

Нейропротективные свойства ингибитора C-Jun N-terminal kinase (JNK) при гипоксической гипоксии

Зюзьков Г.Н., Удуд Е.В., Мирошниченко Л.А., Полякова Т.Ю.,
Симанина Е.В., Ставрова Л.А., Агафонов В.И., Жданов В.В.

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины (НИИФиРМ) имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – выявить влияние ингибитора JNK на формирование нарушений психоневрологического статуса экспериментальных животных при моделировании постгипоксической энцефалопатии и вскрыть механизмы его действия, связанные с функционированием нейральных стволовых клеток (СК) головного мозга.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 96 аутбредных самцах мышей. Постгипоксическая энцефалопатия моделировалась у беспородных мышей с помощью гипоксии гермообъема. Ингибитор JNK вводили мышам однократно перед гипоксическим воздействием подкожно в дозе 15 мг/кг. Изучали психоневрологический статус, содержание нейральных СК в субвентрикулярной зоне головного мозга экспериментальных животных и прямое влияние ингибитора JNK на интактные нейральные СК в условиях *in vitro*.

Результаты. Выявили выраженное церебропротекторное действие фармакологического агента, заключающееся в нормализации показателей ориентировочно-исследовательского поведения и условно-рефлекторной деятельности у экспериментальных животных. Указанные эффекты развивались на фоне значительного увеличения содержания нейральных СК в субвентрикулярной зоне головного мозга. При этом в экспериментах *in vitro* обнаружено прямое стимулирующее влияние ингибитора JNK на нейральные СК.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о выраженном нейропротекторном действии ингибитора JNK. При этом в основе предупреждения развития нарушений деятельности ЦНС и их компенсации, очевидно, лежит сохранность способности нервной ткани к репарации, связанной с функционированием резидентных нейральных СК.

Ключевые слова: регенеративная медицина, церебропротекторные средства, ингибитор JNK, сигнальная трансдукция, энцефалопатия, нейральные стволовые клетки.

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

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках темы № 0550-2014-0207 государственного задания ФАНО России и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00013.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено комитетом по этике НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ РАН (протокол № 514092017 от 14.09.2017).

Для цитирования: Зюзьков Г.Н., Удуд Е.В., Мирошниченко Л.А., Полякова Т.Ю., Симанина Е.В., Ставрова Л.А., Агафонов В.И., Жданов В.В. Нейропротективные свойства ингибитора C-Jun

N-terminal kinase (JNK) при гипоксической гипоксии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 80–88. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-80-88>.

УДК 616.24-008.4-001.83-085.214.21

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-80-88>

Neuroprotective properties of the C-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor in hypoxic hypoxia

Zyuz'kov G.N., Udut E.V., Miroshnichenko L.A., Poljakova T.Ju.,
Simanina E.V., Stavrova L.A., Agafonov V.I., Zhdanov V.V.

*Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (GRIPRM), Tomsk National Research Medical Center (NRMC) of Russian Academy of Sciences
3, Lenin Av., Tomsk, 634028, Russian Federation*

ABSTRACT

The aim of the study was to reveal the influence of the JNK inhibitor on the induction of disturbances in the psychoneurological status of experimental animals in the modeling of posthypoxic encephalopathy and to reveal the mechanisms of its action related to the functioning of the neural stem cells of the brain.

Materials and methods. The experiments were performed on 64 male outbred mice. Posthypoxic encephalopathy was modeled in non-native mice with hypoxia of the hermetic volume. The JNK inhibitor was administered to mice subcutaneously at a dose of 15 mg/kg once before hypoxic exposure. We studied the neuropsychiatric status, the content of neuronal stem cells in the subventricular zone of the brain of experimental animals, and the direct effect of the JNK inhibitor on intact neural stem cells *in vitro*.

Results. The expressed cerebroprotective action of the pharmacological agent was revealed, which consisted of normalizing the indices of orientation and exploratory behavior and conditioned activity in experimental animals. These effects developed against a background of a significant increase in the content of neural stem cells in the subventricular zone of the brain. In the experiments *in vitro*, a direct stimulating effect of the JNK inhibitor on neural stem cells was found.

Conclusions. The obtained results showed a neuroprotective action of the JNK inhibitor. At the same time, the prevention and compensation of the development of disturbances in the activity of the central nervous system is based on the preservation of the ability of the nerve tissue to repair and associated with the functioning of resident neural stem cells.

Key words: regenerative medicine, cerebroprotective drugs, inhibitor JNK, signal transduction, encephalopathy, neural stem cells.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was performed under the task number 0550-2014-0207 of the state assignment of the Federal Agency for Scientific Organizations of Russia; and with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research under the research project No. 18-015-00013.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the ethics committee at GRIPRM, TNRMС of RAS (Protocol No. 514092017 of 14.09.2017).

For citation: Zyuz'kov G.N., Udut E.V., Miroshnichenko L.A., Poljakova T.Ju., Simanina E.V., Stavrova L.A., Agafonov V.I., Zhdanov V.V. Neuroprotective properties of the C-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor in hypoxic hypoxia. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 80–88. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-80-88>.

ВВЕДЕНИЕ

Фармакологическое действие существующих в настоящее время церебропротекторных средств заключается, как правило, в защите либо модуляции функций сохранившихся в условиях патологических процессов в головном мозге зрелых клеточных элементов нервной ткани [1, 2]. Однако часто используемая концепция медикаментозного воздействия оказывается абсолютно несостоятельной. Несмотря на имеющийся широкий арсенал ноотропных и нейропротекторных препаратов, в ряде случаев не удается не только восстановить морфофункциональное состояние головного мозга, но и предотвратить прогрессию развития патологического процесса в нервной ткани, в том числе после перенесенных гипоксических и ишемических состояний [3–6].

В связи с этим актуальными являются разработки принципиально новых церебропротекторных средств. Выявленная нами ранее специфика внутриклеточной сигнальной трансдукции в различных типах клеток-предшественников послужила основой для разработки нового запатентованного направления таргетной терапии в регенеративной медицине – «Стратегии фармакологической регуляции внутриклеточной сигнальной трансдукции в регенераторно-компетентных клетках» [7]. Данный подход предполагает использование в качестве «мишеней» фармакологического воздействия отдельных внутриклеточных сигнальных молекул, вовлеченных в процесс реализации ростового потенциала родоначальных элементов, либо клеток-регуляторов их функций [7–9].

В НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ РАН, проведен цикл работ по выявлению роли JNK (c-Jun N-terminal kinases, c-Jun N-концевая киназа) в жизнедеятельности родоначальных клеток различных классов. На модели постгипоксической энцефалопатии обнаружено терапевтическое действие ингибитора данной сигнальной молекулы (при его введении после моделирования патологического состояния), связанное с активацией резидентных нейральных стволовых клеток (СК) субвентрикулярной зоны головного мозга экспериментальных животных [10]. В то же время представляется актуальным изучение возможности профилактического использования указанного модификатора активности JNK для предупреждения развития патологии мозга после кислородной недостаточности.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния ингибитора JNK на формирование нарушений психоневрологического статуса экс-

периментальных животных при моделировании постгипоксической энцефалопатии и изучение его действия на функционирование нейральных СК головного мозга в условиях *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на 96 аутбредных самцах мышей, масса тела 18–22 г. Животные 1-й категории (конвенциональные мыши), получены из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ РАН.

Постгипоксическую энцефалопатию моделировали 54 животным путем двукратного (с промежутком перед повторным воздействием в 10 мин) помещения животных в гермокамеру объемом 500 мл. Мышей из гермокамеры извлекали после окончания генерализованных судорог и (или) остановки дыхания (определяемой визуально) в течение 10–15 с [3]. Группу 1 составили 6 интактных животных.

Ингибитор JNK (JNK inhibitor «SP600125», производство InvivoGen, США) вводили 27 мышам однократно за 60 мин перед моделированием патологического состояния подкожно в дозе 15 мг/кг (в объеме 0,2 мл растворителя) (группа 3). Контрольной группе животных ($n = 27$) в аналогичном режиме вводили растворитель в эквивалентном объеме (группа 2).

Психофармакологические эффекты средства оценивали функциональными методами. На 7-, 14-, 21-е сут регистрировали ориентировочно-исследовательское поведение в тесте «открытое поле» (в течение первой и двух последующих минут раздельно), а на 14-, 21-е сут опыта проверяли сохранность условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ), выработанного на 3-и сут после гипоксии [11].

С целью изучения механизмов развития церебропротекторных эффектов на 3-и и 7-е сут после гипоксии определяли содержание нейральных клеток-предшественников в головном мозге, а также прямое действие фармакологического агента (в концентрации 10 мкМ) на интактные нейральные СК. На данном этапе работы было использовано 36 животных, по шесть в каждой группе. Нервную ткань для исследования брали из субвентрикулярной зоны больших полушарий головного мозга. Взятый материал после предварительной подготовки помещали в жидкую культуральную среду специального состава, содержащую 10^5 /мл клеток. Для изучения состояния пула регионарных клеток-предшественников культуру инкубировали

в течение 7 сут в CO₂-инкубаторе при 37 °С, 5%-м CO₂ и 100%-й влажности воздуха. После инкубации подсчитывали число нейральных колониеобразующих единиц (КОЕ-Н) – нейральных СК [1, 12].

Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента (при оценке функциональных расстройств ЦНС) и непараметрического критерия Манна – Уитни (при обработке данных культуральных исследований). Данные представлены в виде средней и ошибки средней $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гипоксическое воздействие оказывало существенное влияние на психоневрологический статус животных. Регистрировалось значительное увеличение числа горизонтальных перемещений в открытом поле, как в первый (1-я мин), так и во второй период наблюдения (2–3-я мин) в начальные сроки исследования (7-е сут опыта) в

основном за счет их горизонтальных перемещений. При этом на 14-е сут опыта имело место падение суммарной и горизонтальной двигательной активности в 1-ю мин наблюдения, сменяющееся возрастанием на 2–3-й мин. На 21-е сут эксперимента характер изменений исследуемых параметров совпадал с таковым на 7-е сут после гипоксии (табл. 1).

Выявленная динамика двигательной активности соответствовала полученным нами ранее результатам о формировании нарушений ориентировочно-исследовательского поведения животных при постгипоксической энцефалопатии, связанной с расстройствами когнитивной, а не локомоторной функции ЦНС [10, 11]. Подтверждением этого являлось резкое снижение уровня воспроизведения УРПИ у мышей, подвергшихся гипоксии (табл. 2). При этом отмечалась спонтанная смертность животных, достигающая к 21-м сут эксперимента 34,2%.

Таблица 1
Table 1

Показатели ориентировочно-исследовательского поведения в открытом поле аутбредных мышей (группа 1); у мышей после гипоксического воздействия (группа 2); у мышей, получавших ингибитор JNK на фоне моделирования постгипоксической энцефалопатии (группа 3), $M \pm m$							
Indicators of orienting-exploratory behavior in the open field of outbred mice (1); in mice after hypoxia (2); in mice receiving the JNK inhibitor before modeling posthypoxic encephalopathy (3), $M \pm m$							
Группа животных Group of animals	Суммарная двигательная активность, усл. ед. Total motor activity, conventional units	Горизонтальная активность, усл. ед. Horizontal activity, conventional units	Вертикальная активность, усл. ед. Vertical activity, conventional units	Норковый рефлекс, усл. ед. "Mink" reflex, conventional units	Обнюхивание отверстий, усл. ед. Sniffing holes, conventional units	Груминг, усл. ед. Grooming, conventional units	Коэффициент асимметрии, % Asymmetry coefficient, %
7-е сут 7 th day							
Первый период исследования, 1-я мин First study period, 1 st minute							
1, $n = 6$	7,7 ± 0,5	4,1 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,8 ± 0,7	1,9 ± 0,5	0	30,6 ± 4,7
2, $n = 27$	12,1 ± 0,9* $p = 0,003$	8,2 ± 0,5* $p < 0,001$ ()	0,2 ± 0,2	1,9 ± 0,5	1,9 ± 0,8	0	44,3 ± 6,1
3, $n = 27$	5,3 ± 1,1# $p < 0,001$	2,8 ± 0,9# $p < 0,001$	0	0	0,7 ± 0,4	0	40,6 ± 4,3
Второй период исследования, 2–3-я мин Second study period, 2–3 min							
1, $n = 6$	20,8 ± 3,3	9,4 ± 2,8	0,6 ± 0,3	3,4 ± 1,1	6,3 ± 1,4	0,8 ± 0,2	35,8 ± 3,6
2, $n = 27$	36,3 ± 3,4* $p = 0,04$	19,6 ± 2,2* $p = 0,045$	1,2 ± 0,7	7,0 ± 1,5	6,1 ± 1,4	1,0 ± 0,2	44,9 ± 4,1
3, $n = 27$	17,4 ± 4,3	7,8 ± 1,3	0,8 ± 0,2	3,8 ± 1,1	2,7 ± 1,6	1,2 ± 0,3	39,9 ± 2,6
14-е сут 14 th day							
Первый период исследования, 1-я мин First study period, 1 st minute							
1, $n = 6$	3,5 ± 0,5	1,2 ± 0,0	0,7 ± 0,7	0,8 ± 0,3	0,7 ± 0,5	0,25 ± 0,12	23,3 ± 1,6
2, $n = 21$	0,7 ± 0,3* $p < 0,001$	0,3 ± 0,1* $p = 0,009$	0	0	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	33,3 ± 2,1* $p = 0,02$

Окончание табл. 1

End of table 1

Группа животных Group of animals	Суммарная двигательная активность, усл. ед. Total motor activity, conventional units	Горизонтальная активность, усл. ед. Horizontal activity, conventional units	Вертикальная активность, усл. ед. Vertical activity, conventional units	Норковый рефлекс, усл. ед. "Mink" reflex, conventional units	Обнюхивание отверстий, усл. ед. Sniffing holes, conventional units	Груминг, усл. ед. Grooming, conventional units	Коэффициент асимметрии, % Asymmetry coefficient, %
3, $n = 22$	$4,7 \pm 1,5\#$ $p = 0,014$	$2,2 \pm 0,3\#$ $p < 0,001$	0	$1,5 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,7$	0	$27,4 \pm 1,8\#$ $p = 0,03$
Второй период исследования, 2–3-я мин Second study period, 2–3 min							
1, $n = 6$	$14,6 \pm 2,2$	$6,7 \pm 1,6$	$1,2 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,9$	$2,6 \pm 0,9$	$0,8 \pm 0,2$	$34,6 \pm 3,0$
2, $n = 21$	$19,1 \pm 3,1$	$11,7 \pm 1,2^*$ $p = 0,04$	$0,7 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,5$	$3,6 \pm 1,0$	$1,0 \pm 0,3$	$60,3 \pm 4,9^*$ $p = 0,011$
3, $n = 22$	$16,5 \pm 2,7$	$8,3 \pm 1,1\#$ $p = 0,043$	$0,3 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,6$	$3,3 \pm 0,4$	$1,15 \pm 0,3$	$38,0 \pm 3,8\#$ $p < 0,001$
21-е сут 21 st day							
Первый период исследования, 1-я мин First study period, 1 st minute							
1, $n = 6$	$6,0 \pm 1,2$	$2,2 \pm 0,7$	0	$1,3 \pm 0,9$	$1,6 \pm 0,6$	0	$31,6 \pm 2,7$
2, $n = 17$	$13,8 \pm 1,6^*$ $p = 0,012$	$9,6 \pm 1,7^*$ $p = 0,019$	0	$1,1 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,7$	0	$66,7 \pm 3,7^*$ $p < 0,001$
3, $n = 19$	$9,5 \pm 1,2$	$4,8 \pm 1,2\#$ $p = 0,025$	$0,2 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,2$	$33,9 \pm 5,3\#$ $p < 0,001$
Второй период исследования, 2–3-я мин Second study period, 2–3 min							
1, $n = 6$	$18,5 \pm 2,2$	$5,5 \pm 1,3$	0	$4,6 \pm 1,0$	$6,8 \pm 1,4$	$1,0 \pm 0,3$	$25,0 \pm 2,3$
2, $n = 17$	$20,1 \pm 1,9$	$10,3 \pm 1,7$	$0,2 \pm 0,2$	$3,4 \pm 1,4$	$4,4 \pm 1,4$	$0,7 \pm 0,2$	$42,7 \pm 3,1^*$ $p = 0,004$
3, $n = 19$	$15,4 \pm 2,6$	$5,8 \pm 1,3\#$ $p = 0,041$	0	$3,9 \pm 1,3$	$2,6 \pm 0,8$	$1,2 \pm 0,3$	$26,6 \pm 3,7\#$ $p = 0,002$

* достоверность различий показателей с аналогичными у интактных мышей (группа 1).

* indicates statistically significant differences in comparison with the indices in intact mice (group 1).

достоверность различий показателей с аналогичными у мышей с постгипоксической энцефалопатией (группа 2).

indicates statistically significant differences in comparison with the indices in mice with posthypoxic encephalopathy (group 2).

Таблица 2

Table 2

Показатели выработки и воспроизведения условного рефлекса пассивного избегания у аутбредных мышей (группа 1); у мышей после гипоксического воздействия (группа 2); у мышей, получавших ингибитор JNK перед моделированием постгипоксической энцефалопатии (группа 3), $M \pm m$							
Indicators of development and reproduction of the reflex of passive avoidance in outbred mice (1); in mice after hypoxia (2); in mice treated with the JNK inhibitor prior to modeling posthypoxic encephalopathy (3), $M \pm m$							
Группа животных Group of animals	14-е сут 14 th day			Группа животных Group of animals	21-е сут 21 st day		
	Латентное время рефлекса, с Latent reflex time, sec	Время нахождения в темном отсеке, с Time spent in the dark compartment, sec	Число животных с сохранившимся рефлексом, % The number of animals with preserved reflex, %		Латентное время рефлекса, с Latent reflex time, sec	Время нахождения в темном отсеке, с Time spent in the dark compartment, sec	Число животных с сохранившимся рефлексом, % The number of animals with preserved reflex, %
1, $n = 6$	$156,9 \pm 23,1$	$7,9 \pm 7,4$	84,2	1, $n = 6$	$90,1 \pm 30,2$	$11,4 \pm 6,0$	43,7
2, $n = 21$	$124,9 \pm 26,6$	$9,3 \pm 4,2$	$33,7^*$ $p = 0,014$	2, $n = 1$	$73,7 \pm 23,9$	$23,9 \pm 6,6$	$15,9^*$ $p = 0,005$

Группа животных Group of animals	14-е сут 14 th day			Группа животных Group of animals	21-е сут 21 st day		
	Латентное время рефлекса, с Latent reflex time, sec	Время нахождения в темном отсеке, с Time spent in the dark compartment, sec	Число животных с сохранившимся рефлексом, % The number of animals with preserved reflex, %		Латентное время рефлекса, с Latent reflex time, sec	Время нахождения в темном отсеке, с Time spent in the dark compartment, sec	Число животных с сохранившимся рефлексом, % The number of animals with preserved reflex, %
3, $n = 22$	161,0 ± 20,1	3,5 ± 3,3	84,2# $p = 0,039$	3, $n = 19$	132,3 ± 28,3	16,4 ± 9,9	54,7# $p = 0,018$

* достоверность различий показателей с аналогичными у интактных мышей (группа 1).

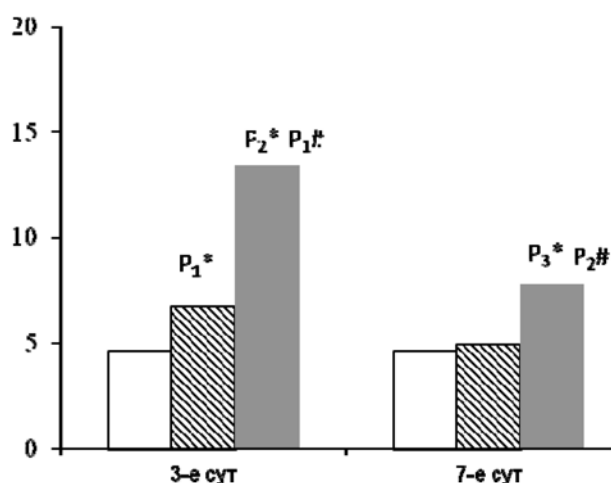
* indicates statistically significant differences in comparison with the indices in intact mice (group 1).

достоверность различий показателей с аналогичными у мышей с постгипоксической энцефалопатией (группа 2).

indicates statistically significant differences in comparison with the indices in mice with posthypoxic encephalopathy (group 2).

Описанные изменения психоневрологического статуса развивались на фоне повышения содержания нейральных клеток-предшественников в субвентрикулярной области головного мозга мышей (до 145,7% от исходного уровня на 3-и сут

опыта) (рис. 1). Таким образом, моделирование гипоксической гипоксии приводило к развитию выраженной энцефалопатии, несмотря на активацию механизмов компенсации «глубокого резерва» – регионарных стволовых клеток ЦНС [3, 5].



Цифровые данные к рис. 1

Digital data to fig. 1

Срок наблюдения Observation period	Группа животных Group of animals	КОЕ-Н, М
3-и сут 3 rd day	Интактные Intact	4,6
	С гипоксией With hypoxia	6,7
	+ ингибитор JNK	13,4
7-е сут 7 th day	Интактные Intact	4,6
	С гипоксией With hypoxia	4,9
	+ ингибитор JNK + JNK inhibitor	7,8

Примечание. Доверительные интервалы при $p \leq 0,05$.

Note. Confidence intervals with $p \leq 0.05$.

Рис. 1. Количество нейральных колониеобразующих единиц в культуре клеток субвентрикулярной зоны головного мозга интактных аутбредных мышей-самцов, $n = 12$ (белые столбики); мышей после моделирования постгипоксической энцефалопатии, $n = 12$ (заштрихованные столбики); мышей, получавших ингибитор JNK перед моделированием постгипоксической энцефалопатии, $n = 12$ (серые столбики). По оси абсцисс – срок исследования, сут; по оси ординат – значения показателя, $\times 10^5$ нуклеаров.

* достоверность различий показателей с аналогичными у интактных мышей при $p_1 = 0,047$; $p_2 < 0,001$; $p_3 = 0,018$.

достоверность различий показателей с аналогичными у мышей с постгипоксической энцефалопатией при $p_1 < 0,001$; $p_2 = 0,03$

Fig. 1. The number of neural colony-forming units in the culture of subventricular brain cells of intact outbred male mice (white bars); mice after modeling posthypoxic encephalopathy (shaded bars); mice that received the JNK inhibitor before modeling posthypoxic encephalopathy (grey bars). X-line – the time of the study (days); Y-line – the indicator values, $\times 10^5$ nuclears.

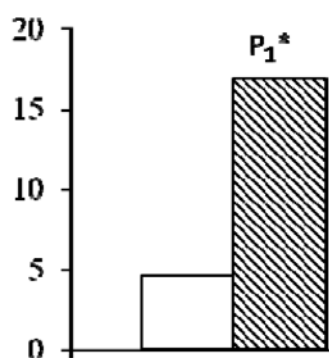
* indicates statistically significant differences in comparison with the indices in intact animals ($p_1 = 0.047$; $p_2 < 0.001$; $p_3 = 0.018$). # indicates statistically significant differences in comparison with the indices in mice with posthypoxic encephalopathy ($p_1 < 0.001$; $p_2 = 0.03$)

Изучение ориентировочно-исследовательского поведения экспериментальных животных, которым перед моделированием патологии вводили ингибитор JNK, выявило практически полную нормализацию показателей психоневрологического статуса.

Имела место отмена появления признаков патологии мозга, регистрируемых у мышей, как в открытом поле, так и при воспроизведении УРПИ (см. табл. 1, 2). При этом ни одно животное в данной группе не погибло. Более того, коррекция функциональных нарушений деятельности ЦНС наблюдалась на фоне значительного увеличения количества резидентных нейральных

прогениторных клеток во все сроки исследования (см. рис. 1). Содержание КОЕ-Н в субвентрикулярной зоне головного мозга составляло 200,0% и 159,2% на 3-и и 7-е сут опыта соответственно от такового у контрольных мышей (не получавших ингибитор JNK).

Кроме того, в ходе изучения механизмов развития психофармакологических эффектов было обнаружено прямое стимулирующее действие фармакологического агента на нейральные стволовые клетки. В условиях *in vitro* отмечалось резкое возрастание выхода КОЕ-Н при внесении в культуральную среду данного модификатора активности протеинкиназы (до 367,4% от фона) (рис. 2).



Цифровые данные к рис. 2
Digital data to fig. 2

Группа Group	КОЕ-Н, М
Интактные Intact	4,6
+ ингибитор JNK + JNK inhibitor	16,9

Рис. 2. Количество нейральных колониеобразующих единиц в культуре интактных клеток субвентрикулярной области головного мозга аутобредных мышей-самцов, $n = 12$ (белые столбики) и при добавлении в среду ингибитора JNK (заштрихованные столбики).

* достоверность различий показателей между группами при $p_1 = 0,013$

Fig. 2. The number of neural colony-forming units in the culture of intact cells of the subventricular region of the brain of outbred male mice, $n = 12$ (white bars) and the addition of JNK inhibitor (shaded bars) to the medium.

* indicates statistically significant differences between the groups ($p_1 = 0,013$)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о выраженном нейропротективном действии ингибитора JNK при тяжелой гипоксической травме. При этом ключевая роль в предупреждении им развития нарушений деятельности ЦНС и их компенсации, очевидно, принадлежит сохранению способности нервной ткани к репарации, связанной с обеспечением адекватного функционирования резидентных нейральных СК головного мозга [5, 6]. В основе реализации данного механизма лежит, по-видимому, не только прямое стимулирующее влияние блокады JNK-опосредованного сигналинга в отношении прогрессии клеточного цикла родоначальных элементов, но и требующее дальнейшего экспериментального подтверждения – торможение процессов их JNK-зависимого апоптоза [13–15].

В целом выявленные закономерности указывают на перспективность применения «Стратегии

таргетной фармакологической регуляции внутриклеточной сигнальной трансдукции в регенераторно-компетентных клетках» в неврологической практике [7] и использования JNK нейральных стволовых клеток в качестве мишени для нейропротекторных средств нового поколения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В., Удуд Е.В., Хричкова Т.Ю., Мирошниченко Л.А., Симанина Е.В., Ставрова Л.А. Методические рекомендации по изучению специфической активности средств для регенеративной медицины. Руководство по проведению доклинических исследований новых лекарственных средств; под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2013: 776–787. [Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V., Udud E.V., Khrichkova T.Y., Miroshnichenko L.A., Simanina E.V., Stavrova L.A. Methodological recommendations for studying the specific activity of agents for regenerative medicine; edited by A.N. Mironova. M.: Grif i K Publ., 2013: 776–787 (in Russ.).]

2. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Ноотропные и нейропротекторные средства. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2007; 70 (4): 44–58. [Voroni-na T.A., Seredenin S.B. Nootropic and neuroprotective agents. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2007; 70 (4): 44–58 (in Russ.)].
3. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н. Гипоксия и система крови. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2006: 142. [Gol'dberg E.D., Dygai A.M., Zyuz'kov G.N. Hypoxia and the blood system. Tomsk: Publishing house of Tomsk State University, 2006: 142 (in Russ.)].
4. Faden A.I., Wu J.F., Stoica B.A., Loane D.J. Progressive inflammation-mediated neuro-degeneration after traumatic brain or spinal cord injury. *British Journal of Pharmacology*. 2016; 173: 681–691. DOI: 10.1111/bph.13179.
5. Binan L., Ajji A., De Crescenzo G., Jolicoeur M. Approaches for neural tissue re-generation. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2014; 10 (1): 44–59. DOI: 10.1007/s12015-013-9474-z.
6. Yuan T.F., Gu S., Shan C., Marchado S., Arias-Carriyn O. Oxidative Stress and Adult Neurogenesis. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2015; 11 (5): 706–709. DOI: 10.1007/s12015-015-9603-y.
7. Зюзьков Г.Н., Жданов В.В., Данилец М.Г., Мирошниченко Л.А., Удут Е.В., Дыгай А.М. Пат. 2599289 RU. Средства, стимулирующие регенерацию тканей. № 2013156908; Заявл. 14.09.2016; Опубл. 10.10.2016. Бюл. № 28. [Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V., Danilec M.G., Miroshnichenko L.A., Udut E.V., Dygai A.M. Patent 2599289 RU, Agents that stimulate the regeneration of tissues. № 2013156908; Stated 14.09.2016; Published 10.10.2016. Bulletin № 28 (in Russ.)].
8. Zyuz'kov G.N., Udut E.V., Miroshnichenko L.A., Polyakova T.Y., Simanina E.V., Stavrova L.A., Chaikovskii A.V., Agafonov V.I., Borodulina E.V., Timofeev M.S., Zyuz'kova Y.N., Danilets M.G., Zhdanov V.V., Udut V.V. Particular role of JAK/STAT3 signaling in functional control of mesenchymal progenitor cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018; 164 (3): 316–319. DOI: 10.1007/s10517-018-3980-6.
9. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Новое о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роли в системной регуляции. *Патогенез*. 2011; 9 (3): 4–14. [Luk'janova L.D., Kirova Ju.I., Sukojan G.V. [New on the signal mechanisms of adaptation to hypoxia and their role in systemic regulation. *Pathogenesis*. 2011; 9 (3): 4–14 (in Russ.)].
10. Zyuz'kov G.N., Suslov N.I., Povet'eva T.N., Nesterova Y.V., Afanas'eva O.G., Udut E.V., Miroshnichenko L.A., Simanina E.V., Polyakova T.Y., Stavrova L.A., Chaikovskii A.V., Kul'pin P.V., Udut V.V., Dygai A.M., Zhdanov V.V. Psychopharmacological effects of JNK inhibitor in post-hypoxic encephalopathy and mechanisms of their development. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017; 163 (1): 18–21. DOI: 10.1007/s10517-017-3727-9.
11. Curzon P., Zhang M., Radek R.J., Fox G.B. The behavioral assessment of sensorimotor processes in the mouse: acoustic startle, sensory gating, locomotor activity, rotarod, and beam walking / in «Methods of behavior analysis in neuroscience». Second Edition, ed. J.J. Buccafusco. Boca Raton–London–New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2009: 145–178. PMID: 21204341.
12. Guo W., Patzlaff N.E., Jobe E.M., Zhao X. Isolation of multipotent neural stem or progenitor cells from both the dentate gyrus and subventricular zone of a single adult mouse. *Nature Protocols*. 2012; 7 (11): 2005–2012. DOI: 10.1038/nprot.2012.123.
13. Zhou L., Yang Z., Lu X., Li X., An X., Chai J., Yang Q., Yan S., Li Y. JNK inhibitor alleviates apoptosis of fetal neural stem cells induced by emulsified isoflurane. *Oncotarget*. 2017; 8 (55): 94009–94019. DOI: 10.18632/oncotarget.21505.
14. Kucinski I., Dinan M., Kolahgar G., Piddini E. Chronic activation of JNK JAK/STAT and oxidative stress signaling causes the loser cell status. *Nat. Commun*. 2017; 8 (1):136. DOI: 10.1038/s41467-017-00145-y.
15. Berganticos C., Corominas M., Serras F. Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signaling. *Development*. 2010; 137 (7): 1169–1179. DOI: 10.1242/dev.045559.

Вклад авторов

Зюзьков Г.Н. – разработка концепции и плана исследований, анализ и интерпретация данных, утверждение статьи для публикации. Удут Е.В. – проведение экспериментальных исследований, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Мирошниченко Л.А. – проведение экспериментальных исследований, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Полякова Т.Ю. – проведение экспериментальных исследований, анализ и интерпретация данных, редактирование и оформление статьи. Симанина Е.В. – проведение экспериментальных исследований. Ставрова Л.А. – проведение

Author contribution

Zyuzkov G.N. – development of the concept and the plan of the research, analysis and interpretation of data, approval of the article for publication. Udut E.V. – conducting experimental research, analysis and interpretation of data, writing a manuscript of the article. Miroshnichenko L.A. – conducting experimental research, analysis and interpretation of data, writing a manuscript of the article. Polyakova T.Yu. – conducting experimental research, analysis and interpretation of data, editing and design of the article. Simanina E.V. – conducting experimental research. Stavrova L.A. – conducting experimental research, statistical processing of the results of

экспериментальных исследований, статистическая обработка результатов работ. Агафонов В.И. – проведение экспериментальных исследований. Жданов В.В. – анализ и интерпретация данных.

work. Agafonov V.I. – conducting experimental research. Zhdanov V.V. – analysis and interpretation of data.

Сведения об авторах

Зюзьков Глеб Николаевич, д-р мед. наук, профессор РАН, зав. лабораторией патофизиологии и экспериментальной терапии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-0384-333X.

Удуд Елена Владимировна, д-р мед. наук, профессор РАН, вед. науч. сотрудник, лаборатория патофизиологии и экспериментальной терапии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-6104-4782.

Мирошниченко Лариса Аркадьевна, д-р мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория патофизиологии и экспериментальной терапии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-3684-5510.

Полякова Татьяна Юрьевна, д-р мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория патофизиологии и экспериментальной терапии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-0971-7844.

Симанина Елена Владиславовна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория патофизиологии и экспериментальной терапии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-1890-6946.

Ставрова Лариса Александровна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория патофизиологии и экспериментальной терапии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-4729-6406.

Агафонов Владимир Иванович, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, лаборатория патофизиологии и экспериментальной терапии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-9800-0487.

Жданов Вадим Вадимович, д-р мед. наук, профессор, директор НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-9516-0204.

(✉) **Зюзьков Глеб Николаевич**, e-mail: zgn@pharmso.ru.

Author information

Zyuz'kov Gleb N., DM, Professor of RAS, Head of the Laboratory of Pathophysiology and Experimental Therapy, GRIPRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0384-333X.

Udud Elena V., DM, Professor of RAS, Leading Researcher, Laboratory of Pathophysiology and Experimental Therapy, GRIPRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-6104-4782.

Miroshnichenko Larisa A., DM, Senior Researcher, Laboratory of Pathophysiology and Experimental Therapy, GRIPRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-3684-5510.

Poljakova Tat'jana Ju., DM, Senior Researcher, Laboratory of Pathophysiology and Experimental Therapy, GRIPRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0971-7844.

Simanina Elena V., PhD, Senior Researcher, Laboratory of pathophysiology and experimental therapy, GRIPRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1890-6946.

Stavrova Larisa A., PhD, Researcher, Laboratory of Pathophysiology and Experimental Therapy, ORCID iD 0000-0002-4729-6406.

Agafonov Vladimir I., DM, Professor, Principal Researcher, Laboratory of Pathophysiology and Experimental Therapy, GRIPRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-9800-0487.

Zhdanov Vadim V., DM, Professor, Director of GRIPRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9516-0204.

(✉) **Zyuz'kov Gleb N.**, e-mail: zgn@pharmso.ru.

Received 13.03.2018

Accepted 14.12.2018

Поступила в редакцию 13.03.2018

Подписана в печать 14.12.2018