

АНТИГИПОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИГИПОКСИИ В ДИССОЦИИРОВАННЫХ КУЛЬТУРАХ ГИППОКАМПА

УДК 576.3/4:616.831.001.57–001.8
Поступила 10.09.2012 г.



М.В. Ведунова, к.б.н., старший научный сотрудник отдела клеточных технологий НИИ ПФМ¹; старший научный сотрудник лаборатории по исследованию матрикса мозга²;
Т.А. Сахарнова, младший научный сотрудник отдела клеточных технологий НИИ ПФМ¹; младший научный сотрудник лаборатории по исследованию матрикса мозга²;
Е.В. Митрошина, младший научный сотрудник отдела клеточных технологий НИИ ПФМ¹; младший научный сотрудник лаборатории по исследованию матрикса мозга²;
И.В. Мухина, д.б.н., профессор, зав. ЦНИЛ НИИ ПФМ¹; зав. кафедрой нормальной физиологии¹; профессор кафедры нейродинамики и нейробиологии²

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23

Цель исследования — изучить влияние нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на выживаемость и основные показатели биоэлектрической активности нейронной сети в первичной культуре гиппокампа в условиях кратковременной гипоксии и в течение 7 сут постгипоксического периода *in vitro*.

Материалы и методы. Исследования проводили на диссоциированных культурах гиппокампа, полученных от 18-дневных эмбрионов мышей линии СВА, культивируемых на мультиэлектродных матрицах MEA60 в течение 33 дней. Моделирование гипоксии выполняли на 33-й день развития культуры *in vitro* путем замены нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода в течение 10 мин. Добавление BDNF (1 нг/мл) осуществляли за 20 мин до гипоксического повреждения.

Результаты. Установлено, что 10-минутная гипоксия с содержанием кислорода в среде 0,37 мл/л после кратковременного периода повышения активности после реоксигенации приводит к необратимому угнетению спонтанной биоэлектрической активности клеток диссоциированных культур гиппокампа в отдаленном постгипоксическом периоде, что сопровождается увеличением в 4,2 раза количества мертвых клеток. Добавление в культуральную среду 1 нг/мл BDNF за 20 мин до смены нормоксической среды на среду с низким содержанием кислорода сохраняет биоэлектрическую активность как в процессе самой гипоксии, так и в постгипоксическом периоде, повышает выживаемость клеток.

Заключение. Превентивное добавление BDNF снижает негативные последствия нормобарической гипоксии, что позволяет рассматривать данный нейротрофический фактор как вещество, обладающее не только нейропротективными, но и антигипоксическими свойствами.

Ключевые слова: нейротрофический фактор головного мозга (BDNF); гипоксия; нейропротекция; диссоциированная культура гиппокампа; мультиэлектродная матрица.

English

Antihypoxic Properties of the Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Modeling of Hypoxia in Dissociated Hippocampal Cultures

M.V. Vedunova, PhD, Senior Research Worker, the Cellular Technology Department of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine¹; Senior Research Worker of the Brain Matrix Research Laboratory²;

Для контактов: Сахарнова Татьяна Александровна, тел. моб. +7 908-161-39-49; e-mail: saHarnova87@mail.ru

T.A. Sakharnova, Junior Research Worker, the Cellular Technology Department of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine¹; Junior Research Worker of the Brain Matrix Research Laboratory²;

E.V. Mitroshina, Junior Research Worker, the Cellular Technology Department of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine¹; Junior Researcher of the Brain Matrix Research Laboratory²;

I.V. Mukhina, D.Bio.Sc., Professor, Head of Central Scientific Research Laboratory of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine¹; Head of the Department of Normal Physiology¹; Professor of the Department of Neurodynamics and Neurobiology²

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005;

²Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky — National Research University, Gagarin Avenue, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950

The aim of the investigation was to study the effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the survival and main parameters of bioelectric activity of neuronal network in primary hippocampal culture in short-term hypoxia and within 7 days of posthypoxic period *in vitro*.

Materials and Methods. The investigation was performed using dissociated hippocampal cells taken from embryonic CBA mice (E18) and plated on multielectrode arrays and cultured for 33 days. Modeling of hypoxia was performed on 33 day of culture development *in vitro* (DIV) by replacing the normoxic culture medium by a medium with low oxygen for 10 minutes. BDNF (1 ng/ml) was added 20 minutes before hypoxic damage.

Results. 10-minute hypoxia with an oxygen content in the medium of 0.37 ml/l after a short period of normalization of activity after reoxygenation was stated to lead to irreversible inhibition of the spontaneous bioelectric activity of dissociated hippocampal cultures in remote posthypoxic period accompanied by the increase of the number of dead cells by 4.2 times. The addition of 1 ng/ml BDNF into the culture medium 20 minutes before changing normoxic medium for medium with low oxygen saved bioelectrical activity both in the process of hypoxia itself and in posthypoxic period, and increased cell survival.

Conclusion. Preventive addition of BDNF reduces the negative consequences of normobaric hypoxia that enables to consider the neurotrophic factor as the substance having not only neuroprotective, but also antihypoxic properties.

Key words: brain-derived neurotrophic factor (BDNF); hypoxia; neuroprotection; dissociated hippocampal culture; multielectrode arrays.

Одним из основных факторов повреждения клеток головного мозга при ишемическом воздействии и ряде других патологий является гипоксия. В результате нарушения поступления кислорода происходят значительные изменения процессов синаптической передачи, которые связаны с гибелью клеток и разрушением нейронных сетей головного мозга [1]. В связи с этим в современной нейробиологии и медицине актуален вопрос о поиске веществ, способных защитить клетки головного мозга от повреждающего действия гипоксии. Среди химических веществ, способных контролировать уровень метаболизма клетки в условиях сниженного содержания кислорода, выделяют группу регуляторных белков и пептидов. Одним из представителей такой группы является нейротрофический фактор головного мозга BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor), который участвует не только в дифференциации нейронов и формировании синаптических контактов в процессе нейрогенеза, но и может являться активным корректором метаболизма зрелых нейронов [2–7]. Однако его роль в регуляции окислительных процессов в зрелом мозге изучена недостаточно.

Цель исследования — изучение влияния нейротрофического фактора головного мозга на выживаемость и основные показатели биоэлектрической активности нейронной сети в первичной культуре гиппокампа в условиях кратковременной гипоксии и в течение 7 сут постгипоксического периода *in vitro*.

Материалы и методы.

Культивирование первичных диссоциированных культур клеток гиппокампа. В исследовании использованы первичные культуры клеток гиппокампа, полученные от 18-дневных эмбрионов мышей линии СВА.

Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в Приказе Минздрава России №708н от 23.08.2010 «Об утверждении Правил лабораторной практики», при проведении исследований неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006).

Диссоциирование клеток достигалось путем обработки ткани гиппокампа 0,25% трипсином. Клетки ресуспендировали в нейробазальной среде Neurobasal™ (Invitrogen, США) в комплексе с биоактивной добавкой B27 (Invitrogen), глутамином (Invitrogen), эмбриональной телячьей сывороткой (ПанЭко, Россия) и культивировали согласно ранее разработанному протоколу [8] в течение 33 дней *in vitro* (DIV) на мультиэлектродной матрице системы MEA60 (Multichannel Systems, Германия), содержащей 60 микроэлектродов. Предварительно матрицу стерилизовали УФ-облучением и обрабатывали полиэтиленгликолем, служившим опорным субстратом для культивируемых клеток. Исходная плотность культуры на матрице составляла 9000 кл./мм². Жизнеспособность культур поддерживалась в CO₂-инкубаторе при температуре 35,5°C и газовой смеси, содержащей 5% CO₂.

Моделирование гипоксии. Моделирование гипоксии проводили на 33-й день развития культуры *in vitro* путем замены нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода в течение 10 мин. Вытеснение кислорода из культуральной среды осуществляли в герметичной камере, в которой воздух

был замещен на инертный газ. При определении концентрации растворенного кислорода методом йодометрического титрования Винклера установлено, что при насыщении культуральной среды инертным газом содержание кислорода снижалось с 3,26 (нормоксия) до 0,37 мл/л (гипоксическая среда).

В опытной группе за 20 мин до гипоксии в культуральную среду добавляли BDNF (1 нг/мл). В контрольную группу вошли культуры, у которых гипоксия проводилась без превентивного добавления нейротрофического фактора.

Регистрация и анализ биоэлектрической активности. Спонтанную биоэлектрическую активность нейронов регистрировали с помощью мультиэлектродных матриц мультиэлектродной системы MEA60. Матрица состояла из 60 планарных круглых электродов, каждый диаметром 30 мкм, с межэлектродным расстоянием 200 мкм. Внеклеточные потенциалы действия (спайки) нейронов, характеризующие биоэлектрическую активность первичной культуры гиппокампа, регистрировали в исходном состоянии на 33-й день развития *in vitro*, а также через 10, 120 мин и каждые 24 ч в течение 7 дней после воздействия гипоксии. Исследовали основные характеристики биоэлектрической активности диссоциированной культуры гиппокампа: количество малых сетевых пачек; количество спайков в малой сетевой пачке. Критерием малой сетевой пачки являлось наличие спайков минимум на четырех различных электродах матрицы с межспайковым интервалом не более 100 мс.

Для количественной обработки и анализа полученных данных использовали набор программного обеспечения мультиэлектродной системы MC Rack (Multichannel Systems, Германия), а также пакет прикладных программ Matlab.

Оценка жизнеспособности клеток в диссоциированной культуре. На 3-й и 7-й день после гипоксического воздействия проводили подсчет числа клеточных ядер, окрашенных пропидий йодидом (Sigma, США), и ядер, окрашенных бис-бензимидам (Sigma). Число живых клеток рассчитывалось как процентное соотношение между бис-бензимидам-позитивными клетками и пропидий йодид-позитивными клетками.

Статистический анализ данных. Результаты исследования статистически обрабатывали с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel и Biostat с использованием непараметрического критерия Крускала–Уоллиса. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Со 2-й минуты гипоксического воздействия на диссоциированные культуры гиппокампа наблюдали угнетение спонтанной биоэлектрической активности нейронов (рис. 1). Через 3 мин гипоксии мультиэлектродной матрицей в контрольной серии не было зарегистрировано ни одного электрического события (пачки спайков или отдельных спайков).

Реоксигенация вызывала усиление активности нейронов относительно исходного уровня. Паттерн спонтанной биоэлектрической активности изменялся за счет увеличения количест-

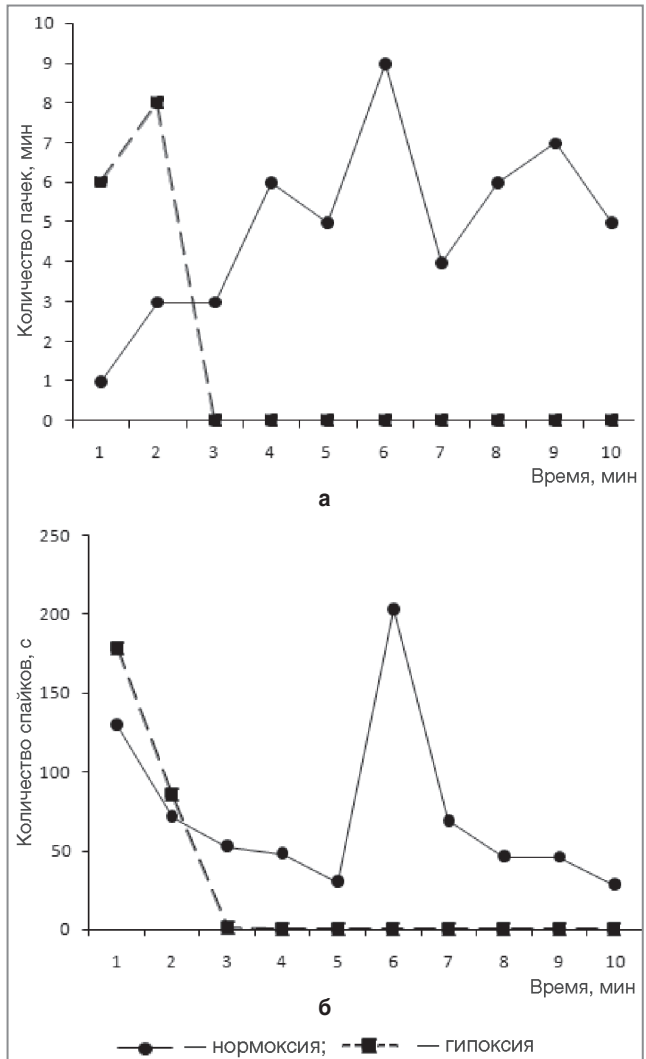


Рис. 1. Спонтанная биоэлектрическая активность диссоциированной культуры гиппокампа (33 DIV) в течение 10 мин гипоксии (0,37 мл/л O_2 в культуральной среде): а — количество малых сетевых пачек в минуту; б — количество спайков в секунду

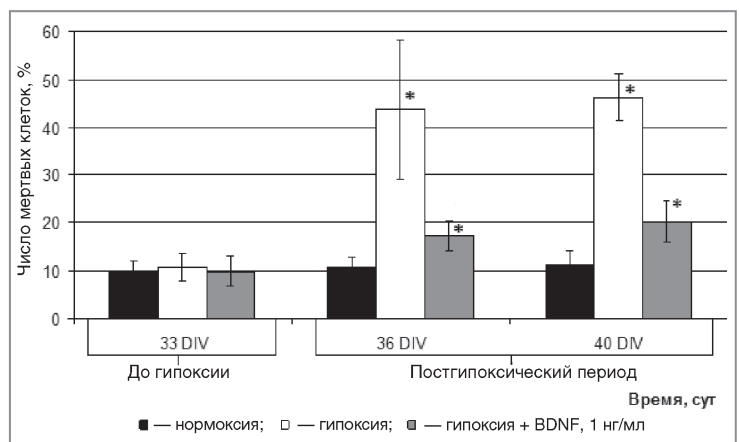


Рис. 2. Число мертвых (пропидий йодид-положительных) клеток в диссоциированной культуре гиппокампа до гипоксического повреждения (33 DIV), на 3-и (36 DIV) и 7-е (40 DIV) сутки после 10 мин гипоксии (0,37 мл/л O_2); * — статистическая значимость различий значений с исходным уровнем ($p < 0,05$, критерий Крускала–Уоллиса)

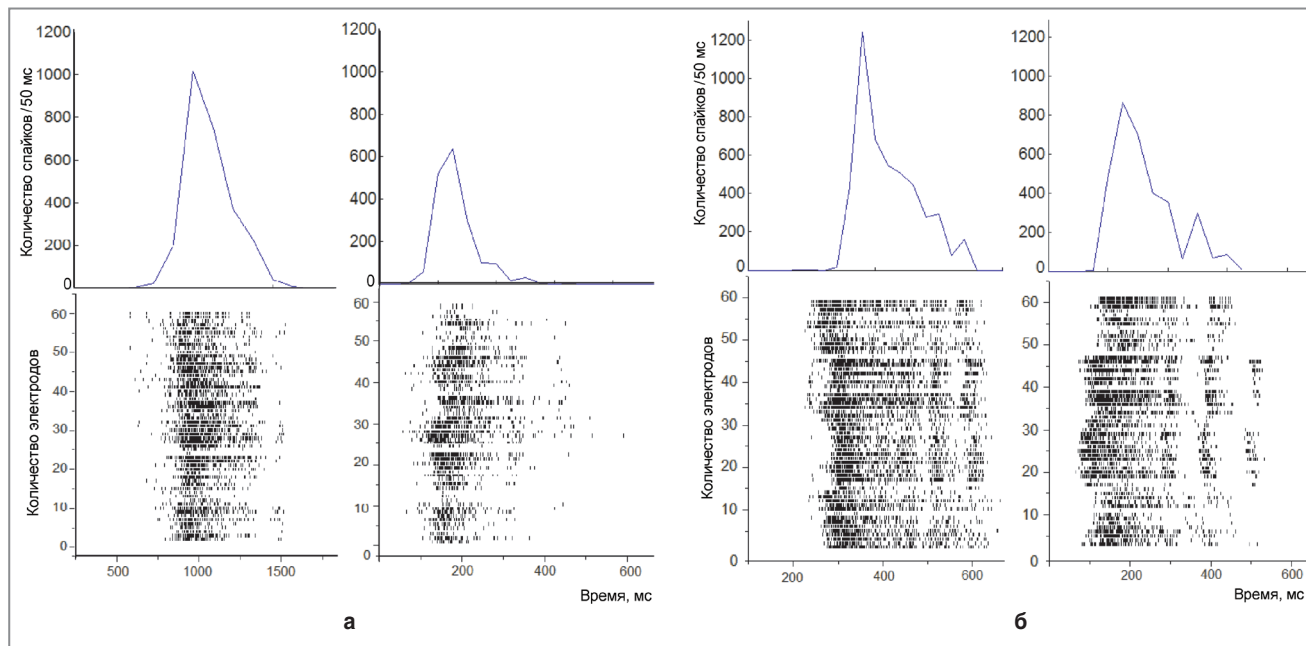


Рис. 3. Количество спайков за 50 мс (сверху) и растровые диаграммы спонтанной биоэлектрической активности диссоциированной культуры гиппокампа (снизу): *а* — активность контрольной культуры до гипоксии (33 DIV) (слева) и через 24 ч после повреждающего воздействия (34 DIV) (справа); *б* — активность культуры до аппликации BDNF и гипоксии (33 DIV) (слева) и через 24 часа после аппликации BDNF (1нг/мл) и повреждающего воздействия (34 DIV) (справа)

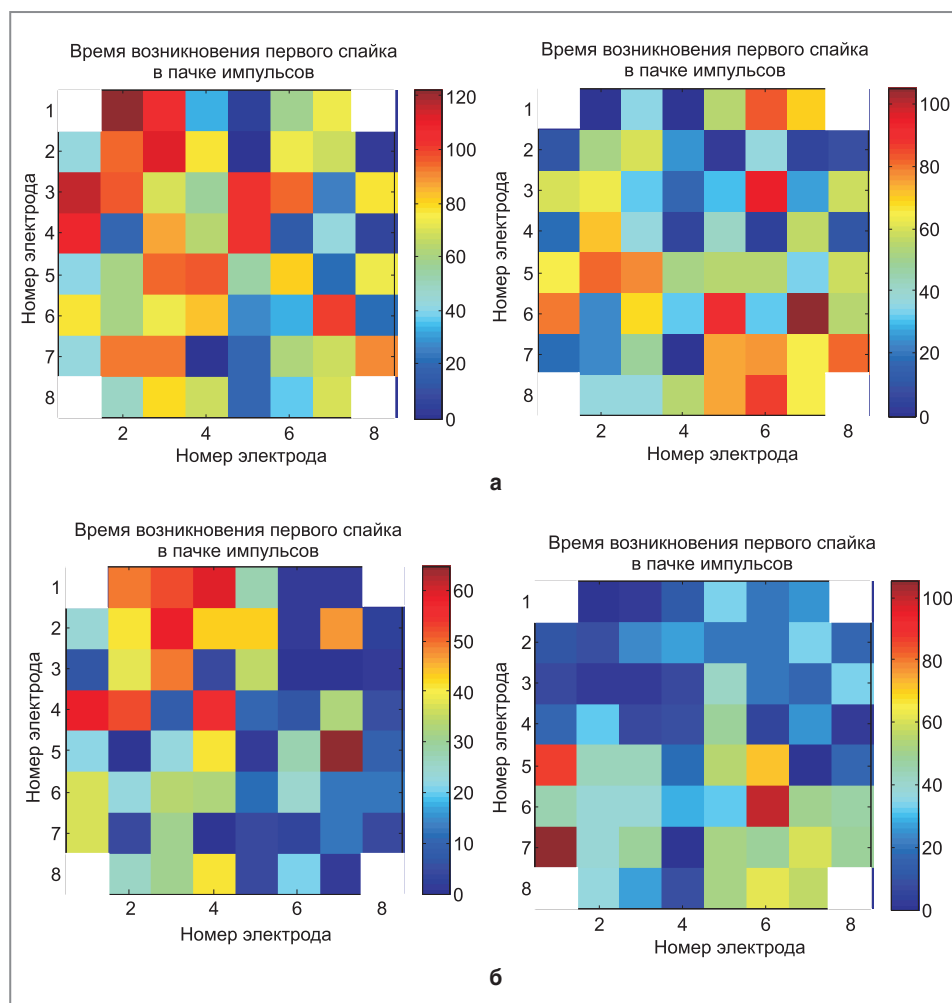


Рис. 4. Паттерн спонтанной биоэлектрической активности диссоциированной культуры гиппокампа: *а* — активность контрольной культуры до гипоксии (33 DIV) (слева) и через 24 ч после повреждающего воздействия (34 DIV) (справа); *б* — активность культуры до аппликации BDNF (33 DIV) (слева) и через 24 ч после аппликации BDNF (1нг/мл) и повреждающего воздействия (34 DIV) (справа)

ва малых сетевых пачек (количество пачек за 10 мин до гипоксии — $38,20 \pm 7,83$; после — $101,70 \pm 23,67$) и незначительного увеличения среднего числа спайков в пачке (до гипоксии — $251,8 \pm 102,1$; после — $432,7 \pm 141,3$). Однако через 2 ч после гипоксии происходило необратимое снижение спонтанной биоэлектрической активности (число пачек за 10 мин — $3,00 \pm 5,67$; среднее число спайков в пачке — $508,00 \pm 232,98$).

Через сутки после острого 10-минутного эпизода гипоксии наблюдали морфологические изменения в диссоциированной культуре гиппокампа в виде некротизированных клеточных элементов, количество которых увеличивалось в течение 7 последующих дней (рис. 2). Исследование жизнеспособности культуры показало, что основная часть клеток гибнет в первые трое суток после воздействия. Количество мертвых клеток в культуре за это время увеличивается в четыре раза по сравнению с нормоксическими условиями и составляет 43% от общего числа клеток.

Исследование паттерна спонтанной активности показало, что гипоксическое воздействие не только снижает основные биоэлектрические показатели в отдаленном постгипоксическом периоде (количество спайков за 50 мс уменьшается в среднем в 2 раза, $p < 0,05$) (рис. 3), но и изменяет функциональные характеристики сетевой пачки импульсов, что регистрируется в виде изменения паттерна активации сетевой пачки (рис. 4). Известно, что паттерн активации является параметром, отражающим индивидуальную структуру функциональной нейронной сети, изменяющейся при воздействии стрессорных факторов [9].

Эффект низких концентраций BDNF (1 нг/мл) проявлялся в частичном сохранении сетевой пачечной активности во время гипоксии и нормализации показателей спонтанной биоэлектрической активности относительно исходного уровня в постгипоксическом периоде (рис. 5).

Исследование морфологической структуры и жизнеспособности клеточной культуры в течение 7 сут после гипоксии показало снижение некротического повреждения и количества мертвых клеток в культуре (см. рис. 2) при превентивном применении BDNF по сравнению с контрольной серией. Через 7 сут после гипоксии количество мертвых клеток составляло всего 20% от общего числа клеток в культуре, что статистически значимо ($p < 0,05$) в 2,35 раза ниже, чем в контрольной серии.

Обсуждение. Проведенные эксперименты выявили, что 10-минутная нормобарическая гипоксия вызывает необратимые изменения в спонтанной биоэлектрической активности диссоциированных культур гиппокампа: снижение количества сетевых пачек импульсов и количества спайков в пачке и полное их исчезновение через 2–3 мин гипоксии. Кроме того, в первые трое суток после гипоксии в 4,2 раза возрастает количество

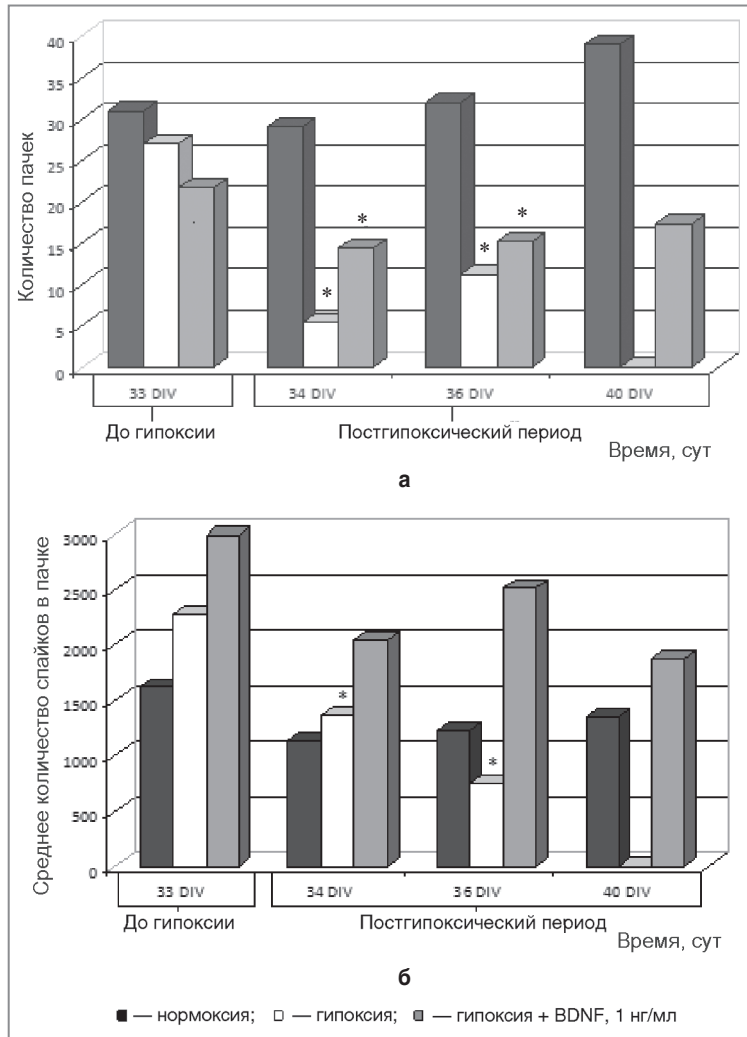


Рис. 5. Спонтанная биоэлектрическая активность диссоциированных культур гиппокампа на 1-е (34 DIV), 3-и (36 DIV) и 7-е (40 DIV) сутки постгипоксического периода: а — количество пачек, регистрируемых за 10 мин записи; б — среднее количество спайков в пачке за 10 мин регистрации; * — статистическая значимость различий значений с исходным уровнем ($p < 0,05$, критерий Крускала–Уоллиса)

мертвых клеток в культуре. Применение BDNF (1 нг/мл) за 20 мин до гипоксического повреждения предупреждает все обнаруженные негативные эффекты кислородного голодания. В условиях гипоксии наблюдается частичное сохранение биоэлектрической активности, после реоксигенации количество мертвых клеток статистически значимо ($p < 0,05$) ниже, чем в культурах без добавления нейротрофического фактора.

Антигипоксическое защитное действие BDNF проявлялось в поддержании биоэлектрической активности в условиях гипоксии, что, вероятно, обусловлено сохранением окислительного фосфорилирования как основной функции митохондриальной дыхательной системы клеток. Однако вопрос о конкретном сигнальном механизме, который запускается нейротрофинами при гипоксии и приводит к повышению резистентности клеток, остается до конца не ясным. В ряде публикаций [3, 10] показано, что поддержание выживаемости

нейронов посредством BDNF осуществляется через активацию внеклеточной сигнал-регулирующей киназы (ERK) или пути активации митогенактивированных протеинкиназ — MAPK-пути, в то время как другие исследователи [11–14] представляют доказательства того, что в данном процессе участвует PI-3-киназный сигнальный механизм. Существуют также данные о том, что p38 MAPK (один из сигнальных путей) играет роль в нейропротекции [15, 16]. Одной из известных молекул-мишеней MAPK и PI-3-киназы является цАМФ-зависимый транскрипционный фактор (CREB). Это важный компонент данных сигнальных путей, ведущий к изменениям в экспрессии генов. Предполагается, что CREB способствует BDNF-опосредованному выживанию нейронов в центральной нервной системе, активируя антиапоптотическую экспрессию генов. Фосфорилирование участка CREB Ser133 нейротрофинами необходимо для активации CREB-активированных транскрипционных факторов [17]. В недавнем исследовании *in vitro* нейронов коры головного мозга в условиях циркуляторной гипоксии (гипоксии/ишемии) [18] показано, что экзогенное применение BDNF способствует повышению количества выживших кортикальных нейронов после повреждающего воздействия через активацию и MAPK, и PI-3-киназного сигнальных путей, приводящих к активации фосфорилирования CREB. В большей части данный процесс связан с внеклеточной сигнал-регулирующей киназой ERK.

В 2012 г. учеными из Великобритании в экспериментах *in vitro* исследовано действие BDNF на метаболизм кислорода в митохондриях мозга мышей [19]. В случае инкубации с синапсоматомами эффект BDNF выражался в концентрационно-зависимом повышении респираторного контрольного индекса (Respiratory control index, RCI) — показателя эффективности дыхательной цепи, синтеза АТФ и целостности органелл. При этом в экспериментах на выделенных митохондриях BDNF не демонстрировал подобного эффекта и усиливал окисление только в случае использования субстратов митохондриального ферментативного комплекса I. Митохондриальный эффект BDNF контролировался MAPK сигнальным путем, а ингибитор митохондриального ферментативного комплекса I ротенон способен *in vitro* и *in vivo* ингибировать как митохондриальный, так и нейропротективный эффект BDNF.

Заключение. Превентивное добавление BDNF снижает негативные последствия нормобарической гипоксии, что позволяет рассматривать этот нейротрофический фактор как вещество, обладающее не только нейропротективными, но и антигипоксическими свойствами.

Работа поддержана программой Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология».

Литература

1. Almeida R.D., Manadas B.J., Melo C.V., Gomes J.R., et al. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell

death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell death and differentiation* 2005; 12(10): 1329–1343.

2. Sun X., Zhou H., Luo X., Li S., Yu D., et al. Neuroprotection of brain-derived neurotrophic factor against hypoxic injury *in vitro* requires activation of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Int J Devl Neuroscience* 2008; 26: 363–370.

3. Han B.N., Holtzman D.M. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury *in vivo* via the ERK pathway. *J Neurosci* 2000; 20(15): 5775–5781.

4. Ikeda K., Tanihara H., Honda Y., Tatsuno T., et al. BDNF attenuates retinal cell death caused by chemically induced hypoxia *in rats*. *IOVS* 1999; 40(9): 2130–2140.

5. Han B.H., D'Costa A., Back S.A., Parsadarian M., Patel S., et al. BDNF block caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiology of disease* 2000; 7(1): 38–53.

6. Zhu X.H., Yan H.C., Zhang J., Qu H.D., Qiu X.S., et al. Intermittent hypoxia promotes hippocampal neurogenesis and produces antidepressant-like effects in adult rats. *J Neurosci* 2010; 30(38): 12653–12663.

7. Ведунова М.В., Коротченко С.А., Балашова А.Н., Исакова А.О., Хаспеков Л.Г., Казанцев В.Б., Мухина И.В. Влияние кратковременной глюкозной депривации на функционирование нейронной сети гиппокампа на мультиэлектродной матрице. *Соврем технол мед* 2011; 2: 7–13.

8. Мухина И.В., Казанцев В.Б., Хаспеков Л.Г., Захаров Ю.Н., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Коротченко С.А., Корягина Е.А. Мультиэлектродные матрицы — новые возможности в исследовании пластичности нейрональной сети. *Соврем технол мед* 2009; 1: 8–15.

9. Pimashkin A., Kastalskiy I., Simonov A., Koryagina E., Mukhina I., Kazantsev V. Spiking signatures of spontaneous activity bursts in hippocampal cultures. *Frontiers in Computational Neuroscience* 2011; 5(46). doi: 10.3389/fncom.2011.00046.

10. Hetman M., Gozdz A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur J Biochem* 2004; 271: 2050–2055.

11. Satoh T., Nakatsuka D., Watanabe Y., Nagata I., Kikuchi H., Namura S. Neuroprotection by MAPK/ERK kinase inhibition with U0126 against oxidative stress in a mouse neuronal cell line and rat primary cultured cortical neurons. *Neurosci Lett* 2000; 288(2): 163–166.

12. Mograbi B., Boccardi R., Bourget I., Rochet N., Farahi-Far D., Juhel T., Rossi B. Glial cell line-derived neurotrophic factor-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activities exert opposing effects on the ERK pathway. *J Biol Chem* 2001; 276(48): 45307–45319.

13. Nakazawa T., Tamai M., Mori N. Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(10): 3319–3326.

14. Veit C., Genze F., Menke A., Hoeffert S., Gress T.M., Gierschik P., Giehl K. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase is required for glial cell line-derived neurotrophic factor-induced migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2004; 64: 5291–5300.

15. Irving E.A., Bamford M. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22(6): 631–647.

16. Park J.Y., Kim E.J., Kwon K.J., Jung Y.S., Moon C.H., Lee S.H., Baik E.J. Neuroprotection by fructose-1,6-bisphosphate involves ROS alterations via p38 MAPK/ERK. *Brain Res* 2004; 1026(2): 295–301.

17. Arthur J.S.C., Fong A.L., Dwyer J.M., Davare M., Reese E., Obrietan K., Impey S. Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *J Neurosci* 2004; 24(18): 4324–4332.

18. Sun X., Zhou H., Luo X., Li S., Yu D., Hua J., Mu D., Mao M., Neuroprotection of brain-derived neurotrophic factor against hypoxic injury *in vitro* requires activation of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Int J Devl Neuroscience* 2008; 26: 363–370.

19. Markham A., Cameron I., Bains R., Franklin P., Kiss J.P., Schwendemann L., Gressens P., Spedding M. Brain-derived neurotrophic factor — mediated effects on mitochondrial respiratory

coupling and neuroprotection share the same molecular signaling pathways. *European Journal of Neurosci* 2012; 35: 366–374.

References

1. Almeida R.D., Manadas B.J., Melo C.V., Gomes J.R., et al. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell death and differentiation* 2005; 12(10): 1329–1343.
2. Sun X., Zhou H., Luo X., Li S., Yu D., et al. Neuroprotection of brain-derived neurotrophic factor against hypoxic injury in vitro requires activation of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Int J Devl Neuroscience* 2008; 26: 363–370.
3. Han B.N., Holtzman D.M. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci* 2000; 20(15): 5775–5781.
4. Ikeda K., Tanihara H., Honda Y., Tatsuno T., et al. BDNF attenuates retinal cell death caused by chemically induced hypoxia in rats. *IOVS* 1999; 40(9): 2130–2140.
5. Han B.H., D'Costa A., Back S.A., Parsadarian M., Patel S., et al. BDNF block caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiology of disease* 2000; 7(1): 38–53.
6. Zhu X.H., Yan H.C., Zhang J., Qu H.D., Qiu X.S., et al. Intermittent hypoxia promotes hippocampal neurogenesis and produces antidepressant-like effects in adult rats. *J Neurosci* 2010; 30(38): 12653–12663.
7. Vedunova M.V., Korotchenko S.A., Balashova A.N., Isakova A.O., Khaspekov L.G., Kazantsev V.B., Mukhina I.V. *Sovrem Tehnol Med — Modern Technologies in Medicine* 2011; 2: 7–13.
8. Mukhina I.V., Kazantsev V.B., Khaspekov L.G., Zakharov Yu.N., Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Korotchenko S.A., Koryagina E.A. *Sovrem Tehnol Med — Modern Technologies in Medicine* 2009; 1: 8–15.
9. Pimashkin A., Kastalskiy I., Simonov A., Koryagina E., Mukhina I., Kazantsev V. Spiking signatures of spontaneous activity bursts in hippocampal cultures. *Frontiers in Computational Neuroscience* 2011; 5(46). doi: 10.3389/fncom.2011.00046.
10. Hetman M., Gozdz A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur J Biochem* 2004; 271: 2050–2055.
11. Satoh T., Nakatsuka D., Watanabe Y., Nagata I., Kikuchi H., Namura S. Neuroprotection by MAPK/ERK kinase inhibition with U0126 against oxidative stress in a mouse neuronal cell line and rat primary cultured cortical neurons. *Neurosci Lett* 2000; 288(2): 163–166.
12. Mograbi B., Bocciardi R., Bourget I., Rochet N., Farahi-Far D., Juhel T., Rossi B. Glial cell line-derived neurotrophic factor-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activities exert opposing effects on the ERK pathway. *J Biol Chem* 2001; 276(48): 45307–45319.
13. Nakazawa T., Tamai M., Mori N. Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(10): 3319–3326.
14. Veit C., Genze F., Menke A., Hoeffert S., Gress T.M., Gierschik P., Giehl K. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase is required for glial Cell line-derived neurotrophic factor-induced migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2004; 64: 5291–5300.
15. Irving E.A., Bamford M. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22(6): 631–647.
16. Park J.Y., Kim E.J., Kwon K.J., Jung Y.S., Moon C.H., Lee S.H., Baik E.J. Neuroprotection by fructose-1,6-bisphosphate involves ROS alterations via p38 MAPK/ERK. *Brain Res* 2004; 1026(2): 295–301.
17. Arthur J.S.C., Fong A.L., Dwyer J.M., Davare M., Reese E., Obrietan K., Impey S. Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *J Neurosci* 2004; 24(18): 4324–4332.
18. Sun X., Zhou H., Luo X., Li S., Yu D., Hua J., Mu D., Mao M., Neuroprotection of brain-derived neurotrophic factor against hypoxic injury in vitro requires activation of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Int J Devl Neuroscience* 2008; 26: 363–370.
19. Markham A., Cameron I., Bains R., Franklin P., Kiss J.P., Schwendimann L., Gressens P., Spedding M. Brain-derived neurotrophic factor — mediated effects on mitochondrial respiratory coupling and neuroprotection share the same molecular signaling pathways. *European Journal of Neurosci* 2012; 35: 366–374.