

ИЗМЕНЕНИЯ В НЕЙРОГЕННОЙ НИШЕ ГИППОКАМПА КРЫС ПРИ ГИПОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

© 2023 г. Е. Н. Федорова^{1,2,*}, Д. Н. Воронков¹, А. В. Егорова^{1,2}, Т. И. Баранич^{1,2}, В. В. Глинкина²,
Э. Л. Германова³, Л. Д. Лукьянова³, В. С. Сухоруков^{1,2}

¹Научный центр неврологии, Москва, Россия

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

³Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

*e-mail: ewgenia.feodorowa2011@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.03.2023 г.

После доработки 13.06.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

Одной из наиболее уязвимых к гипоксии структур мозга является гиппокамп. Поддержание пула клеток нейрогенной ниши в субгранулярной зоне гиппокампа (SGZ) обеспечивается адаптационными механизмами, среди которых — изменение функционирования комплексов дыхательной цепи митохондрий и реакция астроглии, обеспечивающей метаболическую поддержку нейронов. С целью изучения динамики адаптационных изменений нейронов и глии в зубчатой извилине гиппокампа в условиях гипоксии на модели периодической гипобарической гипоксии (5000 м, эквивалентно 10.5% O₂), при однократном (60 мин) и многократном (8 и 20 эпизодов) воздействии у низкоустойчивых крыс иммуноморфологическими методами выявляли особенности локализации и содержания комплекса IV дыхательной цепи митохондрий (MTCO1), маркерных астроцитарных белков: глутаминсинтетазы (GS) и GFAP, а также даблкортина (DCX) — маркера незрелых нейронов. При однократной гипоксии значительно повышалось содержание MTCO1 в нейронах, а при восьмикратном воздействии увеличивалось количество глутаминсинтетазы (GS) в астроцитах зубчатой извилины гиппокампа. Изменения содержания GS были наиболее выражены в отростках астроцитов, что говорит о перераспределении GS при гипоксии. Количество DCX+ нейронов в SGZ значительно снижалось после 20 эпизодов гипоксии, при этом в полиморфном слое обнаруживались DCX+ клетки глиальной морфологии, а окрашивание на GFAP показало увеличение количества астроцитов в полиморфном слое, что может быть связано в том числе со смещением направления дифференцировки клеток нейрогенной ниши. Таким образом, при гипоксии в SGZ гиппокампа на начальном этапе происходит интенсификация работы дыхательной цепи нейронов зернистого слоя с последующей активацией астроцитов, модулирующих обмен глутамата. Наличие взаимосвязи между динамикой адаптационных реакций энергообмена в нейронах и глии и изменениями нейрогенеза после 20 эпизодов гипоксии позволяет предположить, что при многократной гипоксии происходит сдвиг дифференцировки нейральных предшественников SGZ в направлении астроглии, однако, этот вопрос требует дальнейшего изучения для более точного определения природы DCX+ клеток.

Ключевые слова: гипобарическая гипоксия, цитохромоксидаза, глутаминсинтетаза, нейрогенез, гиппокамп

DOI: 10.31857/S0044452923040022, **EDN:** OTWETL

ВВЕДЕНИЕ

Чувствительность нервной ткани к гипоксическому воздействию обусловлена ее высокой энергозависимостью. При этом одной из наиболее уязвимых к гипоксии структур мозга является гиппокамп [1]. Последний играет ключевую роль в когнитивных процессах и проявляет высокую способность к адаптации и динамической структурной реорганизации нейронных сетей, в том числе, благодаря нейрогенезу, протекающему в зубчатой извилине [2].

Нейрогенная ниша субгранулярной зоны гиппокампа отличается особенностями нейроглиальных и нейроваскулярных взаимодействий [3, 4], определяющими специфичность микроокружения нейрональных предшественников. *In vitro* было показано, что поддержание нервных стволовых клеток (NSC) в недифференцированном состоянии обеспечивается сниженной оксигенацией [5], что делает изучение регуляторных механизмов в нише нейрональных предшественников актуальным как в нормальных условиях, так и при стрессовых воздействиях и, прежде всего, при гипоксии. Эффек-

ты экзогенной гипоксии на дифференцировку и созревание NSC разнообразны и зависят от тяжести гипоксического воздействия. Основным путем, реализующим адаптационный ответ клеток на гипоксию, служит увеличение экспрессии транскрипционных факторов HIF1-2, регулирующих синтез ростовых факторов (VEGF, TGFb), митохондриальный метаболизм и митохондриальную динамику [6]. Активность митохондрий имеет решающее значение для контроля пролиферации и дифференцировки нейрональных предшественников. В частности, пролиферация NSC как в эмбриональном, так и во взрослом периоде связана с высокой активностью гликолиза, в то время как дифференцировка NSC сопряжена с усилением реакций окислительного фосфорилирования [7]. Такое метаболическое переключение обеспечивает не только увеличение производства энергии, но и рассматривается как триггер, определяющий судьбу NSC.

Несмотря на значительное число исследований, проводимых на моделях экзогенной гипобарической гипоксии, работ, посвященных анализу клеточных реакций в гиппокампе, немного. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о значительном повышении устойчивости животных и человека к гипоксии при пребывании в условиях среднегорья, что обусловило развитие гипокситерапии в качестве самостоятельного лечебного фактора, применяемого в медицинской практике. Показано, что оптимальные условия, не вызывающие повреждающих эффектов и максимально способствующие формированию адаптационных реакций у грызунов, реализуются при содержании во вдыхаемом воздухе 10–12% кислорода, что эквивалентно высоте 5000 м [8]. При этом было установлено [8], что срочная адаптация к указанным условиям гипоксии (умеренная гипобарическая гипоксия, содержание кислорода во вдыхаемом воздухе 10.5% O₂) в коре головного мозга формируется за счет репрограммирования работы дыхательной цепи с переключением на сукцинат-оксидазный путь окисления. При многократных же воздействиях переключение на уровне субстратного звена наблюдалось только при первых 8 эпизодах одночасового применения гипоксии, создавая предпосылки для последующего восстановления НАД-зависимого окисления, приводя к появлению изоформ I митохондриального ферментного комплекса с новыми кинетическими свойствами [8]. Таким образом, компенсаторно-регуляторная смена метаболических путей окисления энергетических субстратов способствовала сохранению высокой активности электрон-транспортной функции цитохромного участка дыхательной цепи, обеспечивая высокую эффективность реакций окислительного фосфорилирования.

Цитохромоксидаза (МТСО) — терминальный фермент митохондриальной дыхательной цепи, состоящий из 13 субъединиц, в котором “катали-

ческие” субъединицы 1–3 кодируются митохондриальной ДНК, а “дополнительные” субъединицы 4–13 контролируются ядерным геномом [9]. Такая сложная структурная организация МТСО обуславливает наличие в том числе дополнительных регуляторных механизмов контроля активности фермента за счет тканеспецифической экспрессии изоформ МТСО и путем аллостерической регуляции активности субъединиц [9]. МТСО1 — основной компонент IV митохондриального ферментного комплекса, представляющий собой каталитическую субъединицу цитохром-с-оксидазы, кодируемую митохондриальной ДНК. При этом субъединица МТСО1 является ключевой, поскольку именно в ней локализуются гем- и медь-содержащие домены — активные сайты, обеспечивающие взаимодействие между восстановлением кислорода и переносом протонов в межмембранное пространство. Перечисленные характеристики IV митохондриального комплекса определяют его уникальность и объясняют выбор данного фермента в качестве маркера метаболической активности нейронов при формировании адаптации к гипоксии.

Интересно, что для клеток с высокой пролиферативной активностью, а именно для раковых и эмбриональных стволовых клеток, еще одним метаболическим путем, определяющим направление дифференцировки, является глутаминолиз [10]. Глутаминолиз обеспечивает образование метаболитов цикла Кребса независимо от гликолиза благодаря превращению глутамин в глутамат с последующим образованием α -кетоглутарата. Показано участие глутаминолиза в поддержании пролиферации NSC в неокортексе [11], что указывает на возможность влияния ферментов, участвующих в глутаматном медиаторном обмене, на процесс нейрогенеза.

Известно, что нейроны и глия характеризуются разной чувствительностью к повреждающему действию гипоксии. При этом астроциты менее чувствительны к недостатку кислорода, так как осуществляют синтез АТФ преимущественно за счет реакций гликолиза, в то время как для нейронов характерна высокая активность процессов окислительного фосфорилирования. [12]. Существенными компонентами в реакции нервной ткани на гипоксию являются регуляция захвата и утилизации глутамата астроцитами. Астроциты, являясь полноправными участниками глутаматергической нейромедиации, активно контролируют уровень глутамата в синаптической щели. В астроцитах глутамат либо амидируется до глутамин через глутаминсинтетазу, а затем возвращается обратно в нейроны (цикл глутамат-глутамин), либо метаболизм глутамата становится энергопродуцирующим и из глутамата образуется один из метаболитов цикла Кребса — α -кетоглутарат (цикл Робертса, ГАМК шунт) [13]. При этом, захватывая умеренную кон-

центрацию глутамата (0.01–0.1 мМ), астроциты метаболизируют его до глутамина, тогда как высокие концентрации (0.2–0.5 мМ) утилизируются в цикле Кребса [14].

Глутаминсинтетаза (GS) представляет собой цитоплазматический фермент, который экспрессируется преимущественно астроцитами и катализирует АТФ-зависимый синтез глутамина из глутамата и аммиака, участвуя, таким образом, в метаболизме нейромедиаторов и в детоксикации ионов аммония. Нарушения активности GS вовлечены в патогенез печеночной энцефалопатии, ишемии, эпилепсии, черепно-мозговой травмы и нейродегенеративных заболеваний [15]. Продемонстрирована роль GS в функционировании гиппокампа. Так, отмечено, что ингибирование GS приводит к нарушениям памяти у однодневных цыплят [16], а системное введение ингибитора GS – метионинсульфоксимины (MSO) новорожденным мышам вызывает снижение экспрессии GS и GFAP в СА3 области гиппокампа, приводя к нарушениям пространственной памяти во взрослом возрасте [17]. Снижение активности GS при гипоксии может вызывать повреждение нейронов различными механизмами: как путем развития глутаматной эксайтотоксичности, обусловленной гиперстимуляцией глутаматных рецепторов с последующим накоплением внутриклеточного кальция и развитием митохондриальной дисфункции, так и за счет интоксикации азотистыми соединениями.

Таким образом, для нейронов гиппокампа важны механизмы адаптации, среди которых – изменение функционального состояния комплексов дыхательной цепи митохондрий и реакция астроглии, обеспечивающей метаболическую поддержку нейронов, в том числе, с помощью глутамин-глутаматного пути, связанного как с обменом медиаторов, так и с энергетическим метаболизмом. Морфологический подход к изучению изменений клеточных популяций в нейрогенных нишах на хорошо охарактеризованной модели периодической гипобарической гипоксии [8] позволяет дифференцированно оценить адаптационные изменения глутаматного обмена и функционирования дыхательной цепи митохондрий в системе нейрон-астроцит, расширить представление об альтернативных путях получения энергии при гипоксии и влиянии гипоксии на процесс нейрогенеза. Оценка нейрогенеза при адаптационных изменениях энергообмена особенно актуальна, поскольку для клеток нейрогенных ниш изначально характерно нахождение в условиях сниженной оксигенации [5], что определяет гипоксию как важный регуляторный фактор [7], исследование которого может иметь значение, в том числе, при разработке методов клеточной терапии с использованием нейральных стволовых клеток. Таким образом, исследование адаптационных изменений при гипоксии может открывать новые пути для разработки эффектив-

ных стратегий нейропротекции и нейрорегенерации.

Цель исследования: оценить динамику адаптационных изменений нейронов и глии зубчатой извилины гиппокампа крыс при остром и многократном гипоксическом воздействии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах (самцы $n = 20$, массой тела 200–250 г), выращенных в стандартных условиях вивария ФГБНУ “НИИ общей патологии и патофизиологии” при свободном доступе к воде и пище, естественном чередовании суточной освещенности.

Моделирование гипоксии. Для моделирования экзогенной гипоксии использовалась барокамера проточного типа. Крыс предварительно (за 4 нед до экспериментов) тестировали по их чувствительности к острой гипобарической гипоксии (подъем на высоту 11.5 тыс. м; атм. давление 180 мм рт. ст.; содержание кислорода 3% O_2), и ранжировали на высоко- и низкоустойчивых [8]. В нашем эксперименте были использованы низкоустойчивые крысы, имеющие индекс резистентности не более 2 мин. Эффект однократного и повторного гипоксического воздействия оценивался при давлении 380 мм рт. ст. (эквивалентном подъему на высоту 5000 м; содержание кислорода во вдыхаемом воздухе – 10.5%; гипоксия средней тяжести). Длительность однократного воздействия составляла 60 мин. Многократное воздействие включало в себя 8 и 20 эпизодов гипоксии по 60 мин, один раз в сутки. Группа интактных животных содержалась в тех же условиях, что и включенные в эксперимент животные. Таким образом, были сформированы 4 экспериментальные группы: однократное воздействие 60 мин, 8 воздействий по 60 мин, 20 воздействий по 60 мин и группа интактного контроля.

Иммуноморфологическое исследование. Сразу после извлечения из барокамеры крыс декапитировали, их мозг фиксировали 24 ч в 4%-ном нейтральном формалине (HistoLine, Россия), заключали в парафиновые блоки и готовили фронтальные срезы толщиной 7 мкм на микротоме Thermo Fisher (США). Для исследования была взята роstralная часть гиппокампа (уровень от брегмы от –3 до –4.5 мм), уровень срезов определяли по атласу мозга крысы Paxinos. Для демаскировки антигенов при иммунофлуоресценции срезы нагревали в пароварке, 15 мин в ЭДТА-буфере (EnVision Flex pH=9, Dako, Дания), далее их промывали в PBS с 0.1% Triton X-100 (Acros-Organics, Бельгия) и инкубировали 18 ч при комнатной температуре с первичными антителами. Использовали кроличьи или мышинные антитела к белкам астроцитов – глиофибрилярному белку (GFAP, 1:200, ab279290, Abcam, Великобритания) и глутаминсинтетазе (GS, 1:400,

G2781, Merck-Sigma, Германия), а также к маркеру незрелых нейронов — даблкортину (DCX, 1:100, ab18723, Abcam, Великобритания) и субъединице I митохондриального комплекса IV (цитохромоксидаза, MTCO1, 1:100, 106E1A8, Invitrogen, США). Для выявления связывания антител срезы инкубировали 4 часа с соответствующими вторичными антителами против IgG мыши или кролика (Sigma, Германия), конъюгированными с флуорохромами CF488 или CF555. Ядра докрашивали 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, Merck-Sigma, Германия) и заключали срезы в среду FluoroShield (Merck-Sigma, Германия).

Иммуногистохимическим пероксидазным методом, следуя протоколу производителя антител, выявляли MTCO1. Демаскировку антигенов производили при нагревании в пароварке, 20 мин в цитратном буфере (EnVision Flex pH = 6, Dako, Дания). Срезы с антителами инкубировали при 4°C 18 ч, для визуализации использовали полимерную пероксидазную систему детекции (Novolink, Leica, Германия) с 3,3'-диаминобензидином в качестве хромогена. Ядра докрашивали гематоксилином и заключали срезы в водорастворимую среду Immuno-Mount (Thermo Scientific, США).

Морфометрия и статистическая обработка. Изучение и морфометрия срезов проводились с помощью микроскопов Leica DMLB (США) или Nikon Eclipse NiU (Япония), оснащенных цифровыми камерами и системами анализа изображений. Для захвата всей зубчатой извилины требовалось несколько изображений. Морфометрический анализ выполняли на 4–6 срезах, взятых от каждого животного, в области зубчатой извилины гиппокампа (в его роstralной части) в обоих полушариях. Исследовали не менее 10–15 полей зрения при увеличении объектива $\times 20$ и $\times 40$. Слой зернистых клеток визуализировали по ядрам нейронов. Субгранулярную зону (SGZ) определяли по методике, описанной ранее [18] как область толщиной до трех клеток, расположенную между зернистым и полиморфным слоями. С помощью программ Leica QWin и ImageJ оценивали плотность клеток и интенсивность окрашивания. Все измерения производили на изображениях, полученных с одинаковыми настройками микроскопа.

Количество DCX+ клеток определяли на единицу длины зубчатой извилины. Для оценки распределения MTCO1, на микрофотографиях препаратов окрашенных иммунопероксидазным методом, соматическим нейронам выделяли в программе Leica Qwin вручную и оценивали интенсивность окрашивания (8 бит, 256 градаций серого) с коррекцией на фоновое значение. Интенсивность окрашивания для иммунопероксидазных препаратов определяли как разность максимального значения яркости (255) и средней яркости пикселей в выделенной области, таким образом, меньшее значение

интенсивности соответствовало более светлому окрашиванию на препаратах. Для оценки локализации GS в отростках и телах глиальных клеток, в программе ImageJ была реализована следующая процедура: 1) автоматически сегментировали ядра клеток, окрашенные DAPI; 2) полученную маску расширяли до границ тела клетки, вычитали область ядра и оценивали среднюю яркость в этой зоне; 3) при помощи алгоритма сегментации с адаптивным порогом по Otsu [19] выделяли только отростки клеток, результаты выделения корректировали вручную и так же оценивали среднюю яркость. Учитывая данные, демонстрирующие формирование астроцитами гиппокампа индивидуальных областей (доменов) [20], этот метод позволяет определить интенсивность окрашивания в отростках отдельных клеток астроглии, за исключением их наиболее тонких, дистальных отделов. Также оценивали среднюю интенсивность флуоресценции при окрашивании на GS на поле зрения в соответствующих слоях зубчатой извилины.

Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism. Данные, полученные от каждого животного, усредняли. Данные представлены в виде $M \pm SD$, где M — среднее, SD — среднеквадратичное отклонение. Для сравнения групп использовали дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным тестом Тьюки, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Локализация исследуемых белков в гиппокампе интактных крыс

Использование антител к MTCO1 выявило окрашивание клеток полиморфного (хилуса), зернистого слоев и SGZ зубчатой извилины гиппокампа с преимущественной локализацией маркера в соматическом нейроне (рис. 1а, 1б, рис. 2д). Окрашивание на MTCO1 в виде пунктата (гранул разных размеров) выявляли как в телах нейронов и глии, так и в окружающем их нейропиле (рис. 1а). Клеток, где окрашивание полностью отсутствовало, мы не наблюдали, что подтверждает облигатный характер экспрессии MTCO1. Характер распределения и размеры гранул в клетках различаются, что, возможно, связано с изменениями размеров митохондрий из-за перестройки динамических процессов слияния и деления, и требует дальнейшего анализа на ультраструктурном уровне. Среди клеток SGZ и полиморфного слоев обнаруживали как интенсивно, так и слабо окрашенные нейроны, тогда как в зернистом слое распределение окрашивания в клетках было более равномерным (рис. 1а, рис. 2д). Наибольшее количество интенсивно окрашенных клеток наблюдали в SGZ, клетки полиморфного слоя варьировали по размеру и степени окрашивания.

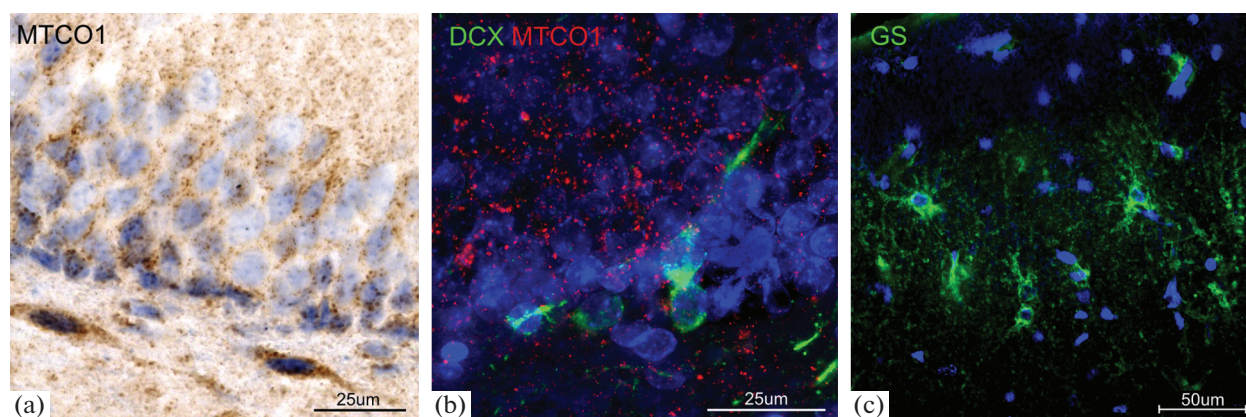


Рис. 1. Распределение субъединицы I цитохромоксидазы (MTCO1), даблкортина (DCX) и глутаминсинтетазы (GS) в клеточных элементах зубчатой извилины гиппокампа интактных крыс.

(a) – Выявление MTCO1 иммунопероксидазным методом. (b) – Выявление DCX (зеленый канал) и MTCO1 (красный канал) в клетках зернистого слоя и субгранулярной зоны. Знаком “*” – помечены DCX-позитивные незрелые нейроны, с низким содержанием MTCO1. Ядра окрашены DAPI (синий). Изображение получено из 10 фокальных планов методом проекции максимальной интенсивности (maximum intensity projection) при увеличении объектива $\times 100$. (c) – Локализация глутаминсинтетазы (зеленый канал) в астроцитах молекулярного слоя.

Локализация DCX – маркера незрелых нейронов, выявлялась большей частью в нейрональных предшественниках в SGZ (рис. 1b, рис. 4c, e), а также в отдельных клетках полиморфного слоя, имеющих глиальную морфологию. Незрелые нейроны были распределены неравномерно – их плотность в передней и средней трети зубчатой извилины была выше, чем в задней трети. Двойное окрашивание на MTCO1 и DCX показало, что DCX+ клетки SGZ характеризуются низким содержанием цитохромоксидазы (рис. 1b), в отличие от зрелых нейронов зернистого слоя.

Астроциты выявляли как с помощью антител к GFAP, так и к GS. В зубчатой извилине обнаруживали преимущественно GS-позитивные астроциты (рис. 1c), при этом GS-позитивных глиальных клеток, лишенных отростков и характерных для других структур мозга, в особенности – белого вещества [21] не было обнаружено. Наибольшая плотность астроглии отмечалась в полиморфном и молекулярном слоях зубчатой извилины.

Изменения исследуемых белков при гипоксии

Выявили значимые различия интенсивности окрашивания MTCO1 в исследуемых структурах в зависимости от количества эпизодов гипоксии (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, $F_{(6, 48)} = 10.7$, $p < 0.001$). Оценка распределения MTCO1 в зубчатой извилине показала, что средняя интенсивность окрашивания при однократном воздействии значимо повышалась в цитоплазме нейронов полиморфного (контроль: 12.83 ± 2.069 , острая гипоксия: 43.65 ± 6.397 , тест Тьюки, $p < 0.001$), (рис. 2a, e) и зернистого слоев (контроль: 16.7 ± 3.03 , острая гипоксия: 43.7 ± 7.68 , тест Тьюки,

$p < 0.001$), (рис. 2b, e). При этом изменения в SGZ были наиболее выраженными и характеризовались повышением MTCO1 как при однократном (контроль: 26.7 ± 2.951 , острая гипоксия: 65.47 ± 15.84 , тест Тьюки, $p < 0.001$), (рис. 2c, e), так и при восьмикратном воздействии (контроль: 26.7 ± 2.951 , 8 эпизодов гипоксии: 58.49 ± 7.13 , тест Тьюки, $p < 0.001$), (рис. 2c, f), что говорит об активации электрон-транспортной функции цитохромоксидазы. Аналогичные данные ранее были получены в коре головного мозга [8]. Хотя в полиморфном и зернистом слоях при длительном воздействии средние значения интенсивности окрашивания снижались, однако эти изменения не были статистически значимыми, и только в SGZ было отмечено значимое (острая гипоксия: 65.47 ± 15.84 , 20 эпизодов гипоксии: 16.46 ± 5.05 , $p < 0.001$) снижение интенсивности MTCO1 в группе после 20 эпизодов гипоксии (рис. 2c, g), по сравнению с группой после острого воздействия, обусловленное, вероятно, необходимостью экономизации энергетического обмена в рамках формирования долгосрочной адаптации к гипоксии. Таким образом, наиболее выраженными были колебания содержания MTCO1 в субгранулярной зоне, что может указывать на высокую чувствительность этой структуры к гипоксии. Выявленное на ранних сроках увеличение содержания MTCO1 отражает краткосрочную компенсаторную активацию метаболизма в зубчатой извилине в целом, и в субгранулярной зоне, необходимую, в том числе, для поддержания дифференцировки нейрональных предшественников в условиях сниженной оксигенации.

Значимое снижение плотности DCX+ нейронов в SGZ отмечалось после 20 эпизодов гипоксии (на 70% по сравнению с контролем, ANOVA $F_{(3, 16)} =$

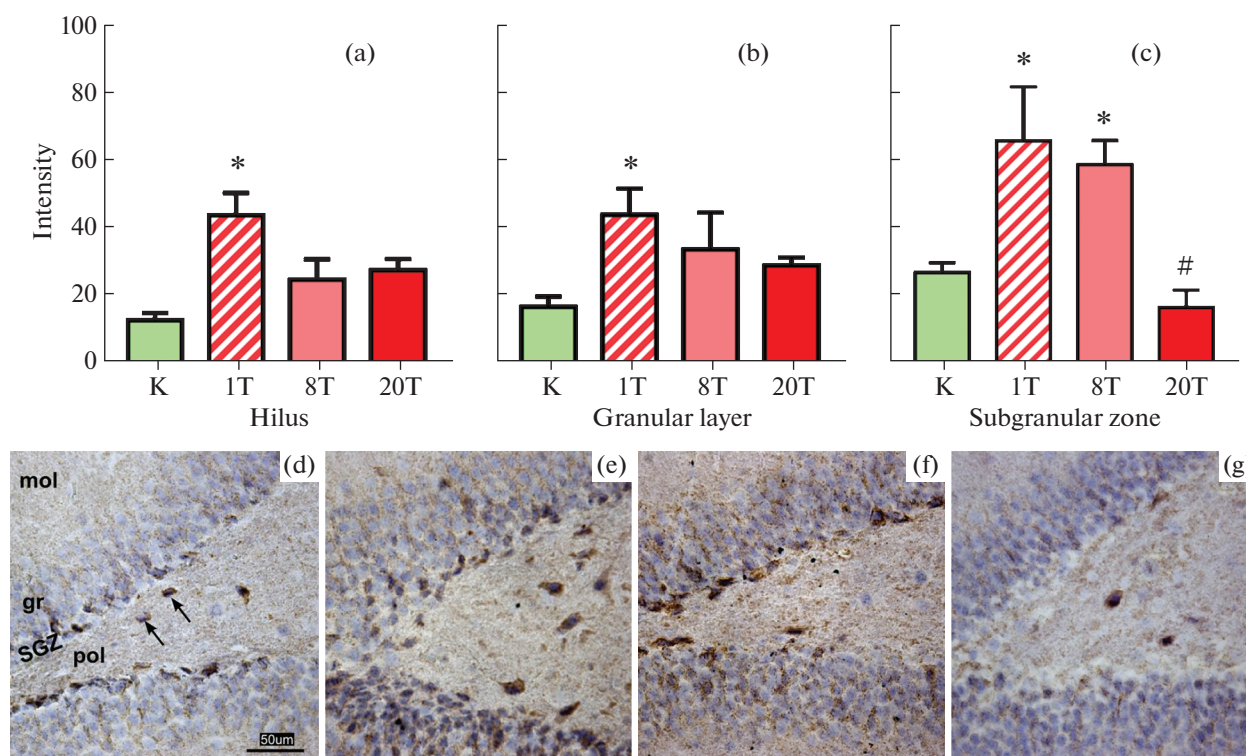


Рис. 2. Средняя интенсивность окрашивания на субъединицу I цитохромоксидазы (MTCO1), в нейронах слоев зубчатой извилины гиппокампа при остром (60 мин, 5000 м) и многократном гипоксическом воздействии (повторные эпизоды, один раз в сутки): (a) – нейроны полиморфного слоя; (b) – нейроны зернистого слоя; (c) – нейроны субгранулярной зоны. К – контрольная группа, 1Т – однократное гипоксическое воздействие; 8Т – восьмикратное гипоксическое воздействие; 20Т – двадцатикратное ежедневное гипоксическое воздействие; * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем; # – $p < 0.05$ по сравнению с предыдущей группой; ANOVA, апостериорный тест Тьюки. Данные представлены в виде $M \pm SD$. Выявление MTCO1 иммунопероксидазным методом: (d) – контрольная группа, (e) – однократное гипоксическое воздействие; (f) – восьмикратное гипоксическое воздействие; (g) – двадцатикратное ежедневное гипоксическое воздействие; стрелки указывают на нейроны субгранулярной зоны и полиморфного слоя с интенсивным окрашиванием на цитохром-оксидазу; докрасивание гематоксилином. mol – молекулярный слой, gr – зернистый слой, SGZ – субгранулярная зона гиппокампа, pol – полиморфный слой.

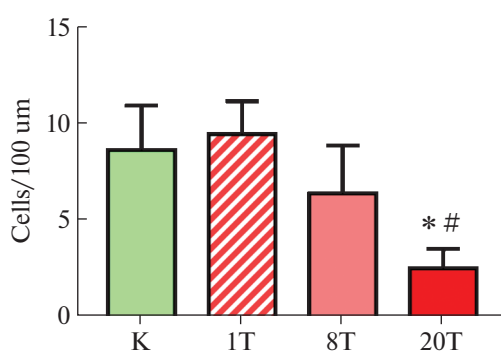


Рис. 3. Плотность DCX-позитивных нейрональных предшественников в субгранулярной зоне (число клеток на длину зубчатой извилины). К – контрольная группа, 1Т – однократное гипоксическое воздействие; 8Т – восьмикратное гипоксическое воздействие; 20Т – двадцатикратное ежедневное гипоксическое воздействие; * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем; # – $p < 0.05$ по сравнению с предыдущей группой; ANOVA, апостериорный тест Тьюки. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

= 12.65, тест Тьюки, $p < 0.001$), однако, количество DCX+ незрелых нейронов (рис. 3a) в SGZ зубчатой извилины гиппокампа не отличалось от контроля при остром и восьмикратном гипоксическом воздействии.

Полученные данные демонстрируют изменения процесса созревания клеток и дифференцировки нейрональных предшественников при многократном гипоксическом воздействии. Кроме того, в полиморфном слое зубчатой извилины гиппокампа также выявили увеличение количества DCX+ клеток глиальной морфологии, что, может быть, обусловлено сдвигом дифференцировки нейрональных предшественников в направлении астроглии (рис. 4c–f). Последнее косвенно согласуется с выявленным при окрашивании на GFAP (рис. 4a, b) увеличением количества астроцитов в полиморфном слое. Однако эти изменения могут быть связаны как с дифференцировкой нейрональных предшественников в астроциты, так и с их пролиферацией или увеличением экспрессии GFAP, поскольку не все

астроциты содержат определяемые количества этого белка.

Кроме того, астроциты реагировали на гипоксию изменениями локализации и экспрессии GS. Средняя интенсивность иммуноокрашивания на GS значительно изменялась в зависимости от количества эпизодов гипоксии (влияние фактора “группа”, ANOVA $F_{(3, 32)} = 8.012$, $p < 0.001$). Этот показатель увеличивался после 8 эпизодов как в полиморфном ($p < 0.05$, на 30% по сравнению с контролем), так и в молекулярном ($p < 0.05$, на 37% по сравнению с контролем) слоях, а при 20 эпизодах снижался, достигая контрольных значений. Повышение GS после 8 эпизодов гипоксии может привести к увеличению продукции глутамина, который затем будет захвачен нейронами и использован для получения метаболитов цикла Кребса, в частности сукцината, коррелируя, таким образом, с динамическим переключением митохондриальных ферментных комплексов субстратного звена дыхательной цепи, необходимым для поддержания потока электронов через цитохромоксидазу [8]. Односторонние изменения интенсивности окрашивания GS и MTCO1 при 8 и 20 эпизодах гипоксического воздействия в виде повышения с последующим снижением до уровня контрольных значений могут указывать на возможное сопряжение глутаматного обмена в астроцитах и потока электронов через цитохромный участок дыхательной цепи в нейронах при адаптации к гипоксии.

Более того, гипоксия приводила к значимым (ANOVA $F_{(3, 796)} = 26.93$, $p < 0.001$) изменениям соотношения содержания GS в соме (перинуклеарном компартменте) и отростках астроцитов молекулярного слоя (рис. 5а, б). Хотя в отростках окрашивание на GS было ниже по сравнению с телами клеток, в то же время изменения в содержании белка были наиболее выражены в отростках. Значимое повышение интенсивности окрашивания в отростках выявляли уже при однократном воздействии гипоксии ($p < 0.001$, на 22% по сравнению с контролем), а при многократном воздействии она оставалась повышенной. Эти данные свидетельствуют о перераспределении фермента в астроцитах в зависимости от их функционального состояния.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цитохромоксидаза — универсальный маркер метаболической активности нейронов, изменения экспрессии которого продемонстрированы на разных моделях гипоксии. Например, при хронической внутриутробной гипоксии наблюдалось снижение активности МТСО в переднем мозге плодов морских свинок. Несмотря на вариабельность реакции остальных комплексов дыхательной цепи, активность МТСО значительно снижалась как при ранней (начиная с 28-го дня), так и при поздней

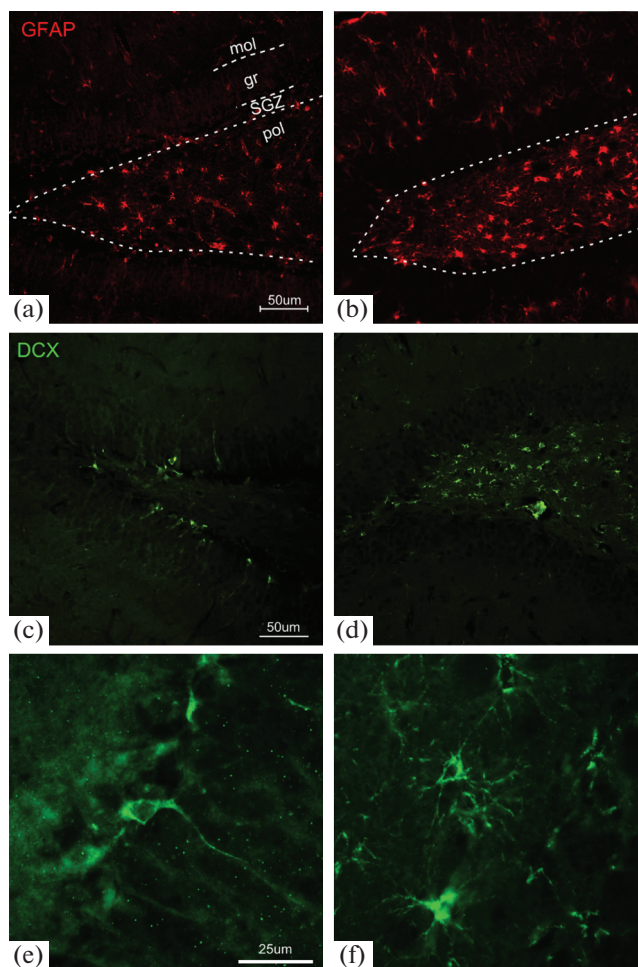


Рис. 4. Увеличение содержания GFAP (а, б) и изменения локализации DCX (с, d, е, ф) в глиальных клетках зубчатой извилины гиппокампа после 20-кратного гипоксического воздействия (контроль — слева, гипоксия — справа). mol — молекулярный слой, gr — зернистый слой, SGZ — субгранулярная зона гиппокампа, pol — полиморфный слой.

(начиная с 50-го дня) интранатальной гипоксии [22], что подчеркивает универсальность этого показателя.

В нашей работе оценка содержания цитохромоксидазы в клетках гиппокампа была исследована при воздействии однократной и многократной гипоксии. Было выявлено значимое повышение МТСО1 в телах как зрелых, так и незрелых нейронов при однократной гипоксии с последующим снижением при многократных воздействиях. Наши результаты согласуются с экспериментом [23], в котором гипобарическая гипоксия (высота 5000 м) вначале повышала (2-й и 5-й дни воздействия), а затем снижала (15-й и 30-й день) экспрессию мРНК МТСО1 в коре головного мозга. В другой работе показано, что при острой гипоксии повышается активность цитохромоксидазы в дендритах нейронов комплекса Бетцингера (в продол-

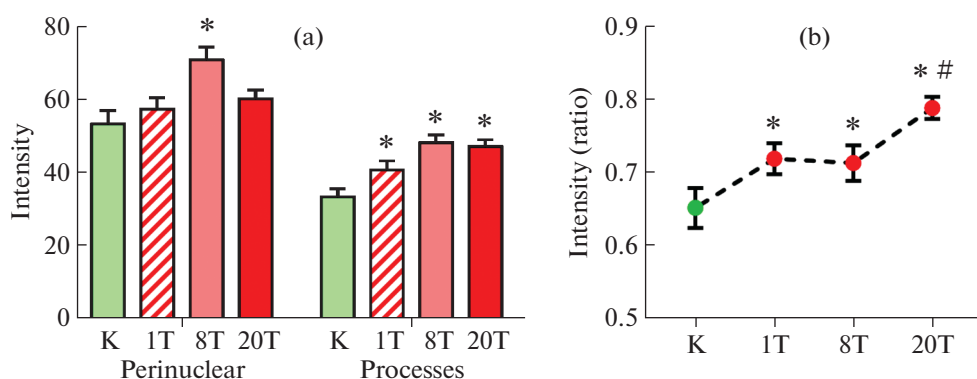


Рис. 5. Средние значения интенсивности окрашивания на глутаминсинтетазу в соме и отростках астроцитов молекулярного слоя (а) и их соотношение (б). К — контрольная группа, 1Т — однократное гипоксическое воздействие; 8Т — восьмикратное гипоксическое воздействие; 20Т — двадцатикратное ежедневное гипоксическое воздействие; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем; # — $p < 0.05$ по сравнению с предыдущей группой; ANOVA, апостериорный тест Тьюки. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

говатом мозге) и увеличивается количество темно-реактивных митохондрий при электронно-микроскопическом исследовании [24]. И наоборот, хроническая периодическая гипоксия приводила к снижению активности цитохромоксидазы в дендритных митохондриях и ослаблению локальной биоэнергетики [25].

В нашем исследовании наиболее выраженные изменения в интенсивности иммуноокрашивания на МТСО1 были отмечены в SGZ зоне зубчатой извилины гиппокампа, что говорит об изменении метаболизма в нейрогенной нише при гипоксическом воздействии. Повышение активности МТСО1 при однократном эпизоде гипоксии с последующим снижением при многократных воздействиях может быть связано с кратковременной активацией метаболизма для поддержания пула нейрональных предшественников. Двойное окрашивание не показало высокого содержания МТСО1 в DCX+ клетках, поэтому повышение интенсивности МТСО1 в SGZ при острой гипоксии в 8 эпизодах очевидно, обусловлено активацией метаболизма в незрелых нейронах, находящихся на поздних стадиях дифференцировки.

Известно, что в процессе дифференцировки NSC происходит переключение метаболизма на окислительное фосфорилирование в связи с возрастающими энергетическими потребностями нейронов [7], в связи с чем митохондриальная дисфункция в первую очередь должна нарушать дифференцировку и созревание взрослых нейронов в зубчатой извилине, однако, тяжелые нарушения митохондриальной биоэнергетики также ухудшают пролиферацию и выживаемость NSC [26]. По-видимому, HIF1 α , управляя функциями митохондрий в условиях гипоксии, обеспечивает сдвиг пролиферации и дифференцировки NSC. Так, гиперэкспрессия HIF1 α значимо увеличивала гликолитическую активность в индуцированных плю-

рипотентных стволовых клетках *in vitro*, тогда как его нокдаун повышал окислительное фосфорилирование и усиливал дифференцировку NSC [27]. В то же время другие авторы выявили, что в условиях умеренной гипоксии пролиферация и выживаемость NSC увеличиваются [28].

Проведенная нами оценка количества DCX+ клеток в SGZ зубчатой извилины гиппокампа выявила значимое снижение DCX+ нейронов после 20 эпизодов гипоксии. Сходные изменения были показаны [29] при 30-дневной периодической гипоксии как для ранних, так и для поздних стадий нейрогенеза и характеризовались увеличением количества пролиферирующих Sox2-позитивных нейрональных предшественников и уменьшением числа DCX+ нейронов.

Кроме того, в условиях двадцатикратного воздействия в полиморфном слое зубчатой извилины нами были обнаружены DCX+ клетки глиальной морфологии. Сходным образом, в недавнем исследовании на трансгенных мышах Nestin-CreERT2/Ai27D [29], экспрессирующих маркер нейрональных прогениторных клеток предшественник — нестин — показано, что 30-дневная перемежающаяся гипоксия увеличивает количество GFAP+/Nestin+ клеток с радиальной глиальной морфологией. При этом доля новообразованных нейронов гранулярного слоя была уменьшена, что соответствовало снижению количества DCX+ нейронов в условиях гипоксии.

Выявленные нами DCX+ клетки в хилусе могут иметь различную природу. В патологических условиях возможна миграция нейронов из субгранулярной зоны в хилус. Например, в ряде работ [30, 31] показано, что в результате нарушения миграции нейрональных предшественников на моделях эпилепсии эктопические гранулярные нейроны обнаруживаются в полиморфном слое.

Кроме того, DCX может также колокализироваться с маркерами астроглии. Так, при ишемическом повреждении коры у мышей в перинфарктной зоне были выявлены разные типы DCX+ клеток, в том числе — звездчатой морфологии, экспрессирующие глиальные маркеры GFAP и S100B [32], что согласуется с нашим исследованием.

Мы предполагаем, что длительный режим гипоксии в нашем эксперименте мог изменить направление дифференцировки клеток, что в том числе может быть обусловлено перестройкой глутаматергической нейромедиации. Так, снижение количества DCX+ клеток в SGZ при 20 эпизодах гипоксии и появление клеток глиальной морфологии в полиморфном слое коррелировали с уменьшением активности GS при двадцатикратном воздействии, что могло привести к повышению внеклеточного пула глутамата. Ранее [33] было показано, что односторонняя внутригиппокампальная инъекция каиновой кислоты, являющейся агонистом ионотропных каинатных рецепторов глутамата, вызывает выраженный сдвиг линии DCX+ клеток в сторону генерации астроцитов. Авторы объясняют полученный результат способностью DCX+ клеток предшественниц реагировать на электрические и химические сигналы и регрессировать до более ранних стадий с восстановлением астроглиогенного потенциала.

В нашем эксперименте появление DCX+ клеток в полиморфном слое при двадцатикратном воздействии сочеталось с увеличением количества GFAP+ астроцитов. Полученный результат может быть связан как с делением зрелых астроцитов, так и с изменением направления дифференцировки клеток предшественниц. Реактивные астроциты продуцируют нейротрофные и ростовые факторы, в том числе BDNF и TGF β , цитокины и хемокины. Во время воспаления или повреждения ЦНС экспрессия лигандов и рецепторов TGF β в астроцитах быстро повышается, что является характерным признаком развития глиоза [34]. Показана связь HIF1 α и TGF β [6], а также увеличение TGF β как в сыворотке крови крыс [35], так и в лизатах ткани мозга [36] после гипоксического воздействия. При этом астроциты являются основными источниками эндогенной продукции TGF β в ЦНС. TGF β контролирует широкий спектр функций, включая процессы нейро- и ангиогенеза, ремоделирования и репарации, а также воспалительные и иммунные реакции [37]. Было показано, что внутримозговая инфузия TGF- β ингибировала пролиферацию NSC у крыс [38]. Помимо блокирования пролиферации NSC и поддержания пула клеток нейрогенной ниши в состоянии покоя, введение TGF- β также способствовало дифференцировке и выживанию нейронов с увеличением количества DCX+ клеток [39]. Было установлено, что в астроцитах TGF- β регулирует дифференцировку радиальной глии и образование астроцитов во время развития,

а передача сигналов TGF- β является одним из основных путей, регулирующих активность промотора GFAP — белка промежуточных филаментов и маркера зрелых астроцитов [37]. Описанный механизм участия TGF- β в реакциях воспаления и нейрогенеза также может объяснить наблюдаемое нами увеличение количества GFAP+ и DCX+ клеток глиальной морфологии при 20 эпизодах гипоксии.

Ранее было отмечено, что гипоксия не только влияет на нейрональные предшественники, но и ускоряет созревание астроцитов. У детенышей крыс при трехчасовой системной гипоксии (8% O₂) усиливалась дифференцировка астроцитов неокортекса и повышалось содержание GFAP и белков, участвующих в обмене глутамата (GS и транспортера глутамата GLAST). Кроме того, повышение GLAST сочеталось с увеличением уровня GFAP, взаимодействующего с GLAST [40]. Эти данные указывают на связь экспрессии GFAP и белков системы захвата и утилизации внеклеточного глутамата, позволяя предположить адаптивное значение активации астроцитов, наблюдаемой в нашем эксперименте.

В нашем исследовании было обнаружено значимое повышение содержания GS при восьми эпизодах гипоксии, что может быть обусловлено энергопродуцирующей ролью глутамата, используемого в нейронах для получения сукцината, который затем будет окисляться в цикле Кребса. Снижение интенсивности окрашивания GS после 20 эпизодов до уровня контрольных значений коррелирует при этом со снижением активации MTCO1 в нейронах, и может быть связано с уменьшением энергетической роли глутамата и продукции сукцината из-за восстановления функции НАД-зависимого окисления [8], также приводя к увеличению внеклеточного пула глутамата. Так, на модели ишемии было показано, что в этих условиях наблюдаются срыв адаптации, снижение захвата глутамата и потеря GS астроцитами коры [41]. При этом GS содержащие астроциты в зубчатой извилине демонстрировали большую устойчивость на ишемической модели, по сравнению с астроцитами неокортекса [41].

Интересно, что при определении соотношения количества GS в перинуклеарном компартменте и отростках астроцитов молекулярного слоя зубчатой извилины гиппокампа нами было выявлено перераспределение фермента. Обратные изменения — перемещение GS из тонких дистальных отростков в более толстые проксимальные отделы отростков астроцитов в CA1 и CA3 областях гиппокампа были качественно показаны на модели хронической височной эпилепсии [42]. Неравномерность распределения GS с преимущественной локализацией фермента в начальных сегментах отростков астроцитов обнаруживалась и в периферической зоне ишемического инфаркта мозга у крыс [43]. Эти данные в сопоставлении указывают

на возможность тонкой регуляции глутаматного обмена путем перераспределения GS в отростках астроцитов.

Ряд работ посвящен роли глутаминсинтетазы (GS) в процессах обучения и в формировании памяти, подчеркивающих значение этого фермента в функционировании нейронных сетей в гиппокампе. У мышей с селективной делецией GS в неокортексе и гиппокампе наблюдали нейродегенерацию и спонтанные судороги [44]. Кроме того, ранее было отмечено [16], что ингибирование GS нарушает консолидацию памяти у цыплят, причем амнестический эффект устраняется смесью из α -кетоглутарата и аланина, что, по мнению авторов, обусловлено использованием α -кетоглутарата в качестве субстрата для глутаматдегидрогеназы, являющейся поставщиком глутамата в нейронах в условиях его нарушенной конверсии из астроцитарного глутамината. Участие метаболитов цикла Кребса в поддержании реакций глутамин-глутаматного обмена подчеркивает важность энергопродуцирующей роли глутамата и глио-нейрональных взаимодействий при гипоксии в нервной ткани, что требует дальнейших исследований.

Таким образом, проведенная работа демонстрирует адаптивный характер изменений энергетического обмена в нейрогенной нише гиппокампа и подчеркивает взаимосвязь митохондриальных изменений, дифференцировки нейрональных предшественников и реакции астроглии в ответ на курсовое воздействие гипобарической гипоксии. При гипоксическом воздействии наблюдали фазные изменения исследуемых маркерных белков — цитохромоксидазы (MTCO) в нейронах и глутаминсинтетазы (GS) в астроцитах. Выявленные иммуногистохимические особенности свидетельствуют о том, что срочная адаптация к гипоксии обусловлена репрограммированием работы дыхательной цепи нейронов. При этом адаптационные механизмы при многократном воздействии связаны с реакцией астроглии и модуляцией глутаматергического обмена, характеризующихся повышением содержания GS после 8 эпизодов гипоксии и выраженным перераспределением фермента в отростках астроцитов как при остром, так и при многократном воздействии. Высокая активность глутаматных реакций в астроцитах в первые 8 дней гипоксического воздействия и последующее снижение после 20 эпизодов гипоксии подтверждаются сопряженной регуляцией активности MTCO1 в нейронах, отражая тем самым динамику репрограммирования работы дыхательной цепи. Снижение работы цитохромного участка в нейронах после 20 эпизодов гипоксии может быть обусловлено переходом на новый уровень регуляции фермента, необходимым для экономизации процесса энергообразования, являясь, таким образом, маркером завершения формирования адаптации к гипоксии. Изменение адаптационных реакций при двадцати-

кратном воздействии привело к снижению количества DCX+ нейронов и появлению DCX+ клеток глиальной морфологии, влияя, вероятно, на дифференцировку нейрональных и глиальных предшественников в гиппокампе и требуя дальнейшего изучения для более точного определения природы DCX+ клеток. Понимание механизмов воздействия периодической гипоксии на процесс нейрогенеза поможет в разработке таргетной терапии, корректирующей когнитивные нарушения при заболеваниях с гипоксической компонентой.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Локального этического комитета ФГБНУ Научный центр неврологии (Протокол № 10 – 7/20 от 27.11.2020 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.Н.Ф., Д.Н.В., А.В.Е., Э.Л.Г.), сбор, обработка и анализ данных (Е.Н.Ф., Д.Н.В., А.В.Е.), написание и редактирование текста (Е.Н.Ф., Д.Н.В., А.В.Е., Т.И.Б., В.В.Г., Л.Д.Л., В.С.С.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang H, Roman RJ, Fan F (2022) Hippocampus is more susceptible to hypoxic injury: has the Rosetta Stone of regional variation in neurovascular coupling been deciphered? *GeroScience* 44(1):127–130. <https://doi.org/10.1007/s11357-021-00449-4>
2. Abbott LC, Nigussie F (2020) Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat Histol Embryol* 49(1):3–16. <https://doi.org/10.1111/ahe.12496>
3. Morgun AV, Osipova ED, Boytsova EB, Shuvaev AN, Komleva YK, Trufanova LV, Vais EF, Salmina AB (2019) Astroglia-mediated regulation of cell development in the model of neurogenic niche in vitro treated with A β 1-42. *Biomed Khim* 65(5):366–373. <https://doi.org/10.18097/PBMC20196505366>

4. Egorova A, Baranich T, Brydun A, Glinkina V, Sukhorukov V (2022) Morphological and Histophysiological Features of the Brain Capillary Endothelium. *J Evol Biochem Physiol* 58:755–768.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022030115>
5. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A (2010) Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7(2):150–161.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.007>
6. Chen H, Ma D, Yue F, Qi Y, Dou M, Cui L, Xing Y (2022) The Potential Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in the Progression and Therapy of Central Nervous System Diseases. *Cur Neuroparmacol* 20(9):1651–1666.
<https://doi.org/10.2174/1570159X19666210729123137>
7. Zheng X, Boyer L, Jin M, Mertens J, Kim Y, Ma L, Ma L, Hamm M, Gage FH, Hunter T (2016) Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *eLife* 5:e13374.
<https://doi.org/10.7554/eLife.13374>
8. Lukyanova L, Germanova E, Khmil N, Pavlik L, Mikheeva I, Shigaeva M, Mironova G (2021) Signaling Role of Mitochondrial Enzymes and Ultrastructure in the Formation of Molecular Mechanisms of Adaptation to Hypoxia. *Int J Mol Sci* 22(16):8636.
<https://doi.org/10.3390/ijms22168636>
9. Arnold S (2012) Cytochrome c oxidase and its role in neurodegeneration and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol* 748:305–339.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_13
10. Yang L, Venneti S, Nagrath D (2017) Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Ann Rev Biomed Engineer* 19:163–194.
<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>
11. Namba T, Dóczi J, Pinson A, Xing L, Kalebic N, Wilsch-Bräuninger M, Long KR, Vaid S, Lauer J, Bogdanova A, Borgonovo B, Shevchenko A, Keller P, Drechsel D, Kurzchalia T, Wimberger P, Chinopoulos C, Huttner WB (2020) Human-Specific ARHGAP11B Acts in Mitochondria to Expand Neocortical Progenitors by Glutaminolysis. *Neuron* 105(5):867–881.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.11.027>
12. Turner DA, Adamson DC (2011) Neuronal-astrocyte metabolic interactions: understanding the transition into abnormal astrocytoma metabolism. *J Neuropathol Exp Neurol* 70(3):167–176.
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31820e1152>
13. Schousboe A (2019) Metabolic signaling in the brain and the role of astrocytes in control of glutamate and GABA neurotransmission. *Neurosci Lett* 689:11–13.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.01.038>
14. Sonnewald U, Qu H, Aschner M (2002) Pharmacology and toxicology of astrocyte-neuron glutamate transport and cycling. *J Pharmacol Exp Ther* 301(1):1–6.
<https://doi.org/10.1124/jpet.301.1.1>
15. Jayakumar AR, Norenberg MD (2016) Glutamine Synthetase: Role in Neurological Disorders. *Adv Neurobiol* 13:327–350.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4_13
16. Gibbs ME, O'Dowd BS, Hertz L, Robinson SR, Sedman GL, Ng KT (1996) Inhibition of glutamine synthetase activity prevents memory consolidation. *Brain research. Cogn Brain Res* 4(1):57–64.
[https://doi.org/10.1016/0926-6410\(96\)00020-1](https://doi.org/10.1016/0926-6410(96)00020-1)
17. Son H, Kim S, Jung DH, Baek JH, Lee DH, Roh GS, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Lee DK, Kim HJ (2019) Insufficient glutamine synthetase activity during synaptogenesis causes spatial memory impairment in adult mice. *Sci Rep* 9(1):252.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36619-2>
18. Miller JA, Nathanson J, Franjic D, Shim S, Dalley RA, Shapouri S, Smith KA, Sunkin SM, Bernard A, Bennett JL, Lee CK, Hawrylycz MJ, Jones AR, Amaral DG, Šestan N, Gage FH, Lein ES (2013) Conserved molecular signatures of neurogenesis in the hippocampal subgranular zone of rodents and primates. *Development (Cambridge, England)* 140(22):4633–4644.
<https://doi.org/10.1242/dev.097212>
19. Goh TY, Basah SN, Yazid H, Safar MJA, Saad FSA (2018) Performance Analysis of Image Thresholding: Otsu Technique. *Measurement* 114:298–307.
<https://doi.org/10.1016/j.measurement.2017.09.052>
20. Refaeli R, Doron A, Benmelech-Chovav A, Groysman M, Kreisel T, Loewenstein Y, Goshen I (2021) Features of hippocampal astrocytic domains and their spatial relation to excitatory and inhibitory neurons. *Glia* 69(10):2378–2390.
<https://doi.org/10.1002/glia.24044>
21. Anlauf E, Derouiche A (2013) Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization. *Front Endocrinol* 4:144.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00144>
22. Quebedeaux TM, Song H, Giwa-Otusa J, Thompson LP (2022) Chronic Hypoxia Inhibits Respiratory Complex IV Activity and Disrupts Mitochondrial Dynamics in the Fetal Guinea Pig Forebrain. *Reproduct Sci (Thousand Oaks, Calif.)* 29(1):184–192.
<https://doi.org/10.1007/s43032-021-00779-w>
23. Tan XL, Liu JZ, Cao LF, Deng ZC, Li YH (2002) Effects of hypoxic exposure on coordinative expression of cytochrome oxidase subunits I and IV in rat cerebral cortex. *Sheng Li Xue Bao* 54(6):519–524.
24. Kang JJ, Guo B, Liang WH, Lam CS, Wu SX, Huang XF, Wong-Riley MTT, Fung ML, Liu YY (2019) Daily acute intermittent hypoxia induced dynamic changes in dendritic mitochondrial ultrastructure and cytochrome oxidase activity in the pre-Bötzing complex of rats. *Exp Neurol* 313:124–134.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.12.008>
25. Kang JJ, Fung ML, Zhang K, Lam CS, Wu SX, Huang XF, Yang SJ, Wong-Riley MTT, Liu YY (2020) Chronic intermittent hypoxia alters the dendritic mitochondrial structure and activity in the pre-Bötzing complex of rats. *FASEB J: Official Publ Federat Am Society Exp Biol* 34(11):14588–14601.
<https://doi.org/10.1096/fj.201902141R>
26. Lisowski P, Kannan P, Mlody B, Prigione A (2018) Mitochondria and the dynamic control of stem cell homeostasis. *EMBO Reports* 19(5):e45432.
<https://doi.org/10.15252/embr.201745432>
27. Cui, P, Zhang P, Yuan L, Wang L, Guo X, Cui G, Zhang Y, Li M, Zhang X, Li X, Yin Y, Yu Z (2021) HIF-1 α Affects the Neural Stem Cell Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells via MFN2-Mediated Wnt/ β -

- Catenin Signaling. *Front Cell Devel Biol* 9:671704. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.671704>
28. *Chen HL, Pistollato F, Hoepfner DJ, Ni HT, McKay RD, Panchision DM* (2007) Oxygen tension regulates survival and fate of mouse central nervous system precursors at multiple levels. *Stem Cells* (Dayton, Ohio) 25(9):2291–2301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0609>
 29. *Khuu MA, Pagan CM, Nallamothu T, Hevner RF, Hodge RD, Ramirez JM, Garcia AJ 3rd* (2019) Intermittent Hypoxia Disrupts Adult Neurogenesis and Synaptic Plasticity in the Dentate Gyrus. *J Neurosci: Official J Society Neurosci* 39(7):1320–1331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1359-18.2018>
 30. *Kasahara Y, Nakashima H, Nakashima K* (2023) Seizure-induced hilar ectopic granule cells in the adult dentate gyrus. *Front Neurosci* 17:1150283. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1150283>
 31. *Cameron MC, Zhan RZ, Nadler JV* (2011) Morphologic integration of hilar ectopic granule cells into dentate gyrus circuitry in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 519(11):2175–2192. <https://doi.org/10.1002/cne.22623>
 32. *Kunze A, Achilles A, Keiner S, Witte OW, Redecker C* (2015) Two distinct populations of doublecortin-positive cells in the perilesional zone of cortical infarcts. *BMC Neurosci* 16:20. <https://doi.org/10.1186/s12868-015-0160-8>
 33. *Moura DMS, Brandão JA, Lentini C, Heinrich C, Queiroz CM, Costa MR* (2020) Evidence of Progenitor Cell Lineage Rerouting in the Adult Mouse Hippocampus After Status Epilepticus. *Front Neurosci* 14:571315. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.571315>
 34. *Schlecht A, Vallon M, Wagner N, Ergün S, Braunger BM* (2021) TGFβ-Neurotrophin Interactions in Heart, Retina, and Brain. *Biomolecules* 11(9):1360. <https://doi.org/10.3390/biom11091360>
 35. *Dzhalilova DS, Diatropov ME, Tsvetkov IS, Makarova OV, Kuznetsov SL* (2018) Expression of Hif-1α, Nf-κb, and Vegf Genes in the Liver and Blood Serum Levels of HIF-1α, Erythropoietin, VEGF, TGF-β, 8-Isoprostane, and Corticosterone in Wistar Rats with High and Low Resistance to Hypoxia. *Bull Exp Biol Med* 165(6):781–785. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4264-x>
 36. *Baumann J, Tsao CC, Patkar S, Huang SF, Francia S, Magnussen SN, Gassmann M, Vogel J, Köster-Hegmann C, Ogunshola OO* (2022) Pericyte, but not astrocyte, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) drives hypoxia-induced vascular permeability in vivo. *Fluids Barriers CNS* 19(1):6. <https://doi.org/10.1186/s12987-021-00302-y>
 37. *Luo J* (2022) TGF-β as a Key Modulator of Astrocyte Reactivity: Disease Relevance and Therapeutic Implications. *Biomedicines* 10(5):1206. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051206>
 38. *Wachs FP, Winner B, Couillard-Despres S, Schiller T, Aigner R, Winkler J, Bogdahn U, Aigner L* (2006) Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65(4):358–370. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000218444.53405.f0>
 39. *Mathieu P, Piantanida AP, Pitossi F* (2010) Chronic expression of transforming growth factor-beta enhances adult neurogenesis. *Neuroimmunomodulation* 17(3):200–201. <https://doi.org/10.1159/000258723>
 40. *Sen E, Basu A, Willing LB, Uliasz TF, Myrkalo JL, Van-nucci SJ, Hewett SJ, Levison SW* (2011) Pre-conditioning induces the precocious differentiation of neonatal astrocytes to enhance their neuroprotective properties. *ASN neuro* 3(3):e00062. <https://doi.org/10.1042/AN20100029>
 41. *Lee A, Lingwood BE, Bjorkman ST, Miller SM, Poronnik P, Barnett NL, Colditz P, Pow DV* (2010) Rapid loss of glutamine synthetase from astrocytes in response to hypoxia: implications for excitotoxicity. *J Chem Neuroanatomy* 39(3):211–220. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2009.12.002>
 42. *Papageorgiou IE, Gabriel S, Fetani AF, Kann O, Heine-mann U* (2011) Redistribution of astrocytic glutamine synthetase in the hippocampus of chronic epileptic rats. *Glia* 59(11):1706–1718. <https://doi.org/10.1002/glia.21217>
 43. *Воронков, ДН, Сальникова ОВ, Художков РМ* (2017) Иммуноцитохимические и морфометрические изменения астроглии в перифокальной зоне моделируемого инфаркта мозга. *Анналы клин и экспер неврол* 11(1):40–46. [Voronkov DN, Salnikova OV, Khudoerkov RM (2017) Immunocytochemical and morphometric changes in astroglial cells in the perifocal zone of the cerebral infarction model. *Annals Clin Exp Neurol* 11(1):40–46. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18454/ACEN.2017.1.6158>
 44. *Zhou Y, Dhafer R, Parent M, Hu QX, Hassel B, Yee SP, Hyder F, Gruenbaum SE, Eid T, Danbolt NC* (2019) Selective deletion of glutamine synthetase in the mouse cerebral cortex induces glial dysfunction and vascular impairment that precede epilepsy and neurodegeneration. *Neurochem Internat* 123:22–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.07.009>

CHANGES IN THE NEUROGENIC NICHE OF THE RAT HIPPOCAMPUS UNDER HYPOXIC EXPOSURE

E. N. Fedorova^{a,b,#}, D. N. Voronkov^a, A. V. Egorova^{a,b}, T. I. Baranich^{a,b}, V. V. Glinkina^b, E. L. Germanova^c,
L. D. Lukyanova^c, and V. S. Sukhorukov^{a,b}

^aResearch Center of Neurology, Moscow, Russia

^bPirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

^cInstitute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

[#]e-mail: ewgenia.feodorowa2011@yandex.ru

One of the most vulnerable brain structures to hypoxia is the hippocampus. Maintenance of the neurogenic niche cell pool in the subgranular zone of the hippocampus (SGZ) is provided by adaptive mechanisms. Among them are changes in the functional activity of mitochondrial respiratory chain complexes and the reaction of astroglia, which provides metabolic support for neurons. In order to study the dynamics of adaptive changes in neurons and glia in the dentate gyrus of the hippocampus under hypoxic conditions on a model of intermittent hypobaric hypoxia (5000 m, equivalent to 10.5% O₂), with a single (60 min) and multiple (8 and 20 episodes) exposure in low-resistant rats, immunomorphological methods revealed the features of localization and content in the neurons of complex IV mitochondrial respiratory chain (MTCO1), astrocyte marker proteins glutamine synthetase (GS) and GFAP, and doublecortin (DCX) in immature neurons. With a single hypoxia, the content of MTCO1 in neurons significantly increased, and after eight exposures, the amount of glutamine synthetase (GS) in astrocytes of the dentate gyrus of the hippocampus increased. Changes in the content of GS were most pronounced in the processes of astrocytes, which indicates a redistribution of GS. The number of DCX+ neurons in the SGZ significantly decreased after 20 episodes of hypoxia. At the same time, DCX+ cells of glial morphology were found in the polymorphic layer, and staining for GFAP showed an increase in the number of astrocytes. This may be due to a shift in the direction of cell differentiation in the neurogenic niche. Thus, in hypoxia, at the initial stage, a functional restructuring of the respiratory chain of neurons of the granular layer occurs. Subsequently, it is noted by the activation of astrocytes that modulate glutamate metabolism. The presence of a relationship between the dynamics of adaptive reactions of energy exchange in neurons and glia and changes in neurogenesis during 20 episodes of hypoxia suggests that during long-term hypoxia, the differentiation of neural precursors of SGZ in the direction of astroglia occurs, however, this issue requires further study in order to more accurately determine the nature of DCX+ cells.

Keywords: hypobaric hypoxia, cytochrome oxidase, glutamine synthetase, neurogenesis, hippocampus