

УДК 577.21

СЕМАКС И ЕГО С-КОНЦЕВОЙ ФРАГМЕНТ PGP ВЛИЯЮТ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ НЕЙРОТРОФИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В УСЛОВИЯХ НЕПОЛНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА КРЫС

© 2011 г. В. В. Ставчанский^{1*}, Т. В. Творогова², А. Ю. Боцина², В. И. Скворцова²,
С. А. Лимборская^{1,2}, Н. Ф. Мясоедов¹, Л. В. Дергунова^{1,2}

¹Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва 123182

²Научно-исследовательский институт цереброваскулярной патологии и инсульта
Российского государственного медицинского университета, Москва 117997

Поступила в редакцию 20.12.2010 г.

Принята к печати 11.03.2011 г.

Нейротрофины регулируют основные функции клеток нервной ткани, поэтому анализ экспрессии мРНК нейротрофинов необходим для оценки нейропротекторных свойств новых лекарственных средств, применяемых при ишемии головного мозга. Изучено влияние синтетического пептида семакс и его С-концевого фрагмента Pro-Gly-Pro на экспрессию генов нейротрофинов (*Ngf*, *Bdnf*, *Nt-3*) и их рецепторов (*TrkA*, *TrkB*, *TrkC* и *p75*) в лобных долях, гиппокампе и мозжечке крыс спустя 30 мин, 1, 2, 4, 8, 12 и 24 ч после необратимой окклюзии общих сонных артерий. Относительный уровень экспрессии мРНК нейротрофинов и их рецепторов оценивали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Показано, что ишемия вызывает значительное снижение экспрессии генов в гиппокампе. Семакс и PGP воздействуют на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов преимущественно в лобной коре и гиппокампе ишемизированных животных. В лобной коре крыс под действием семакса уровень мРНК генов рецепторов нейротрофинов снижался, а под действием PGP – увеличивался. Максимальный нейропротекторный эффект пептидов проявился в гиппокампе животных спустя 12 ч после окклюзии сосудов, когда ишемическое повреждение привело к существенному снижению экспрессии генов нейротрофинов и их рецепторов. Применение обоих пептидов в этот момент времени компенсировало вызванные ишемией изменения в экспрессии генов. Полученные результаты приближают нас к пониманию механизма действия семакса, а также дают представление о некоторых особенностях экспрессии мРНК нейротрофинов и их рецепторов в условиях эксперимента.

Ключевые слова: BDNF, NGF, Nt-3, TrkA, TrkB, TrkC, p75, семакс, PGP, количественный метод ОТ-ПЦР, крысы Wistar, неполная глобальная ишемия мозга, экспрессия мРНК.

THE EFFECT OF SEMAX AND ITS C-END PEPTIDE PGP ON EXPRESSION OF THE NEUROTROPHINS AND THEIR RECEPTORS IN THE RAT BRAIN DURING INCOMPLETE GLOBAL ISCHEMIA, by V. V. Stavchansky^{1*}, T. V. Tvorogova², A. Y. Botsina², V. I. Skvortsova², S. A. Limborska^{1,2}, N. F. Myasoedov¹, L. V. Dergunova^{1,2} (¹Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123182 Russia; *e-mail: bacbac@yandex.ru; ²Federal Stroke Institute, Russian State Medical University, Moscow, 117997 Russia). Neurotrophins regulate key function of nervous tissue cells. Analysis of neurotrophins mRNA expression is an appropriate tool to assess therapeutic efficiency of the anti-stroke drugs. We have analyzed the effect of synthetic peptide semax and its C-terminal Pro-Gly-Pro tripeptide upon mRNAs expression of neurotrophins *Ngf*, *Bdnf*, *Nt-3* and their receptors *TrkA*, *TrkB*, *TrkC*, *p75* in rat frontal lobes, hippocampus and cerebellum after bilateral common carotid artery occlusion. The animals were decapitated 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h after the operation. The mRNA expression of neurotrophins and their receptors was assessed by relative quantification using real-time RT-PCR. Our results showed that ischemia causes a significant decrease in gene expression in the hippocampus. Semax and PGP treatment affected the expression of neurotrophins and their receptors predominantly in the frontal cortex and hippocampus of the ischemized animals. In the frontal cortex, Semax treatment resulted in a decrease of mRNA level of neurotrophin receptors, while PGP treatment increased the level of these mRNA. Maximal neuroprotective effect of both peptides has been observed in the hippocampus 12 h after occlusion. A decrease of gene expression of neurotrophins and their receptors caused by the occlusion was overcome by Semax and PGP. These results clarify the semax mechanism of action and present certain features of mRNA's expression of neurotrophins and their receptors in experimental conditions.

Keywords: BDNF, NGF, Nt-3, TrkA, TrkB, TrkC, p75, semax, PGP, real-time qRT-PCR, Wistar rat, incomplete global cerebral ischemia, mRNA expression.

Принятые сокращения: АКТГ – адренкортикотропный гормон; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОТ – обратная транскрипция; GADPH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа.

* Эл. почта: bacbac@yandex.ru

Нейротрофины – семейство белков, контролирующих такие важные процессы, как пролиферация, развитие и выживаемость нейронов, рост аксонов и обрыв дендритов, формирование и функционирование синапсов, а также экспрессию нейротрансмиттеров и белков ионных каналов. У млекопитающих обнаружены четыре нейротрофина: фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), нейротрофины-3 и -4 (NT-3 и -4) [1, 2]. Свои функции нейротрофины реализуют через взаимодействие со своими рецепторами – трансмембранными тирозиновыми киназами (Trk). NGF преимущественно связывается с рецептором TrkA, BDNF и NT-4 – с TrkB, NT-3 – с TrkC. Каждый нейротрофин также способен связываться с низкоаффинным рецептором p75 из семейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNF), что может влиять на функции рецептора Trk или на такие процессы, как апоптоз и ретроградный транспорт нейротрофинов [1, 2].

Нейротрофины играют важную роль в защите нервной ткани от ишемического повреждения [3–5], и поэтому они могут использоваться в качестве нейропротекторов в терапии инсульта. [6]. Однако более эффективным может быть применение лекарственных средств, способных модулировать активность различных компонентов системы нейротрофинов и их рецепторов [6]. В число препаратов, обладающих нейропротекторной активностью, входит отечественный препарат семакс – синтетический пептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro, аналог фрагмента АКТГ (4–7), к С-концу которого присоединен трипептид Pro-Gly-Pro (PGP). Ранее в опытах *in vitro* и *in vivo* было показано, что семакс влияет на содержание (экспрессию) нейротрофинов и их рецепторов, а также их мРНК [7–10]. Трипептид PGP, защищающий молекулу семакса от преждевременной деградации, также обладает регуляторной активностью. Нейропротекторные свойства PGP наблюдали в культурах нервных клеток в условиях окислительного стресса [11] и глутаматной токсичности [12].

Молекулярные механизмы, лежащие в основе нейропротекторного эффекта семакса, активно изучаются. К основным проявлениям нейропротекторного действия семакса относят иммуномодуляцию, торможение воспалительных реакций, синтеза оксида азота и реакций окислительного стресса [13, 14]. Ранее нами было показано, что семакс усиливает пролиферативную активность нейроглии, эндотелия сосудов и прогениторных клеток в субвентрикулярной зоне нейрогенеза [15]. Особый интерес вызывает возможное влияние семакса на систему нейротрофинов и их рецепторов, так как было показано положительное влияние семакса на выживаемость нервных клеток [16].

На данный момент точно неизвестно как семакс действует на экспрессию нейротрофинов и их рецепторов в различных участках головного мозга в условиях глобального дефицита глюкозы и кислорода. Особенно важно знать динамику таких изменений, прежде всего, в первые часы ишемии (так называемый период терапевтического окна) и далее до 24 ч. Эта информация может быть использована для анализа фармакологического действия семакса и выбора правильной стратегии лечения.

В связи со сказанным мы решили оценить изменения в экспрессии мРНК нейротрофинов и их рецепторов, вызванные применением препарата семакс и пептида PGP, в головном мозге крыс в зависимости от продолжительности неполной глобальной ишемии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Модель неполной глобальной ишемии. Исследования выполнены на крысах-самцах ($n = 84$) линии Wistar двухмесячного возраста массой около 200 г, содержащихся в условиях естественного освещения и свободного доступа к еде и воде. Необратимую двустороннюю окклюзию общих сонных артерий (модель “неполная глобальная ишемия мозга”) проводили стандартно: под эфирным наркозом через срединный разрез мягких тканей передней поверхности шеи выделяли обе общие сонные артерии и одновременно перевязывали их шелковой лигатурой. Операция занимала не более 10 мин. Через 15 мин после лигирования крысам внутрибрюшинно вводили один из препаратов: семакс, С-концевой фрагмент семакса Pro-Gly-Pro (PGP) или физиологический раствор. В качестве контроля использовали ложнопериоперированных крыс. Таких животных под наркозом подвергали аналогичной операции, но, выделив общие сонные артерии, разрезанные ткани ушивали без лигирования сосудов. В качестве препарата им вводили физиологический раствор. Таким образом, все крысы были разделены на четыре группы: 1 – ложнопериоперированные животные с введенным физраствором; 2 – ишемизированные животные с введенным физраствором; 3 – ишемизированные животные, получавшие семакс; 4 – ишемизированные животные, получавшие PGP. Каждую группу, в свою очередь, разделили на временные подгруппы: животных выводили из эксперимента через 30 мин, 1, 2, 4, 8, 12 и 24 ч после окклюзии. В каждой подгруппе было не менее трех животных. Дополнительно препараты вводили животным, не выведенным из эксперимента, через 1, 4 и 8 ч после наложения лигатур. Семакс применяли из расчета 10 мкг/100 г веса крысы; PGP – 3.75 мкг/100 г. Крыс декапитировали под действием эфирного наркоза. Гиппокамп, лобные доли коры и мозжечок помещали в жидкий азот, а затем хранили при -70°C .

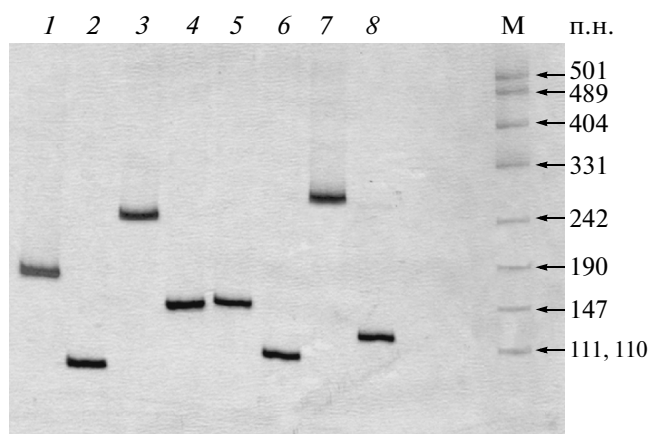
Таблица 1. Праймеры, использованные для анализа экспрессии генов

Праймер	Нуклеотидная последовательность	GenBank acc. no.	Позиция нуклеотидов	Длина ПЦР-продукта, п.н.
<i>Bdnf</i> (F)	5'-AGGCACTGGAACCTCGCAATG-3'	NM_012513	859–879	99
<i>Bdnf</i> (R)	5'-TGTCTATCCTTATGAACCGCC-3'		937–957	
<i>TrkB</i> (F)	5'-CACCAACCATCACATTTCTC-3'	NM_012731	1520–1540	266
<i>TrkB</i> (R)	5'-ATCTGTCTCTCGTCCTTCCC-3'		1765–1785	
<i>Nt-3</i> (F)	5'-GGAAGATTATGTGGGCAACC-3'	NM_031073	681–701	158
<i>Nt-3</i> (R)	5'-GTGTCCCCGAATGTCAATGG-3'		818–838	
<i>TrkC</i> (F)	5'-CATTGAGTTTGTGGTGCCTG-3'	NM_019248	1011–1031	154
<i>TrkC</i> (R)	5'-TAGTGGGTGGGCTTGTGAA-3'		1144–1164	
<i>Ngf</i> (F)	5'-AGATAGCAATGTCCCAGAGG-3'	XM_001067130	1266–1276	112
<i>Ngf</i> (R)	5'-ATTGGTTCAGCAGGGGCACT-3'		1357–1377	
<i>TrkA</i> (F)	5'-GTCTCCTTCCCAGCCAGTGT-3'	NM_021589	911–932	286
<i>TrkA</i> (R)	5'-GGGTTGTCCATAAAGGCAGC-3'		1175–1196	
<i>p75</i> (F)	5'-GCACGACCAGCAGACCCATA-3'	NM_012610	1058–1078	131
<i>p75</i> (R)	5'-TCGCCAGGTATCCCCGTTGA-3'		1168–1188	
<i>Gapdh</i> (F)	5'-TGCCATCAACGACCCCTTCA-3'	NM_017008	936–955	188
<i>Gapdh</i> (R)	5'-ACTCAGCACCAGCATCACCC-3'		1104–1123	

Выделение РНК и синтез кДНК. Суммарную РНК из тканей головного мозга крыс выделяли с помощью гуанидинтиоцианатного метода [16]. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой I (МБИ “Fermentas”, Литва) в присутствии ингибитора РНКаз согласно рекомендациям производителя, депротеинизацию проводили смесью фенола и хлороформа (1 : 1). Количество РНК определяли спектрофотометрически [18]. Целостность препаратов РНК подтверждена электрофорезом в агарозном геле в денатурирующих условиях: во

всех образцах присутствуют отчетливые полосы 28S и 18S с соотношением интенсивностей, близким к 2 : 1 соответственно. кДНК синтезировали в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 5 мкг РНК, с использованием набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis (МБИ “Fermentas”, Литва) в соответствии с рекомендациями производителя.

ОТ-ПЦР в реальном времени. Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 0.02 мкл пробы ревертазной реакции, по 5 пмоль прямого и обратного праймеров, 2.5 × реакционной смеси (“Синтол”, Россия), включающей буфер для ПЦР, Taq-ДНК-полимеразу, dNTP и интеркалирующий краситель SYBR Green I. Праймеры, специфичные к изучаемым генам, подобраны с помощью пакета программ OLIGO Primer Analysis Software 6.31 и синтезированы фирмой “Синтол” (Россия) (табл. 1). Специфичность праймеров оценивали при помощи электрофореза ПЦР-продуктов (рисунок). Длина амплифицированных продуктов во всех случаях соответствовала ожидаемой. Продукты другой длины не обнаружены. кДНК амплифицировали в присутствии указанных праймеров на приборе Mx3000P (“Stratagene”, США) в следующем режиме: сегмент 1 (денатурация) – 95°C, 10 мин; сегмент 2 (амплификация с измерением флуоресценции) – 95°C, 15 с; 64°C, 30 с; 72°C, 30 с (40 циклов); сегмент 3 (построение кривой плавления продуктов амплификации). Каждый образец кДНК анализировали трижды. Пороговой цикл (Ct) и кривая плавления образцов получены с помощью программного обеспечения “Mx 3000p v2.00”



Электрофореграмма продуктов амплификации кДНК лобной коры крысы. Полиакриламидный гель, окрашивание нитратом серебра. 1 – *Gapdh*, 2 – *Bdnf*, 3 – *TrkB*, 4 – *TrkC*, 5 – *Ni-3*, 6 – *Ngf*, 7 – *TrkA*, 8 – *p75*, М – Маркер длин фрагментов pUC19.

Таблица 2. Изменение содержания мРНК генов нейротрофинов и их рецепторов в головном мозге крыс при неполной глобальной ишемии

Ген	Продолжительность ишемии, ч						
	0.5	1	2	4	8	12	24
Мозжечок							
<i>Bdnf</i>					0.49 ± 0.1***	0.47 ± 0.06 ***	
<i>Nt-3</i>			0.45 ± 0.1**				
<i>TrkC</i>			2.07 ± 0.3*				
<i>p75</i>			3.91 ± 1.06***				0.6 ± 0.07**
Лобная кора							
<i>Nt-3</i>							0.47 ± 0.13*
<i>TrkA</i>		0.72 ± 0.1*			1.46 ± 0.23*	1.62 ± 0.2**	
<i>TrkB</i>					2.7 ± 0.59***		
<i>TrkC</i>		1.71 ± 0.33*				0.76 ± 0.09**	
<i>p75</i>			0.55 ± 0.07***			0.38 ± 0.12**	
Гиппокамп							
<i>Ngf</i>				1.6 ± 0.15*	0.47 ± 0.1*	0.55 ± 0.07***	
<i>Bdnf</i>		3.26 ± 0.43*			0.44 ± 0.08 *	0.26 ± 0.04***	
<i>Nt-3</i>	0.62 ± 0.1*		0.49 ± 0.05***		0.56 ± 0.11***	0.39 ± 0.06***	
<i>TrkA</i>		0.55 ± 0.06***	0.71 ± 0.08***	2.39 ± 0.22***	0.31 ± 0.05***	0.36 ± 0.06***	2.25 ± 0.28***
<i>TrkB</i>	0.45 ± 0.03***						
<i>TrkC</i>	0.62 ± 0.05***	0.73 ± 0.07***		1.7 ± 0.15***	0.55 ± 0.08***	0.51 ± 0.07***	1.4 ± 0.1***
<i>p75</i>	0.51 ± 0.05***					0.59 ± 0.1***	

Здесь и в табл. 3 и 4:

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$.

Примечание. Приведено соотношение относительного уровня транскриптов указанного гена в структурах головного мозга животных с ишемией и в аналогичных структурах мозга ложнопериорированных крыс. Жирным выделены значения, отражающие положительный характер изменения экспрессии. Представлены только статистически значимые величины.

В качестве внутреннего контроля использовали ген *Gapdh*. Этот ген часто используется как референсный, поскольку он характеризуется достаточно стабильной экспрессией в условиях экспериментальной ишемии [19, 20].

Анализ данных и статистика. Результаты обрабатывали при помощи программы REST. Преимущество этой программы состоит в том, что она позволяет оценивать относительный уровень экспрессии гена-мишени с использованием величины эффективности ПЦР для каждого гена и ткани [21, 22]. Для вычисления относительного уровня экспрессии (R) гена использовали формулу: $R = (E_{\text{target}})^{\Delta Ct(\text{target})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta Ct(\text{ref})}$, где E_{target} — эффективность ПЦР гена-мишени, E_{ref} — эффективность ПЦР референсного гена, $\Delta Ct(\text{target})$ — разница между средними значениями Ct исследуемого гена в контрольной и опытной группе, $\Delta Ct(\text{ref})$ — разница между средними значениями Ct референсного гена в контрольной и опытной группе.

Значимость различий в уровнях экспрессии в контрольных и опытных группах в этой программе оценивается при помощи критерия рандомизации. Результаты представлены в табл. 2–4 в виде $R \pm SE$; отображены только статистически значимые величины ($p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние неполной глобальной ишемии на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в различных отделах головного мозга крыс

Экспрессию генов нейротрофинов (*Bdnf*, *Nt-3*, *Ngf*) и их рецепторов (*TrkA*, *TrkB*, *TrkC* и *p75*) анализировали в лобной коре, мозжечке и гиппокампе крыс спустя 30 мин, 1, 2, 4, 8, 12 и 24 ч после окклюзии общих сонных артерий. В табл. 2 представлены результаты, свидетельствующие том, что экспрессия генов нейротрофинов и их рецеп-

Таблица 3. Влияние семакса на содержание мРНК генов нейротрофинов и их рецепторов в мозге крыс при неполной глобальной ишемии

Ген	Продолжительность ишемии, ч						
	0.5	1	2	4	8	12	24
Мозжечок							
<i>Bdnf</i>						1.87 ± 0.3***	
<i>TrkA</i>					0.6 ± 0.1***		
<i>p75</i>			0.56 ± 0.1**		2.39 ± 0.64**		
Лобная кора							
<i>Nt-3</i>		0.55 ± 0.1*					1.71 ± 0.29*
<i>TrkA</i>						0.59 ± 0.11***	
<i>TrkB</i>	0.48 ± 0.11*				0.48 ± 0.1*		0.61 ± 0.11*
<i>TrkC</i>	0.43 ± 0.06*						
<i>p75</i>					0.3 ± 0.09*		0.42 ± 0.16*
Гиппокамп							
<i>Ngf</i>						1.7 ± 0.19***	2.81 ± 0.26*
<i>Bdnf</i>		2.43 ± 0.3***	2.03 ± 0.14*	1.3 ± 0.13***		3.63 ± 0.4*	
<i>Nt-3</i>		1.87 ± 0.20*				3.07 ± 0.43***	
<i>TrkA</i>			0.63 ± 0.09***			3.76 ± 0.5***	0.39 ± 0.02***
<i>TrkB</i>	2.41 ± 0.2***			0.7 ± 0.07*			
<i>TrkC</i>					1.93 ± 0.27*	1.72 ± 0.21*	
<i>p75</i>			3.03 ± 0.24*	2.97 ± 0.83***		1.8 ± 0.19***	

Примечание. Приведено соотношение относительного уровня транскриптов указанного гена в структурах мозга животных с ишемией, получавших семакс, и в аналогичных структурах мозга крыс с ишемией, получавших физиологический раствор. Жирным выделены значения, отражающие положительный характер изменения экспрессии. Представлены только статистически значимые величины.

торов в отделах головного мозга ишемизированных крыс изменяется в разное время после операции и отличается от экспрессии у ложнооперированных животных. При ишемии в мозжечке изменялась экспрессия небольшого числа генов. Экспрессия гена *Nt-3* снижалась через 2 ч, а гена *Bdnf* через 8 и 12 ч после операции. Наряду с этим отмечалось повышение уровня мРНК *TrkC* (2 ч), увеличение экспрессии гена *p75* через 2 ч, а затем снижение через 24 ч. Не найдено статистически значимых изменений в экспрессии генов *Ngf*, *TrkA*, *TrkB* в мозжечке, поэтому в табл. 2 эти гены не представлены. В лобной коре выявлены изменения экспрессии большего числа генов, в основном, генов рецепторов нейротрофинов. При этом отмечалось как снижение, так и повышение активности некоторых генов. Единственное изменение экспрессии генов нейротрофинов — это снижение уровня мРНК *Nt-3* (0.47 от уровня у ложнооперированных животных) через 24 ч после операции. Наиболее заметно ишемия повлияла на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в гиппокампе (табл. 2). Снижение относительного содержания мРНК *Nt-3*, *TrkB*, *TrkC*, *p75* и *TrkA* наблюдали уже в течение первого

часа после окклюзии, а через 8 и 12 ч значительно снизилась экспрессия большинства анализируемых генов. При этом через 1 ч после окклюзии в ответ на ишемию в гиппокампе крыс существенно (более чем в 3 раза) вырос уровень мРНК *Bdnf*. Описанное ранее увеличение экспрессии гена *Bdnf* в ответ на ишемию [23, 24] связывали с репаративно-адаптационными процессами, проходящими в поврежденной ткани головного мозга. В использованных нами условиях в ткани гиппокампа сохранялась возможность повышения экспрессии и других генов (*Ngf*, *TrkA* и *TrkC* спустя 4 ч, *TrkA* и *TrkC* спустя 24 ч после окклюзии). Снижение экспрессии одних генов и увеличение других обусловлено, вероятно, сочетанием повреждающих и адаптационных процессов, происходящих в мозге после повреждения. Полученные результаты свидетельствуют о дифференциальном воздействии ишемии на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в разных отделах головного мозга. Минимальные изменения, выявленные в мозжечке, по-видимому, обусловлены тем, что в этом участке мозга кровоснабжение осуществляется за счет базилярных артерий [25]. Тем не менее, по данным проведенного нами ра-

Таблица 4. Влияние PGP на содержание мРНК генов нейротрофинов и их рецепторов в мозге крыс при неполной глобальной ишемии

Ген	Продолжительность ишемии, ч						
	0.5	1	2	4	8	12	24
Мозжечок							
<i>TrkB</i>		1.63 ± 0.28*					
Лобная кора							
<i>Ngf</i>							0,46 ± 0.1***
<i>Bdnf</i>			1.56 ± 0.24*		0.47 ± 0.07*		
<i>Nt-3</i>	0.69 ± 0.1*	0.56 ± 0.07*					2,55 ± 0.73**
<i>TrkA</i>	0.58 ± 0.1*	1.44 ± 0.22*					
<i>TrkB</i>	3.16 ± 0.61***	2.43 ± 0.32***					
<i>TrkC</i>			1.39 ± 0.17*				1,98 ± 0.61*
<i>p75</i>	1.93 ± 0.35**						
Гиппокамп							
<i>Ngf</i>				0.69 ± 0.04***		1.35 ± 0.19*	
<i>Bdnf</i>						1.44 ± 0.19*	
<i>Nt-3</i>				0.38 ± 0.05**	1.82 ± 0.37	2.15 ± 0.32*	2.76 ± 0.14*
<i>TrkA</i>				0.46 ± 0.06 **		1.93 ± 0.27*	0.63 ± 0.03***
<i>TrkB</i>	1.93 ± 0.26*				0.79 ± 0.11 ***	1.62 ± 0.23*	
<i>TrkC</i>					0.65 ± 0.09 *	1.48 ± 0.26*	
<i>p75</i>			2.57 ± 0.27*	2.13 ± 0.17*			

Примечание. Приведено соотношение относительного уровня транскриптов указанного гена в структурах мозга животных с ишемией, получавших PGP, и в аналогичных структурах мозга крыс с ишемией, получавших физиологический раствор. Жирным выделены значения, отражающие положительный характер изменения экспрессии. Представлены только статистически значимые величины.

нее гистопатологического исследования через 24 ч после перевязки сонных артерий в мозжечке появлялись отдельные измененные гиперхромные нейроны [15]. Повреждение значительной части нейронов обнаружено в лобно-теменной области коры и в подкорковых структурах. В использованной нами модели наиболее выраженные изменения экспрессии генов наблюдались в гиппокампе. Полученные данные согласуются с мнением о том, что в условиях глобальной ишемии именно эта область мозга в наибольшей степени страдает от недостатка кислорода и глюкозы [26].

Влияние семакса на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в головном мозге крыс, подвергнутых действию неполной глобальной ишемии

В табл. 3 представлены результаты анализа воздействия семакса на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в разных отделах головного мозга крыс, подвергнутых ишемии (приведены только статистически значимые результаты). В качестве контроля использовали животных, подвергнутых ишемии, но получавших вместо исследу-

емого препарата физиологический раствор. В условиях эксперимента под воздействием семакса относительное содержание мРНК *TrkA* в мозжечке снижалось через 8 ч, а мРНК *Bdnf* – увеличивалось через 12 ч после окклюзии. Кроме того, наблюдалось разнонаправленное действие этого пептида на экспрессию гена *p75*. Через 2 ч она снижалась, а через 8 ч превышала показатели в контроле (табл. 3). Таким образом, в мозжечке крыс семакс влиял на экспрессию небольшого числа генов.

Введение семакса не влияло на уровень мРНК *Ngf* и *Bdnf* в лобной коре крыс, подвергнутых ишемии, но приводило к снижению экспрессии гена *Nt-3* почти в 2 раза (0.55 от уровня у контрольных животных) через 1 ч и увеличению в 1.71 раза через 24 ч после окклюзии. Большая часть изменений в лобной коре животных, получавших семакс, выражалась в уровне мРНК рецепторов нейротрофинов, более низком, чем у ишемизированных животных, получавших физиологический раствор (табл. 3). Можно отметить, что в двух случаях (ген *TrkB* через 8 ч и *TrkA* через 12 ч после операции) семакс снизил влияние ишемии на активацию экспрессии этих генов в указанные промежутки времени (табл. 2). По-

видимому, снижение экспрессии генов рецепторов нейротрофинов в лобной коре обусловлено тем, что семакс не стимулирует экспрессию генов нейротрофинов в этом отделе мозга.

При введении семакса наиболее заметные изменения в экспрессии генов нейротрофинов и их рецепторов наблюдались в гиппокампе, и в подавляющем большинстве случаев это было усиление экспрессии. Как свидетельствуют наши результаты, наиболее существенным было повышение экспрессии гена *Bdnf*. Можно отметить 2–3-кратное увеличение активности этого гена, а также продолжительность действия семакса (табл. 3). Имеются данные, что нейротрофины, прежде всего BDNF, положительно влияют на состояние нервной ткани при ишемии. Уровень белка BDNF тесно коррелирует с устойчивостью к ишемическому повреждению различных областей головного мозга [27–30]. Таким образом, активация экспрессии мРНК *Bdnf* под воздействием семакса может обеспечивать защиту и выживание клеток гиппокампа при ишемии.

Введение семакса животным в условиях ишемии приводило к заметному увеличению экспрессии генов и других нейротрофинов в гиппокампе. Так, экспрессия гена *Nt-3* усиливалась в 1.87 раза через 1 ч, в 3 раза через 12 ч, а гена *Ngf* – в 1.7 раза через 12 ч и в 2.8 раза через 24 ч после наложения лигатур (табл. 3). Следует отметить, что наиболее заметно экспрессия генов *Bdnf* и *Nt-3* под действием семакса активировалась спустя 12 ч после окклюзии сосудов, когда в гиппокампе контрольных животных, подвергнутых ишемии, наблюдалось максимальное подавление экспрессии этих генов (табл. 2).

Уровень экспрессии генов рецепторов нейротрофинов в гиппокампе ишемизированных крыс, получавших семакс, изменялся не так однозначно, как генов нейротрофинов. Экспрессию генов *TrkB* и *TrkA* в разное время после окклюзии сосудов семакс как активировал, так и подавлял, тогда как генов *TrkC* и *p75* – только активировал. Можно отметить увеличение уровня мРНК *TrkC* (в 1.93 и 1.72 раза через 8 и 12 ч после окклюзии сосудов соответственно) и мРНК *TrkA* (в 3.76 раза через 8 ч после операции) в гиппокампе под действием семакса в период максимального подавления активности этих генов у контрольных животных с ишемией. При этом в ряде случаев повышение активности генов рецепторов предшествовало увеличению экспрессии генов соответствующих нейротрофинов. Так, спустя 30 мин после операции возрастала экспрессия гена *TrkB*, за ним гена *Bdnf*, а вслед за увеличением экспрессии генов *TrkA* и *TrkC* (8 ч после окклюзии) наблюдалась стимуляция соответствующих им генов *Ngf* и *Nt-3* (12 ч после окклюзии) (табл. 3). Взаимодействуя с высокоаффинными рецепторами Trk, нейротрофи-

ны способствуют выживанию клеток, поэтому коэкспрессия нейротрофинов и их рецепторов рассматривается как механизм нейропротекции при ишемии [31, 32]. Возможно, что семакс, индуцируя экспрессию генов рецепторов нейротрофинов, подавленную при ишемическом повреждении, способствует выживанию нейронов.

Под действием семакса в условиях ишемии в гиппокампе активировалась экспрессия гена *p75*: ее уровень возрастал практически в 3 раза через 2 и 4 ч и в 1.8 раза через 12 ч после наложения лигатур (табл. 3). Показано, что функционирование этого рецептора во многом зависит от гуморальных факторов и клеточного окружения. Так, его активация под действием предшественников нейротрофинов может вызывать апоптоз, тогда как взаимодействие с рецепторами Trk в присутствии нейротрофинов, наоборот, обеспечивает выживание нервной клетки [1, 2]. Следовательно, в зависимости от условий и снижение, и увеличение экспрессии мРНК этого рецептора может быть как благоприятным, так и негативным для процессов восстановления нервной ткани от последствий ишемии.

Суммируя вышесказанное, можно сказать, что в гиппокампе крыс в условиях ишемии семакс способствовал активации синтеза мРНК подавляющего большинства анализируемых генов. Проведенный ранее поиск мест связывания семакса на цитоплазматической мембране показал, что этот препарат специфически взаимодействует с мембранами мозжечка и гиппокампа, тогда как в базальных ганглиях и коре головного мозга мест специфического связывания не обнаружено [33]. Можно предположить, что активация экспрессии генов нейротрофинов и их рецепторов в гиппокампе крыс под действием семакса обусловлена специфическим связыванием семакса с рецепторами, локализованными на мембранах клеток гиппокампа. Однако мы не обнаружили значительной активации экспрессии генов нейротрофинов и их рецепторов в мозжечке, несмотря на наличие мест специфического связывания семакса. Кроме того, в условиях фокальной ишемии мозга крыс, вызванной окклюзией средней мозговой артерии, семакс стимулировал экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в участке лобной коры, включающем очаг ишемии [34]. По-видимому, семакс активирует экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов преимущественно в том участке мозга, где она наиболее подавлена. В использованной нами модели наибольшее повышение экспрессии генов под действием семакса обнаружено именно в гиппокампе, где ишемическое повреждение приводит к подавлению экспрессии изучаемых генов.

Опубликованы многочисленные сведения о влиянии семакса на экспрессию генов нейротро-

Таблица 5. Сравнительный анализ эффектов воздействия семакса и PGP на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в отделах мозга крыс в условиях ишемического повреждения

		Мозжечок							Лобная кора							Гиппокамп						
		0.5 ч	1 ч	2 ч	4 ч	8 ч	12 ч	24 ч	0.5 ч	1 ч	2 ч	4 ч	8 ч	12 ч	24 ч	0.5 ч	1 ч	2 ч	4 ч	8 ч	12 ч	24 ч
Ngf	семакс																				↑	↑
	PGP														↓				↓		↑	
Bdnf	семакс						↑										↑	↑	↑		↑	
	PGP										↑		↓								↑	
Nt-3	семакс									↓					↑		↑				↑	
	PGP								↓	↓					↑				↓	↑	↑	↑
TrkA	семакс					↓								↓				↓		↑		↓
	PGP								↓	↑									↓		↑	↓
TrkB	семакс								↓				↓		↓	↑			↓			
	PGP		↑						↑	↑						↑				↓	↑	
TrkC	семакс								↓											↑	↑	
	PGP										↑				↑					↓	↑	
p75	семакс			↓		↑							↓		↓			↑	↑		↑	
	PGP								↑									↑	↑			

Примечание. Стрелками указан характер изменения уровня транскриптов указанного гена в структурах мозга животных с ишемией, получавших пептид, по сравнению с уровнем в аналогичных структурах мозга крыс с ишемией, получавших физиологический раствор (статистически значимые величины, соответствующие стрелкам, представлены в табл. 3 и 4).

финов и их рецепторов. Индукцию экспрессии мРНК *Bdnf* и *Ngf* в присутствии семакса наблюдали в культуре клеток глии в условиях окислительного стресса [7]. В опытах *in vivo* семакс увеличивал содержание белков BDNF и TrkB в гиппокампе здоровых крыс, а также мРНК *Bdnf*, *TrkB*, *Ngf* [8]. В условиях фокальной ишемии и применения семакса повышенный уровень мРНК *Bdnf*, *Nt-3*, *Ngf*, а также *TrkC* и *TrkA* фиксировался в течение первых суток в участке лобной коры, включающем очаг ишемического повреждения [34]. В нашей работе семакс также положительно влиял на динамику синтеза мРНК нейротрофинов и их рецепторов в гиппокампе в течение первых суток глобальной ишемии, что создает предпосылки для синтеза кодируемых ими белков на необходимом уровне в условиях гипоксии и обеспечения нейропротекции. Ранее показали [35], что нейропротекторное действие семакса при неполной глобальной ишемии проявляется снижением выраженности неврологического дефицита и повышением выживаемости экспериментальных животных.

В последнее десятилетие большой интерес вызывает еще одна важная сфера функционирования нейротрофинов и их рецепторов – участие в процессах ангиогенеза, неоваскуляризации и ремоделирования сосудистой сети в постишемическом периоде. Эффекты этих регуляторных моле-

кул и их рецепторов не ограничиваются нервными клетками, а включают взаимодействия клеток сосудов, глии и иммунной системы [36–39]. В ряде работ уже обнаружено, что семакс влияет на экспрессию генов, вовлеченных в формирование сосудов, и на пролиферацию клеток, участвующих в этом процессе [15, 40].

Влияние PGP на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в головном мозге крыс, подвергнутых ишемии

Результаты анализа воздействия PGP на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в разных отделах головного мозга крыс, подвергнутых экспериментальной ишемии, представлены в табл. 4 (данные о генах, изменение экспрессии которых не было статистически значимым, не приведены). В мозжечке опытных и контрольных животных единственное отличие состояло в увеличении экспрессии гена *TrkB* под действием пептида через 1 ч после окклюзии. В лобной коре и гиппокампе при введении как PGP, так и семакса изменялась экспрессия большого числа генов, однако эффект этих пептидов совпал лишь частично (табл. 5). Под действием обоих пептидов в лобной коре крыс экспрессия гена *Nt-3* снижалась через 1 ч и увеличивалась через 1 сут после операции. В гиппокампе крыс через 30 мин после окклюзии общих сонных артерий препараты акти-

вировали экспрессию гена *TrkB*, а через 2 и 4 ч — гена *p75*. В отличие от семакса под действием PGP в лобной коре крыс изменения проявились преимущественно в первые часы после операции и выразились в активации ряда генов (*Bdnf*, *TrkB*, *TrkC*, *p75*). В гиппокампе основные изменения экспрессии генов нейротрофинов и их рецепторов, вызванные PGP, выявлены преимущественно через 4 ч после окклюзии. Вслед за снижением экспрессии ряда генов (*Ngf*, *Nt-3*, *TrkA* через 4 ч и *TrkB*, *TrkC* через 8 ч), спустя 12 ч после операции под действием PGP, усиливалась экспрессия всех анализируемых генов. Важно отметить, что в гиппокампе крыс, подвергнутых ишемии, нейропротекторное действие PGP, включающее активацию генов нейротрофинов и их рецепторов, проявилось преимущественно через 12 ч после окклюзии общих сонных артерий.

Можно заключить, что наиболее значительно экспрессия генов нейротрофинов и их рецепторов при изучаемых воздействиях изменяется в гиппокампе. В условиях использованной нами модели экспериментальной ишемии этот участок головного мозга в наибольшей степени страдает от воздействия гипоксии и недостатка глюкозы. Выраженный нейропротекторный эффект препарата семакс и его C-концевого пептида PGP проявляется в гиппокампе животных спустя 12 ч после окклюзии сосудов, когда ишемическое повреждение существенно снижает экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов. PGP, как продукт деградации семакса, по-видимому, вносит вклад в нейропротекторный эффект препарата. Однако различие эффектов семакса и PGP на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в мозге крыс в условиях ишемии свидетельствует о различиях в механизмах действия этих пептидов.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (08-04-01279, 11-04-00843), Программы поддержки ведущих научных школ, Программ Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология”, “Фундаментальные науки — медицине”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Huang E.J., Reichardt L.F. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 677–736.
- Huang E.J., Reichardt L.F. 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 609–642.
- Kim M.W., Bang M.S., Han T.R., Ko Y.J., Yoon B.W., Kim J.H., Kang L.M., Lee K.M., Kim M.H. 2005. Exercise increased BDNF and *trkB* in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain Res.* **1052**, 16–21.
- Wu D. 2005. Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins. *NeuroRx.* **2**, 120–128.
- Zhang Z.H., Wang R.Z., Wang R.Z., Li G.L., Wei J.J., Li Z.J., Feng M., Kang J., Du W.C., Ma W.B., Li Y.N., Yang Y., Kong Y.G. 2008. Transplantation of neural stem cells modified by human neurotrophin-3 promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci. Lett.* **444**, 227–230.
- Гусев Е.И., Скворцова В.И. 2001. *Ишемия головного мозга*. М.: Медицина.
- Shadrina M.I., Dolotov O.V., Grivennikov I.A., Slominsky P.A., Andreeva L.A., Inozemtseva L.S., Limborska S.A., Myasoedov N.F. 2001. Rapid induction of neurotrophin mRNAs in rat glial cell cultures by Semax, an adrenocorticotrophic hormone analog. *Neurosci. Lett.* **308**, 115–118.
- Dolotov O.V., Karpenko E.A., Inozemtseva L.S., Seredenina T.S., Levitskaya N.G., Rozyczka J., Dubynina E.V., Novosadova E.V., Andreeva L.A., Alfeeva L.Y., Kamensky A.A., Grivennikov I.A., Myasoedov N.F., Engele J. 2006. Semax, an analog of ACTH(4–10) with cognitive effects, regulates BDNF and *trkB* expression in the rat hippocampus. *Brain Res.* **1117**, 54–60.
- Agapova T.Y., Agniullin Y.V., Shadrina M.I., Shram S.I., Slominsky P.A., Lymborska S.A., Myasoedov N.F. 2007. Neurotrophin gene expression in rat brain under the action of Semax, an analogue of ACTH 4–10. *Neurosci. Lett.* **417**, 201–205.
- Shadrina M., Kolomin T., Agapova T., Agniullin Y., Shram S., Slominsky P., Lymborska S., Myasoedov N. 2010. Comparison of the temporary dynamics of NGF and BDNF gene expression in rat hippocampus, frontal cortex, and retina under Semax action. *J. Mol. Neurosci.* **41**, 30–35.
- Мартынова К.В., Андреева Л.А., Климова П.А., Кириллова Ю.Г., Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Шрам С.И., Швец В.И., Мясоедов Н.Ф. 2009. Структурно-функциональное исследование глицин- и пролинсодержащих пептидов (глипролинов) как потенциальных нейропротекторов. *Биоорганическая химия.* **35**, 165–171.
- Сторожевых Т.П., Тухбатова Г.Р., Сенилова Я.Е., Пинелис В.Г., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. 2007. Влияние семакса и его фрагмента Pro-Gly-Pro на кальциевый гомеостаз нейронов и их выживаемость в условиях глутаматной токсичности. *Бюлл. эксп. биол. и мед.* **143**, 538–541.
- Асташкин Е.И., Беспалова Ю.Б., Гривенников И.А., Смирнов О.Н., Глезер М.Г., Мясоедов Н.Ф. 2000. Изучение влияния семакса на Ca^{2+} -ответы нейтрофилов человека. *Докл. акад. наук.* **374**, 401–403.
- Bashkatova V.G., Koshelev V.B., Fadyukova O.E., Alexeev A.A., Vanin A.F., Rayevsky K.S., Ashmarin I.P., Armstrong D.M. 2001. Novel synthetic analogue of ACTH 4–10 (Semax) but not glycine prevents the enhanced nitric oxide generation in cerebral cortex of rats with incomplete global ischemia. *Brain Res.* **894**, 145–149.
- Stavchansky V.V., Yuzhakov V.V., Botsina A.Y., Skvortsova V.I., Bondurko L.N., Tsyganova M.G., Limborska S.A., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. 2010. The effect of Semax and its C-end peptide PGP

- on the morphology and proliferative activity of rat brain cells during experimental ischemia: a pilot study. *J. Mol. Neurosci.* [Epub ahead of print].
16. Гривенников И.А., Долотов О.В., Гольдина Ю.И. 1999. Факторы пептидной природы в процессах пролиферации, дифференцировки и поддержании жизнеспособности клеток нервной системы млекопитающих. *Молекуляр. биология.* **33**, 120–126.
 17. Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
 18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. *Методы генетической инженерии.* пер. с англ. М.: Мир.
 19. Medhurst A.D., Harrison D.C., Read S.J., Campbell C.A., Robbins M.J., Pangalos M.N. 2000. The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J. Neurosci. Methods.* **98**, 9–20.
 20. Harrison D.C., Medhurst A.D., Bond B.C., Campbell C.A., Davis R.P., Philpott K.L. 2000. The use of quantitative RT-PCR to measure mRNA expression in a rat model of focal ischemia – caspase-3 as a case study. *Mol. Brain. Res.* **75**, 143–149.
 21. Pfaffl M.W. 2010. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* **29**, e45.
 22. Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl. Acids Res.* **30**, e36.
 23. Kokaia Z., Andberg G., Yan Q., Lindvall O. 1998. Rapid alterations of BDNF protein levels in the rat brain after focal ischemia: evidence for increased synthesis and anterograde axonal transport. *Exp Neurol.* **154**, 289–301.
 24. Lee T.H., Kato H., Chen S.T., Kogure K., Itoyama Y. 2002. Expression disparity of brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity and mRNA in ischemic hippocampal neurons. *Neurorept.* **13**, 2271–2275.
 25. Higuchi T., Graham S.H., Fernandez E.J., Rooney W.D., Gaspary H.L., Weiner M.W., Maudsley A.A. 1997. Effects of severe global ischemia on N-acetylaspartate and other metabolites in the rat brain. *Magn. Reson. Med.* **37**, 851–857.
 26. Sieber F.E., Palmon S.C., Traystman R.J., Martin L.J. 1995. Global incomplete cerebral ischemia produces predominantly cortical neuronal injury. *Stroke.* **26**, 2091–2096.
 27. Almeida R.D., Manadas B.J., Melo C.V., Gomes J.R., Mendes C.S., Grãos M.M., Carvalho R.F., Carvalho A.P., Duarte C.B. 2005. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ.* **12**, 1329–1343.
 28. Schäbitz W.R., Schwab S., Spranger M., Hacke W. 1997. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **17**, 500–506.
 29. Larsson E., Nanobashvili A., Kokaia Z., Lindvall O. 1999. Evidence for neuroprotective effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor after global forebrain ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **19**, 1220–1228.
 30. Zhang Y., Pardridge W.M. 2001. Neuroprotection in transient focal brain ischemia after delayed intravenous administration of brain-derived neurotrophic factor conjugated to a blood-brain barrier drug targeting system. *Stroke.* **6**, 1378–1384.
 31. Li J.M., Brackmann D.E., Hitselberger W.E., Linthicum F.H. Jr., Lim D.J. 1999. Coexpression of neurotrophic growth factors and their receptors in human facial motor neurons. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **108**, 903–908.
 32. Pitts A.F., Miller M.W. 2000. Expression of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 in the somatosensory cortex of the mature rat: coexpression with high-affinity neurotrophin receptors. *J. Comp. Neurol.* **418**, 241–254.
 33. Вьюнова Т.В., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Мясоедов Н.Ф. 2006. Специфическое связывание семакса в различных отделах мозга крыс. *Докл. акад. наук.* **410**, 1–2.
 34. Dmitrieva V.G., Povarova O.V., Skvortsova V.I., Limborska S.A., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. 2010. Semaх and Pro-Gly-Pro activate the transcription of neurotrophins and their receptor genes after cerebral ischemia. *Cell Mol. Neurobiol.* **30**, 71–79.
 35. Яковлева Е.В., Кузенков В.С., Федоров В.Н., Скворцова В.И., Кошелев В.Б., Гусев Е.И., Ашмарин И.П. 1999. Исследование эффективности семакса при глобальной ишемии мозга *in vivo*. *Бюлл. эксп. биол. мед.* **128**, 172–174.
 36. Coppola V., Barrick C.A., Southon E.A., Celeste A., Wang K., Chen B., Haddad el-B., Yin J., Nussenzweig A., Subramaniam A., Tessarollo L. 2004. Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities. *Development.* **131**, 5185–5195.
 37. Kermani P., Rafii D., Jin D.K., Whitlock P., Schaffer W., Chiang A., Vincent L., Friedrich M., Shido K., Hackett N.R., Crystal R.G., Rafii S., Hempstead B.L. 2005. Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB+ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J. Clin. Invest.* **115**, 653–663.
 38. Donovan M.J., Lin M.I., Wiegand P., Ringstedt T., Kraemer R., Hahn R., Wang S., Ibañez C., Rafii S., Hempstead B.L. 2000. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development.* **127**, 4531–4540.
 39. Lin M.I., Das I., Schwartz G.M., Tsoulfas P., Mikawa T., Hempstead B.L. 2000. Trk C receptor signaling regulates cardiac myocyte proliferation during early heart development *in vivo*. *Dev. Biol.* **226**, 180–191.
 40. Дмитриева В.Г., Дергунова Л.В., Поварова О.В., Скворцова В.И., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф. 2008. Действие семакса и его С-концевого трипептида РРР на экспрессию генов факторов роста и их рецепторов в условиях экспериментальной ишемии мозга крыс. *Докл. акад. наук.* **422**, 258–261.