5. doi:10.1186/1743-8454-4-5.
374. Minkiewicz, J. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome activated by ATP / J. Minkiewicz, J.P. de Rivero Vaccari, R.W. Keane // *Glia*. – 2013. – Vol. 61, № 7. – P. 1113-1121.
375. Minocycline protects the immature white matter against hyperoxia / T. Schmitz, G. Krabbe, G. Weikert [et al.] // *Experimental Neurology*. - 2014. - № 254. - P. 153–165.
376. Mitani, A. Functional changes of glial glutamate transporter GLT-1 during ischemia: an in vivo study in the hippocampal CA1 of normal mice and mutant mice lacking GLT-1 / A. Mitani, K. Tanaka // *J. Neurosci.* – 2003. – Vol. 23. – P. 7176–7182.

377. Modeling the blood-brain barrier using stem cell sources / E.S. Lippmann, A. Al-Ahmad, S.P. Palecek [et al.] // *Fluids Barriers CNS*. – 2013. – Vol. 10, № 1. – P. 2. doi: 10.1186/2045-8118-10-2.
378. Molecular determinants of blood–brain barrier permeation / W.J. Geldenhuys, A.S. Mohammad, C.E. Adkins, P.R. Lockman // *Therapeutic Delivery*. - 2015. - Vol.6, № 7. - P. 961–971.
379. Monocarboxylate transporter-dependent mechanism confers resistance to oxygen- and glucose-deprivation injury in astrocyte-neuron co-cultures / C. Gao, L. Zhou, W. Zhu // *Neuroscience Letters*. - 2015. - № 594. - P. 99–104.
380. Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer / J. Perez-Escuredo, V.F. Van Hee, M. Sboarina [et al.] // *Biochimica Et Biophysica Acta*. - 2016. - Vol.1863, № 10. - P. 2481–2497.
381. Morbid obesity: pregnancy risks, birth risks and status of the newborn / V. Briese, M. Voigt, M. Hermanussen [et al.] // *Homo*. – 2010. – Vol. 61, № 1. – P. 64-72.
382. mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting / S. Ohtsuki, H. Yamaguchi, Y. Katsukura [et al.] // *J. Neurochem*. – 2008. – № 104. – P. 147-154.
383. Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells / A. Régina, A. Koman, M. Piciotti [et al.] // *J. Neurochem*. – 1998. – Vol. 71. – P. 705-715.
384. Mutafova-Yambolieva, V.N. The purinergic neurotransmitter revisited: a single substance or multiple players? / V.N. Mutafova-Yambolieva, L. Durnin // *Pharmacology & Therapeutics*. - 2014. - Vol.144, № 2. - P. 162–191.
385. Naus, C.C. Bridging the gap to therapeutic strategies based on connexin/pannexin biology / C.C. Naus, C. Giaume // *Journal of Translational Medicine*. - 2016. - Vol.14, № 1. - P. 330.
386. Nazer, B. LRP promotes endocytosis and degradation, but not transcytosis, of the amyloid-beta peptide in a blood-brain barrier in vitro model / B. Nazer, S. Hong, D.J. Selkoe // *Neurobiol. Dis*. – 2008. – Vol. 30. – P. 94-102.

387. Negative impact of AQP-4 channel inhibition on survival of retinal ganglion cells and glutamate metabolism after crushing optic nerve / Y. Nishikawa, H. Oku, S. Morishita [et al.] // *Experimental Eye Research*. - 2016. - № 146. - P. 118–127.
388. Nelson, K.B. Apgar scores as predictors of chronic neurologic disability / K.B. Nelson, J.H. Ellenberg // *Pediatrics*. – 1981. – Vol. 68, № 1. – P. 36-44.
389. Neonatal hypoxia ischaemia: mechanisms, models, and therapeutic challenges / L.J. Millar, L. Shi, A. Hoerder-Suabedissen, Z. Molnar // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. - 2017. - № 11. - P. 78. doi: 10.3389/fncel.2017.00078.
390. Neurobehavioral outcomes in children after out-of-hospital cardiac arrest / B.S. Slomine, F.S. Silverstein, J.R. Christensen [et al.] // *Pediatrics*. - 2016. - Vol. 137, № 4. - P. 20153412. doi: 10.1542/peds.2015-3412.
391. Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain / D. Echevarria, C. Vieira, L. Gimeno [et al.] // *Br. Res. Rev.* – 2003. – Vol. 43. – P. 179–191.
392. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here / M.K. Tobin, J.A. Bonds, R.D. Minshall [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. - 2014. - Vol.34, № 10. - P. 1573–1584.
393. Neurogenic and non-neurogenic functions of endogenous neural stem cells / E. Butti, M. Cusimano, M. Bacigaluppi, G. Martino // *Frontiers in Neuroscience*. - 2014. - № 8. - P. 92. doi: 10.3389/fnins.2014.00092.
394. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation / F. Corrigan, K.A. Mander, A.V. Leonard, R. Vink // *Journal of Neuroinflammation*. - 2016. - Vol.13, № 1. - P. 264.
395. Neuroglial activation and Cx43 expression are reduced upon transplantation of human umbilical cord blood cells after perinatal hypoxic-ischemic injury / B. Wasielewski, A. Jensen, A. Roth-Harer [et al.] // *Brain Res.* – 2012. – № 1487. – P. 39-53.

396. Neuroinflammation induces neurodegeneration / D. Kempuraj, R. Thangavel, P.A. Natteru [et al.] // *Journal of Neurology, Neurosurgery and Spine*. - 2016. - Vol.1, № 1. - P. 1003.
397. Neuronal activity mediated regulation of glutamate transporter GLT-1 surface diffusion in rat astrocytes in dissociated and slice cultures / S. Awabdh, S. Gupta-Agarwal, D.F. Sheehan [et al.] // *Glia*. - 2016. - Vol. 64, № 7. - P. 1252–1264.
398. Neuroprotective activity of peripherally administered liver growth factor in a rat model of Parkinson's disease / R. Gonzalo-Gobernado, L. Calatrava-Ferreras, D. Reimers [et al.] // *PloS One*. - 2013. - Vol.8, № 7. - P. 67771. doi: 10.1371/journal.pone.0067771.
399. Neuroprotective effect of acid-sensing ion channel inhibitor psalmotoxin-1 after hypoxia-ischemia in newborn piglet striatum / Z.J. Yang, X. Ni, E.L. Carter [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2011. – Vol. 43, № 2. – P. 446-454.
400. Neuroprotective effect of simvastatin in stroke: a comparison between adult and neonatal rat models of cerebral ischemia / M. Cimino, W. Balduini, S. Carloni [et al.] // *Neurotoxicology*. – 2005. – Vol. 26, № 5. – P. 929-933.
401. Neuroprotective effects of tanshinone I from Danshen extract in a mouse model of hypoxia-ischemia / J.C. Lee, J.H. Park, O.K. Park [et al.] // *Anat. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 46, № 3. – P. 183-190.
402. Neuroprotective strategies after neonatal hypoxic ischemic encephalopathy / B.J. Dixon, C. Reis, W.M. Ho [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2015. - Vol.16, № 9. - P. 22368–22401.
403. Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function / C.D. Collard, K.A. Park, M.C. Montalto [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 17. – P. 14801-14811.
404. Neville, H. Human brain plasticity: evidence from sensory deprivation and altered language experience / H. Neville, D. Bavelier // *Prog. Brain Res.* – 2002. – № 138. – P. 177-188.

405. New antioxidant drugs for neonatal brain injury / M.L. Tataranno, S. Perrone, M. Longini, G. Buonocore // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. - 2015. - Vol. 2015. - P. 108251. doi: 10.1155/2015/108251.
406. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain / M. Nedergaard, B. Ransom, S.A. Goldman // *Trends Neurosci.* – 2003. – Vol. – 26, № 10. – P. 523-530.
407. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates / P.J. Bernier, A. Bedard, J. Vinet [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2002. - Vol.99, № 17. - P. 11464–11469.
408. Ngo, S.T. The interplay between metabolic homeostasis and neurodegeneration: insights into the neurometabolic nature of amyotrophic lateral sclerosis / S.T. Ngo, F.J. Steyn // *Cell Regeneration*. - 2015. -Vol.4, № 1. - P. 5. doi: 10.1186/s13619-015-0019-6.
409. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate plays a critical role in naive and effector murine T cells but not natural regulatory T cells / R.A. Ali, C. Camick, K.Wiles [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2016. - Vol.291, № 9. - P. 4503–4522.
410. NMDA receptor antagonist felbamate reduces behavioral deficits and blood-brain barrier permeability changes after experimental subarachnoid hemorrhage in the rat / A. Germanò, M. Caffo, F.F. Angileri [et al.] // *J. Neurotrauma*. – 2007. – Vol. 24, № 4. – P. 732-744.
411. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain / M. Bernaudin, A.S. Nedelec, D. Divoux [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2002. – Vol. 22, № 4. – P. 393-403.
412. Northrop, N.A. Persistent neuroinflammatory effects of serial exposure to stress and methamphetamine on the blood-brain barrier / N.A. Northrop, B.K.

Yamamoto // *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. - 2012. - Vol.7, № 4. - P. 951–968.

413. Nunez, J. Sex and steroid hormones in early brain injury / J. Nunez // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* – 2012. – Vol. 13, №3. – P. 173-186.

414. Oldendorf, W.H. Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard / W.H. Oldendorf // *Brain Res.* – 1970. – Vol. 24. – P. 372 – 376.

415. Oldendorf, W.H. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat / W.H. Oldendorf, M.E. Cornford, W.J. Brown // *Annals of Neurology*. - 1977. - Vol.1, № 5. - P. 409–417.

416. Opris, I. Inter-laminar microcircuits across neocortex: repair and augmentation / I. Opris // *Frontiers in Systems Neuroscience*. - 2013. - № 7. - P. 80. doi: 10.3389/fnsys.2013.00080.

417. Orchestration of neuronal differentiation and progenitor pool expansion in the developing cortex by Sox2 genes / C. Chen, G.A. Lee, A. Pourmorady [et al.] // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. - 2015. - Vol.35, № 29. -P. 10629–10642.

418. Ortinau, C. The neuroanatomy of prematurity: normal brain development and the impact of preterm birth / C. Ortinau, J. Neil // *Clinical Anatomy*. - 2015. - Vol.28, № 2. - P. 168–183.

419. Overexpression of netrin-1 increases the expression of tight junction-associated proteins, claudin-5, occludin, and ZO-1, following traumatic brain injury in rats / J. Wen, S. Qian, Q. Yang et al. // *Exp Ther Med*. – 2014. – Vol. 8, № 3. – P. 881-886.

420. Overweight worsens apoptosis, neuroinflammation and blood-brain barrier damage after hypoxic ischemia in neonatal brain through JNK hyperactivation / Y.F. Tu, Y.S. Tsai, L.W. Wang [et al.] // *J. Neuroinflammation*. – 2011. – Vol. 8. – P. 40. doi: 10.1186/1742-2094-8-40.

421. P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats / H. Franke, A. Günther, J. Grosche / *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2004. – Vol. 63, № 7. – P. 686-699.
422. Pandey, P.K. Blood brain barrier: An overview on strategies in drug delivery, realistic in vitro modeling and in vivo live tracking / P.K. Pandey, A.K. Sharma, U. Gupta // *Tissue Barriers.* - 2016. - Vol.4, № 1. - P. 1129476. doi: 10.1080/21688370.2015.1129476.
423. Pannexin channel and connexin hemichannel expression in vascular function and inflammation / D. Begandt, M.E. Good, A.S. Keller [et al.] // *BMC cell biology.* - 2017. - Vol.18, № 1. - P. 2. 10.1186/s12860-016-0119-3.
424. Papadopoulos, M. C. Potential utility of aquaporin modulators for therapy of brain disorders / M. C. Papadopoulos, A.S. Verkman // *Prog. Brain Res.* – 2008. – Vol. 170. – P. 589-601.
425. Parpura, V. Astrocytes revisited: concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling / V. Parpura, A. Verkhratsky // *Croatian Medical Journal.* - 2012. - Vol.53, № 6. - P. 518–528.
426. Parpura, V. Homeostatic function of astrocytes: Ca(2+) and Na(+) signalling / V. Parpura, A. Verkhratsky // *Translational Neuroscience.* - 2012. - Vol.3, № 4. - P. 334–344.
427. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs / K.M. Mahar Doan, J.E. Humphreys, L.O. Webster [et al.] // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* - 2002. - Vol.303, № 3. - P. 1029–1037.
428. PECAM1(+)/Sca1(+)/CD38(+) vascular cells transform into myofibroblast-like cells in skin wound repair / J. Etich, V. Bergmeier, C. Frie [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 53262. doi: 10.1371/journal.pone.0053262.
429. Perinatal asphyxia associated with early neonatal mortality: populational study of avoidable deaths / M. Daripa, H.M. Caldas, L.P. Flores [et al.] // *Rev. Paul. Pediatr.* – 2013. – Vol. 31, № 1. – P. 37-45.

430. Perinatal brain injury as a consequence of preterm birth and intrauterine inflammation: designing targeted stem cell therapies / M.C.B. Paton, C.A. McDonald, B.J. Allison [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. - 2017. - № 11. - P. 200. doi: 10.3389/fnins.2017.00200.
431. Perinatal mortality and socio-spatial inequalities / E.F. Martins, E.M. Rezende, M.C. Almeida [et al.] // *Rev. Lat. Am. Enfermagem*. – 2013. – Vol. 21, № 5. – P. 1062-1070.
432. Perinatal risk factors for neonatal encephalopathy: an unmatched case-control study / C. J. Tann, M. Nakakeeto, B. A. Willey [et al.] // *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition*. – 2018. – Vol. 103, № 3. – P. 250-256. doi:10.1136/archdischild-2017-312744.
433. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology / M.A. Deli, C.S. Abrahám, Y. Kataoka [et al.] // *Cell Mol. Neurobiol.* - 2005. – Vol. 25. – P. 59-127.
434. Permeating the blood brain barrier and abrogating the inflammation in stroke: implications for stroke therapy / C.V. Borlongan, L.E. Glover, P.R. Sanberg [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* – 2012. – Vol.18, № 25. – P. 3670-3676.
435. Pfenninger, J. Survivors with bad outcome after hypoxic-ischaemic encephalopathy: full-term neonates compare unfavourably with children / J. Pfenninger, D. Bachmann, B.P. Wagner // *Swiss Med. Wkly.* – 2001. – Vol. 131, № 19-20. – P. 267-272.
436. Pharmacological neuroprotection after perinatal hypoxic-ischemic brain injury / X. Fan, A. Kavelaars, C.J. Heijnen [et al.] // *Curr. Neuropharmacol.* – 2010. – Vol. 8, № 4. – P. 324-334.
437. Pignata, A. Commissural axon navigation: Control of midline crossing in the vertebrate spinal cord by the semaphorin 3B signaling / A. Pignata, H. Ducuing, V.Castellani // *Cell Adhesion & Migration*. - 2016. - Vol.10, № 6. - P. 604–617.
438. PKC α promotes the mesenchymal to amoeboid transition and increases cancer cell invasiveness / K. Vaskovicova, E. Szabadosova, V. Cermak [et al.] // *BMC cancer*. - 2015. - № 15. - P. 326. doi: 10.1186/s12885-015-1347-1.

439. Plasminogen activator inhibitor-1 mitigates brain injury in a rat model of infection-sensitized neonatal hypoxia-ischemia / D. Yang, Y.Y. Sun, N. Nemkul [et al.] // *Cereb. Cortex.* – 2013. – Vol. 23, № 5. – P. 1218-1229.
440. Platt, M.J. Long-term outcome for very preterm infants / M.J. Platt // *The Lancet.* - 2008. - Vol.371, № 9615. - P. 787-788. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60354-2.
441. Pluripotent possibilities: human umbilical cord blood cell treatment after neonatal brain injury / T. Verina, A. Fatemi, M.V. Johnston [et al.] // *Pediatr. Neurol.* – 2013. – Vol. 48, № 5. – P. 346-354.
442. Population-based study of blood biomarkers in prediction of subacute recurrent stroke / H.C. Segal, A.I. Burgess, D.L. Poole [et al.] // *Stroke.* - 2014. - Vol.45, № 10. - P. 2912–2917.
443. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment / A.D. Tramontin, J.M. García-Verdugo, D.A. Lim [et al.] // *Cereb. Cortex.* – 2003. – Vol. 13, № 6. – P. 580-587.
444. Postnatal proteasome inhibition induces neurodegeneration and cognitive deficiencies in adult mice: a new model of neurodevelopment syndrome / R. Romero-Granados, A. Fontan-Lozano, F. J. Aguilar-Montilla, A.M. Carrion // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6, № 12. – P. 1-10. doi: 10.1371/journal.pone.0028927
445. Pre-conditioning induces the precocious differentiation of neonatal astrocytes to enhance their neuroprotective properties / E. Sen, A. Basu, L.B. Willing [et al.] // *ASN Neuro.* – 2011. – Vol. 3, № 3. – P. e00062. doi: 10.1042/AN20100029.
446. Prenatal activation of Toll-like receptors-3 by administration of the viral mimetic poly(I:C) changes synaptic proteins, N-methyl-D-aspartate receptors and neurogenesis markers in offspring / C.M. Forrest, O.S. Khalil, M. Pizar [et al.] // *Mol. Brain.* – 2012. – Vol. 5, № 1. – P. 22. doi: 10.1186/1756-6606-5-22.
447. Preservation of the blood brain barrier and cortical neuronal tissue by liraglutide, a long acting glucagon-like-1 analogue, after experimental traumatic

- brain injury / J. Hakon, K. Ruscher, B. Romner, G. Tomasevic // *PloS One*. - 2015. - Vol.10, № 3. - P. 0120074. doi: 10.1371/journal.pone.0120074.
448. Preterm Hypoxic-ischemic encephalopathy / K.R. Gopagondanahalli, J. Li, M.C. Fahey [et al.] // *Frontiers in Pediatrics*. - 2016. - № 4. - P. 114.
449. Prodeath or prosurvival: two facets of hypoxia inducible factor-1 in perinatal brain injury / W. Chen, R.P. Ostrowski, A. Obenaus [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2009. – Vol. 216, № 1. – P. 7–15.
450. Proteomic and transcriptomic study of brain microvessels in neonatal and adult mice / B. Porte, C. Chatelain, J. Hardouin [et al.] // *PloS One*. - 2017. - Vol.12, № 1. - P. 0171048. doi: 10.1371/journal.pone.0171048.
451. Pulli, B. Imaging Neuroinflammation - from Bench to Bedside / B. Pulli, J.W. Chen // *Journal of Clinical & Cellular Immunology*. - 2014. - № 5. - P. 226.
452. Pyruvate protects the brain against ischemia-reperfusion injury by activating the erythropoietin signaling pathway / M.G. Ryou, R. Liu, M. Ren [et al.] // *Stroke*. - 2012. - Vol. 43, № 4. - P. 1101-1107.
453. Quail, D.F. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors / D.F. Quail, J.A. Joyce // *Cancer Cell*. - 2017. - Vol.31, № 3. - P. 326–341.
454. Rac1 is a critical mediator of endothelium-derived neurotrophic activity / N. Sawada, H.H. Kim, M.A. Moskowitz [et al.] // *Sci. Signal.* – 2009. – Vol. 2, № 61. – P. 10. doi: 10.1126/scisignal.2000162.
455. Rafalski, V.A. Energy metabolism in adult neural stem cell fate / V.A. Rafalski, A. Brunet // *Prog. Neurobiol.* – 2011. – Vol. 93, № 2. – P. 182-203.
456. Rakic, P. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence / P. Rakic // *Nature Reviews. Neuroscience*. - 2002. - Vol.3, № 1. - P. 65–71.
457. Rakic, P. The radial edifice of cortical architecture: from neuronal silhouettes to genetic engineering / P. Rakic // *Br. Res. Rev.* – 2007. – Vol. 55. – P. 204-219.
458. Ramos, C.J. The role of small GTPases and EPAC-Rap signaling in the regulation of the blood-brain and blood-retinal barriers / C.J. Ramos, D.A.

- Antonetti // Tissue Barriers. - 2017. - e1339768. doi: 10.1080/21688370.2017.1339768.
459. Rasagiline is neuroprotective in an experimental model of brain ischemia in the rat / Z. Speiser, A. Mayk, L. Litinetsky [et al.] // J. Neural. Transm. – 2007. – Vol. 114, № 5. – P. 595-605.
460. Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling / G. Schreibelt, G. Kooij, A. Reijerkerk [et al.] // FASEB. – 2007. – Vol. 21. – P. 3666-3676.
461. Reduced cerebral monocarboxylate transporters and lactate levels by ethanol and normobaric oxygen therapy in severe transient and permanent ischemic stroke / X. Geng, C.A. Sy, T.D. Kwiecien [et al.] // Brain Res. - 2015. - № 1603. - P. 65-75.
462. Regional distribution of SGLT activity in rat brain in vivo / A.S. Yu, B.A. Hirayama, G. Timbol [et al.] // Am J Physiol Cell Physiol. – 2013. – Vol. 304, № 3. – P. 240-247.
463. Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract / Y. Meier, J.J. Eloranta, J. Darimont [et al.] // Drug Metab. Dispos. – 2007. – № 35. – P. 590-594
464. Regulation of ABC efflux transporters at blood-brain barrier in health and neurological disorders / H. Qosa, D.S. Miller, P. Pasinelli, D. Trotti // Brain Research. - 2015. - Vol.1628, Pt B. -P. 298–316.
465. Regulation of gamma-glutamyl-transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells / F. Roux, O. Durieu-Trautmann, N. Chaverot [et al.] // J. Cell. Physiol. – 1994. – Vol. 159. – P. 101-113.
466. Regulation of hemichannels and gap junction channels by cytokines in antigen-presenting cells / P.J. Saez, K.F. Shoji, A. Aguirre, J.C. Saez // Mediators of Inflammation. - 2014. - Vol. 2014. - P. 742734. doi: 10.1155/2014/742734.
467. Relation between cerebral oxidative metabolism following birth asphyxia, and neurodevelopmental outcome and brain growth at one year / S.C. Roth, A.D.

Edwards, E.B. Cady [et al.] // *Dev. Med. Child. Neurol.* – 1992. – Vol. 34, № 4. – P. 85-95.

468. Release, neuronal effects and removal of extracellular β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD⁺) in the rat brain / L. Durnin, Y. Dai, I. Aiba [et al.] // *The European Journal of Neuroscience.* - 2012. - Vol.35, № 3. - P. 423–435.

469. Reversible disruption of tight junction complexes in the rat blood-brain barrier, following transitory focal astrocyte loss / C.L. Willis, L. Leach, G.J. Clarke [et al.] // *Glia.* – 2004. – № 48. – P. 1-13.

470. Rice, J. The influence of immaturity on hypoxia-ischemic brain damage in the rat / J. Rice, R. Vannucci, J. Brierley // *Ann. Neurol.* – 1981. – № 9. – P. 131-141.

471. Rimmele, T.S. GLT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter / T.S. Rimmele, P.A. Rosenberg // *Neurochemistry International.* - 2016. - № 98. - P. 19–28.

472. Roberts, R.C. Localization of excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 in human postmortem cortex: a light and electron microscopic study / R.C. Roberts, J.K. Roche, R.E. McCullumsmith // *Neuroscience.* - 2014. - № 277. - P. 522–540.

473. Robinson, G. E. Genes and social behavior / G. E. Robinson, R. D. Fernald, D. F. Clayton // *Science.* – 2008. – Vol. 322, № 5903. – P. 896-900.

474. Rodent hypoxia-ischemia models for cerebral palsy research: a systematic review / P. Rumajogee, T. Bregman, S.P. Miller [et al.] // *Frontiers in Neurology.* - 2016. - № 7. - P. 57. doi: 10.3389/fneur.2016.00057.

475. Role of antioxidants in neonatal hypoxic-ischemic brain injury: new therapeutic approaches / O. Arteaga, A. Alvarez, M. Revuelta [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* - 2017. - Vol.18, № 2. - E265. doi: 10.3390/ijms18020265.

476. Role of astroglial hemichannels and pannexons in memory and neurodegenerative diseases / J.A. Orellana, M.A. Retamal, R. Moraga-Amaro, J.

- Stehberg // *Frontiers in Integrative Neuroscience*. - 2016. - № 10. - P. 26. doi: 10.3389/fnint.2016.00026.
477. Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue / J.E. Contreras, H.A. Sanchez, L.P. Veliz [et al.] // *Brain Res. Brain Res. Rev.* – 2004. – Vol. 47, № 1-3. – P. 290-303.
478. Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics / K. Kim, S.G. Lee, T.P. Kegelman [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. - 2011. - Vol.226, № 10. - P. 2484–2493.
479. Role of gap junction protein connexin43 in astrogliosis induced by brain injury / N. Theodoric, J.F. Bechberger, C.C. Naus [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. 47311. doi: 10.1371/journal.pone.0047311.
480. Role of metabotropic glutamate receptors in oligodendrocyte excitotoxicity and oxidative stress / W. Deng, H. Wang, P. A. Rosenberg [et al.] // *PNAS U S A*. – 2004. – Vol. 101, № 20. – P. 7751-7756.
481. Role of P38 signaling pathway in neonatal rat astrocyte swelling and aquaporin-4 expression after oxygen-glucose deprivation and recovery / Z. Tang, Z. Liao, Y. Xie [et al.] // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. – 2012. – Vol. 32, № 2. – P. 141-145.
482. Role of Rac1 GTPase in NADPH oxidase activation and cognitive impairment following cerebral ischemia in the rat / L. Raz, Q.G. Zhang, C.F. Zhou [et al.] // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, № 9. – P. 12606. doi: 10.1371/journal.pone.0012606.
483. Roles and mechanisms of the CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose/Ca(2+) signaling pathway / W. Wei, R. Graeff, J. Yue // *World Journal of Biological Chemistry*. - 2014. - Vol.5, № 1. - P. 58–67.
484. ROS, Notch, and Wnt signaling pathways: crosstalk between three major regulators of cardiovascular biology / C. Caliceti, P. Nigro, P. Rizzo, R. Ferrari // *BioMed Research International*. - 2014. - Vol. 2014. - P. 318714. doi: 10.1155/2014/318714.

485. Rosafio, K. Oxygen tension controls the expression of the monocarboxylate transporter MCT4 in cultured mouse cortical astrocytes via a hypoxia-inducible factor-1 α -mediated transcriptional regulation / K. Rosafio, L. Pellerin // *Glia*. – 2014. – Vol. 62, №3. – P. 477-490.
486. Rossi, D.J. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia / D.J. Rossi, J.D. Brady, C. Mohr // *Nat. Neurosci.* – 2007. – Vol. 10, № 11. – P. 1377-1386.
487. Saha, B. Potentials of endogenous neural stem cells in cortical repair / B. Saha, M. Jaber, A. Gaillard // *Front. Cell Neurosci.* – 2012. – Vol. 6, № 14. – P. 1-10. doi: 10.3389/fncel.2012.00014.
488. Sarnat, H.B. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study / H.B. Sarnat, M.S. Sarnat // *Arch. Neurol.* – 1976. – Vol. 33, № 10. – P. 696-705.
489. Saunders, N.R. Barrier mechanisms in the developing brain /N.R. Saunders, S.A. Liddelow, K.M. Dziegielewska // *Front. Pharmacol.* – 2012. - № 3. – P. 46. doi: 10.3389/fphar.2012.00046.
490. Schwab, C. Inflammation in transgenic mouse models of neurodegenerative disorders / C. Schwab, A. Klegeris, P.L. McGeer // *Biochimica Et Biophysica Acta*. - 2010. - Vol. 1802, № 10. - P. 889–902.
491. Selective inhibition of Cx43 hemichannels by Gap19 and its impact on myocardial ischemia/reperfusion injury / N. Wang, E. de Vuyst, R. Ponsaerts [et al.] // *Basic Res. Cardiol.* – 2013. – Vol. 108, № 1. – P. 309. doi: 10.1007/s00395-012-0309-x.
492. Sequential roles for Mash1 and Ngn2 in the generation of dorsal spinal cord interneurons. / A.W. Helms, J. Battiste, R.M. Henke [et al.] // *Development*. – 2005. – Vol. 132, № 12. – P. 2709-2719.
493. Shankaran, S. Neonatal encephalopathy: treatment with hypothermia / S. Shankaran // *J. Neurotrauma*. – 2009. – Vol. 26, № 3. – P. 437-443.

494. Siegel, C. NAD⁺ depletion or PAR polymer formation: which plays the role of executioner in ischaemic cell death? / C. Siegel, L.D. McCullough // *Acta Physiol. (Oxf)*. – 2011. – Vol. 203, № 1. – P. 225-234.
495. Signalling crosstalk in FGF2-mediated protection of endothelial cells from HIV-gp120 / D. Langford, R. Hurford, M. Hashimoto [et al.] // *BMC Neurosci*. – 2005. – Vol. 6. – P. 8-23.
496. SIRT6 regulates Ras-related protein R-Ras2 by lysine defatty-acylation / X. Zhang, N.A. Spiegelman, O.D. Nelson [et al.] // *eLife*. - 2017. - № 6. - P. 25158. doi: 10.7554/eLife.25158.
497. SLC1A5 mediates glutamine transport required for lung cancer cell growth and survival / M. Hassanein, M.D. Hoeksema, M. Shiota [et al.] // *Clin. Cancer Res*. – 2013. – Vol. 19, № 3. – P. 560-570.
498. Smith, D.K. Physiological, pathological, and engineered cell identity reprogramming in the central nervous system / D.K. Smith, L.-L.Wang, C.-L. Zhang // *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*. - 2016. - Vol.5, № 4. - P. 499–517.
499. Sonnewald, U. Pharmacology and toxicology of astrocyte-neuron glutamate transport and cycling / U. Sonnewald, H. Qu, M. Aschner // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. – 2002. – Vol. 301, № 1. – P. 1-6.
500. Sorge, N.M. Defense at the border: the blood-brain barrier versus bacterial foreigners / N.M. Sorge, K.S. Doran // *Future Microbiol*. – 2012. – Vol. 7, № 3. – P. 383-394.
501. Spatial and temporal expression of P-glycoprotein in the congenitally hydrocephalic HTX rat brain / S. Kuwahara, Y. Sada, T. Moriki [et al.] // *Pathol. Res. Pract*. – 1996. – Vol. 192, № 5. – P. 496-507.
502. Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult / H. Jiao, Z. Wang, Y. Liu et al. // *J Mol Neurosci*. – 2011 – Vol. 44, №2. – P. 130-139.

503. Stanimirovic, D.B. Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? / D.B. Stanimirovic, A. Friedman // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2012. – Vol. 32, № 7. – P. 1207-1221.
504. Staribratova, D. Placental chorangiosis associated with abruption and hypoxia / D. Staribratova, N. Milchev // *Akush. Ginekol. (Sofia)*. – 2009. – Vol. 48, № 5. – P. 44-46.
505. Steroid biosynthesis and renal excretion in human essential hypertension: association with blood pressure and endogenous ouabain / G. Tripodi, L. Citterio, T. Kouznetsova [et al.] // *Am. J. Hypertens.* – 2009. – Vol. 22, № 4. – P. 357-363.
506. Stewart, P. A. Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: A study using quail-chick transplantation chimeras / P. A. Stewart, M. J. Wiley // *Develop. Biol.* – 1981. – Vol. 84. – P. 183-192.
507. Stobart, J.L. Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply / J.L. Stobart, C.M. Anderson // *Frontiers in Cellular Neuroscience.* - 2013. - № 7. - P. 38. doi: 10.3389/fncel.2013.00038.
508. Strain differences in behavioral and cellular responses to perinatal hypoxia and relationships to neural stem cell survival and self-renewal: Modeling the neurovascular niche / Q. Li, J. Liu, M. Michaud [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2009. – Vol. 175, № 5. – P. 2133-2146.
509. Structural and functional variations in capillary systems within the brain / J. Fenstermacher, P. Gross, N. Sposito [et al.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1988. – Vol. 529. – P. 21-30.
510. Structure and binding mechanism of vascular endothelial cadherin: a divergent classical cadherin / J. Brasch, O.J. Harrison, G. Ahlsen [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 408, № 1. – P. 57-73.
511. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids / R.A. Hawkins, R.L. O'Kane, I.A. Simpson [et al.] // *J. Nutr.* – 2006. – Vol. 136, № 1. – P. 218-226.

512. Susceptibility of juvenile and adult blood-brain barrier to endothelin-1: regulation of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression and transport activity / R. Harati, A.S. Villégier, W.A. Banks, A. Mabondzo // *Journal of Neuroinflammation*. - 2012. - № 9. - P. 273. doi: 10.1186/1742-2094-9-273.
513. SV40 large T immortalised cell lines of the rat blood-brain and blood-retinal barriers retain their phenotypic and immunological characteristics / J. Greenwood, G. Pryce, L. Devine [et al.] // *J. Neuroimmunol.* – 1996. – Vol. 71. –P. 51-63.
514. Systemic administration of a calpain inhibitor reduces behavioral deficits and blood-brain barrier permeability changes after experimental subarachnoid hemorrhage in the rat / A. Germanò, C. Costa, S. M. DeFord [et al.] // *J Neurotrauma*. – 2002. – Vol. 19, № 7. – P. 887-896.
515. Takano T. [и др.]. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow // *Nature Neuroscience*. 2006. № 2 (9). С. 260–267. doi: 10.1155/2016/3907147.
516. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis / P. Sonveaux, T. Copetti, C.J. De Saedeleer et al. // *PLoS One*. - 2012. - Vol. 7, № 3. - e33418.
517. Tau, G.Z. Normal development of brain circuits / G.Z. Tau, B.S. Peterson // *Neuropsychopharmacology*. – 2010. – Vol. 35, № 1. – P. 147-168.
518. The biological significance of brain barrier mechanisms: help or hindrance in drug delivery to the central nervous system? / N.R. Saunders, M.D. Habgood, K. Mollgard, K.M. Dziegielewska // *F1000Research*. - 2016. - Vol.5. - P. 313. doi: 10.12688/f1000research.7378.1.
519. The contribution of blood lactate to brain energy metabolism in humans measured by dynamic ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy / F. Boumezbeur, K.F. Petersen, G.W. Cline [et al.] // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. - 2010. - Vol.30, № 42. - P. 13983–13991.
520. The glutamate transporter EAAT2 is transiently expressed in developing human cerebral white matter / T.M. Desilva, H.C. Kinney, N.S. Borenstein [et al.] // *J. Comp. Neurol.* – 2007. – Vol. 501, № 6. – P. 879-890.

521. The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons / W. Chen, V. Mahadomrongkul, U.V. Berger [et al.] // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. - 2004. - vol.24, № 5. - P. 1136–1148.
522. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha / L. Zhong, A. D'Urso, D. Toiber [et al.] // *Cell*. – 2010. – Vol. 140, № 2. – P. 280-293.
523. The interplay of reactive oxygen species, hypoxia, inflammation, and sirtuins in cancer initiation and progression / M. Tafani, L. Sansone, F. Limana [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. - 2016. - Vol. 2016. - P. 3907147.
524. The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity / K. Ebnet, M. Aurrand-Lions, A. Kuhn [et al.] // *J Cell Sci*. – 2003. – Vol. 116, № 19. – P. 3879-3891.
525. The maturation of cortical sleep rhythms and networks over early development / C.J. Chu, J. Leahy, J. Pathmanathan [et al.] // *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*. - 2014. - Vol.125, № 7. - P. 1360–1370.
526. The neonatal brain is not protected by osteopontin peptide treatment after hypoxia-ischemia / H.J. Bonestroo, C.H. Nijboer, C.T. Velthoven [et al.] // *Developmental Neuroscience*. - 2015. - Vol.37, № 2. - P. 142–152.
527. The Pax gene family: Highlights from cephalopods / S. Navet, A. Buresi, S. Baratte [et al.] // *PloS One*. - 2017. - Vol.12, № 3. - P. e0172719. doi: 10.1371/journal.pone.0172719.
528. The Rac1 inhibitor NSC23766 suppresses CREB signaling by targeting NMDA receptor function / H. Hou, A.E. Chávez , C.C. Wang [et al.] // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. - 2014. - Vol.34, № 42. - P. 14006–14012.

529. The role of gap junction channels during physiologic and pathologic conditions of the human central nervous system / E. A. Eugenin, D. Basilio, J. C. Sáez [et al.] // *J. Neuroimmune Pharmacol.* - 2012. – Vol. 7, № 3. – P. 499-518.
530. The umbilical coiling index in complicated pregnancy / M.W. de Laat, E.D. van Alderen, A. Franx [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2007. – Vol. 130, № 1. – P. 66-72.
531. Theoharides, T.C. Focal brain inflammation and autism / T.C. Theoharides, S. Asadi, A.B. Patel // *Journal of Neuroinflammation.* - 2013. - № 10. - P. 46. doi: 10.1186/1742-2094-10-46.
532. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats / J. Chen, Y. Li, L. Wang [et al.] // *Stroke.* – 2001. – Vol. 4. – P. 1005-1011.
533. Thompson, J.A. Pax genes during neural development and their potential role in neuroregeneration / J.A. Thompson, M. Ziman // *Prog. Neurobiol.* – 2011. – Vol. 95, № 3. – P. 334-351.
534. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation / A.C. Luissint, C. Artus, F. Glacial [et al.] // *Fluids Barriers CNS.* – 2012. – Vol. 9, № 1. – P. 23. doi: 10.1186/2045-8118-9-23.
535. Time representation of mitochondrial morphology and function after acute spinal cord injury / Z.Q. Jia, G. Li, Z.Y. Zhang [et al.] // *Neural Regeneration Research.* - 2016. - Vol.11, № 1. - P. 137–143.
536. Tontsch, U. Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells / U. Tontsch, H.C. Bauer // *Brain Res.* – 1991. – Vol. 539. – P. 247-253.
537. Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models / E. Urich, S.E. Lazic, J. Molnos [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 5. – P. 38149. doi:10.1371/journal.pone.0038149.

538. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke / K. Hayakawa, E. Esposito, X. Wang [et al.] // *Nature*. - 2016. - Vol.535, № 7613. - P. 551–555.
539. Translational potential of astrocytes in brain disorders / A. Verkhratsky, L. Steardo, V. Parpura, V. Montana // *Progress in Neurobiology*. - 2016. - № 144. - P. 188–205.
540. Transporters at CNS barrier sites: obstacles or opportunities for drug delivery? / Sanchez- L. Covarrubias, L.M. Slosky, B.J. Thompson [et al.] // *Current Pharmaceutical Design*. - 2014.- Vol.20, № 10. - P. 1422–1449.
541. Trends in cerebral palsy among infants of very low birthweight (<1500 g) or born prematurely (<32 weeks) in 16 European centres: a database study / M.J. Platt, C. Cans, A. Johnson [et al.] // *The Lancet*. - 2007. - Vol.369, № 9555. - P. 43–50.
542. Varatharajan, L. The transport of anti-HIV drugs across blood-CNS interfaces: summary of current knowledge and recommendations for further research / L. Varatharajan, S.A. Thomas // *Antiviral Res.* – 2009. – Vol. 82, № 2. – P. 99-109.
543. Vascular changes in the developing rat retina in response to hypoxia / G. Rathnasamy, V. Sivakumar, W.S. Foulds [et al.] // *Exp Eye Res.* – 2015. – Vol. 130. – P. 73-86.
544. Vascular endothelial growth factor and other angioglioneurins: key molecules in brain development and restoration / J.V. Lafuente, N. Ortuzar, H. Bengoetxea, [et al.] // *Int. Rev. Neurobiol.* – 2012. – Vol. 102. – P. 317-346.
545. Vascular endothelial growth factor signaling implicated in neuroprotective effects of placental growth factor in an in vitro ischemic model / H. Du, P. Li, Y. Pan [et al.] // *Brain Res.* – 2010. - № 1357. – P. 1-8.
546. Vascular transdifferentiation in the CNS: a focus on neural and glioblastoma stem-like cells / S. Guelfi, H. Duffau, L. Bauchet [et al.] // *Stem Cells International*. - 2016. - № 2016. - P. 2759403.

547. Volpe, J.J. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances / J.J. Volpe // *Lancet Neurol.* – 2009. – Vol. 8, № 1. – P. 110-124.
548. Volpe, J.J. The encephalopathy of prematurity – brain injury and impaired brain development inextricably intertwined / J.J. Volpe // *Semin Pediatr Neurol.* – 2009. – Vol. 16, № 4. – P. 167–178.
549. Vulnerability of the developing brain to hypoxic-ischemic damage: contribution of the cerebral vasculature to injury and repair? / A.A. Baburamani, C.J. Ek, D.W. Walker [et al.] // *Front. Physiol.* – 2012. – Vol. 3, № 424. – P. 1-21.
550. Wang, D.D. The astrocyte odyssey / D.D. Wang, A. Bordey // *Prog. Neurobiol.* – 2008. – Vol. 86, № 4. – P. 342-367.
551. Webb, S. Quantitation of blood-brain barrier permeability by positron emission tomography / S. Webb, R.J. Ott, S.R. Cherry // *Phys Med Biol.* – 1989. – Vol. 34. – P. 1767 – 1771.
552. Weidenfeller, C. Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties / C. Weidenfeller, C.N. Svendsen, E.V. Shusta // *J. Neurochem.* – 2007. – Vol. 101, № 2. – P. 555-565.
553. Wen, S. Dynamic signaling for neural stem cell fate determination / S. Wen, H. Li, J. Liu // *Cell Adh. Migr.* – 2009. – Vol. 3, № 1. – P. 107-117.
554. Wilhelm, I. In vitro models of the blood-brain barrier / I. Wilhelm, C. Fazakas, I. A. Krizbai // *Acta Neurobiol. Exp.* – 2011. – Vol. 71. – P. 113-128.
555. Wilhelm, I. In vitro models of the blood-brain barrier for the study of drug delivery to the brain / I. Wilhelm, I.A. Krizbai // *Molecular Pharmaceutics.* - 2014. - Vol.11, № 7. - P. 1949–1963.
556. Wnt signaling enhances neurogenesis and improves neurological function after focal ischemic injury / A. Shruster, T. Ben-Zur, E. Melamed [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 7. – P. 40843. doi: 10.1371/journal.pone.0040843.
557. Xu, Y. Dual-mode of insulin action controls GLUT4 vesicle exocytosis / Y. Xu, B.R. Rubin, C.M. Orme // *J Cell Biol.* - 2011. - Vol. 193, № 4. - P. 643-653.

558. Yang, L.-J. Proteomic analysis of immature rat pups brain in response to hypoxia and ischemia challenge / L.-J. Yang, D.-Q. Ma, H. Cui // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. - 2014. - Vol.7, № 8. - P. 4645–4660.
559. Yang, Y. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease / Y. Yang, G.A. Rosenberg // *Stroke*. – 2011. –Vol. 42, № 11. – P. 3323-3328.
560. You Shall Not Pass – tight junctions of the blood brain barrier / H.C. Bauer, I.A. Krizbai, H. Bauer, A. Traweger // *Front Neurosci*. – 2014. – Vol. 8. – P. 392.
561. Zhang, R. Function of neural stem cells in ischemic brain repair processes / R. Zhang, Z. Zhang, M. Chopp // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. - 2016. - Vol.36, № 12. - P. 2034–2043.
562. Zhu, H. J. Glutamate up-regulates P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells by an NMDA receptor-mediated mechanism / H.J. Zhu, G.Q. Liu // *Life Sci*. – 2004. – Vol. 75, № 11. – P. 1313-1322.
563. Zoppo, G.J. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke / G.J. Zoppo, J.M. Hallenbeck // *Thromb. Res*. – 2000. – Vol. 98. – P. 73-81.
564. Zoppo, G.J. Relationship of neurovascular elements to neuron injury during ischemia / G.J. Zoppo // *Cerebrovasc. Dis*. – 2009. – Vol. 27, № 1. – P. 65–76.
565. Zozulya, A. Pericyte-endothelial cell interaction increases MMP-9 secretion at the blood-brain barrier in vitro / A. Zozulya, C. Weidenfeller, H.J. Galla // *Brain Res*. – 2008. – Vol. 1189. – P. 1-11.