На правах рукописи

Митрошина Елена Владимировна

### Молекулярно-клеточные механизмы нейропротекторного действия BDNF и GDNF при моделировании гипоксии и нейродегенерации

1.5.5 – физиология

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук

Нижний Новгород - 2022

Работа выполнена на кафедре нейротехнологий Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры нейротехнологий, директор Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского Ведунова Мария Валерьевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, академик РАН, заведующий лабораторией клеточной нейробиологии обучения Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН Балабан Павел Милославович

доктор медицинских наук, профессор, главного научного сотрудника и заведующую лабораторией нейробиологии и тканевой инженерии, заведующую отделом молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности Института мозга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии»

#### Салмина Алла Борисовна

доктор биологических наук, профессор РАН заведующий лабораторией структуры и функции митохондрий НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова Плотников Егор Юрьевич

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань

Защита диссертации состоится «23 » <u>марта</u> 2023 г. в <u>часов</u> минут на заседании совета Д 212.166.21 при ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: https://diss.unn.ru/files/2022/1322/diss-Mitroshina-1322.pdf

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета кандидат биологических наук

**Вил** Акинчиц Е.К.

#### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Известно, что многие патологии центральной нервной системы (ЦНС) имеют общие компоненты и молекулярные каскады, приводящие к нарушению функции и гибели нервных клеток. Гипоксия играет ключевую роль в патогенезе не только ишемического повреждения головного мозга, но и множества нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др. (Nucera & Hachinski, 2018; Salminen et al., 2017; Singh & Joshi, 2017; H. Zhang et al., 2019). Снижение концентрации кислорода в нервной ткани приводит к нарушениям процесса окислительного фосфорилирования, повышению проницаемости митохондриальной мембраны и активации свободнорадикальных процессов (Pfisterer & Khodosevich, 2017; Y. Zhao et al., 2019). Это ведет к катастрофическому снижению активности нейрон-глиальных сетей головного мозга. Гипоксия приводит к развитию нейровоспаления за счет активации микроглии, что наряду с увеличением количества активных форм кислорода и продукции провоспалительных цитокинов, характерно для многих дегенеративных заболеваний ЦНС (Hambali et al., 2021) и является потенциальной причиной развития болезни Альцгеймера (БА) (Tarkowska, 2021). Это позволяет предположить не только наличие общих для различных патологий молекулярных механизмов, но и использовать общие подходы к поиску методов коррекции нарушений функционирования клеток головного мозга, например, при ишемическом повреждении и нейродегенеративных заболеваниях.

Известен ряд эндогенных систем, регулирующих метаболические И физиологические процессы, протекающие в ЦНС, и поддерживающих устойчивость нервных клеток к воздействию стресс-факторов. Среди них следует особо выделить систему нейротрофических факторов. Нейротрофические факторы - одни из важнейших регуляторных белков, обеспечивающих не только контроль нейрогенеза, но и регулирующих синаптогенез, модуляцию синаптической передачи и выживаемость нейронов в зрелом мозге. Семейство нейротрофических факторов включает более 20 различных белков, разделяющихся на три подсемейства. Ряд из них, прежде всего нейротрофический фактор головного мозга BDNF и глиальный нейротрофический фактор GDNF, известны своими нейропротекторными эффектами при различных патологиях центральной и периферическая нервной системы, включая ишемическое повреждение головного мозга (Cruz Duarte et al., 2012; W. Huang et al., 2017; D. Liu et al., 2014; Vedunova et al., 2015; Уразов и др., 2018; Mitroshina et al., 2019 и др.), травмы и нейродегенеративные заболевания, в том числе болезнь Паркинсона (Aly et al., 2019; Yurek et al., 2017; Criscuolo et al., 2015), болезнь Альцгеймера (de Pins et al., 2019; Josiane Budni et al., 2015; Revilla et al., 2014; Mitroshina et al., 2020) и др.).

Показано, что действие BDNF и GDNF связано с рецептор-опосредованным запуском внутриклеточных каскадов, в которые входят различные киназы, прежде всего PI3K/Akt и RAS/MAPK. Описаны магистральные метаболические пути, однако данных об активации многочисленных разветвлений этих путей, приводящих к сохранению жизнедеятельности клетки, на сегодняшний день недостаточно (Frías Ibáñez et al., 2014; R. Wang et al., 2012, Zhang et al., 2021; Bazzari & Bazzari, 2022). Активация этих молекулярных каскадов объединяет всю нейрон-глиальную сеть в единую функциональную и метаболическую систему, способную к комплексному адаптивному ответу (Frías Ibáñez et al., 2014; Mishchenko et al., 2019; Mitroshina et al., 2020; Shishkina et al., 2018). Исследование роли ключевых внутриклеточных киназ, а также других потенциальных молекулярных механизмов реализации нейропротекторного эффекта нейротрофических факторов может позволить выявить реперные точки действия нейротрофинов и механизмы повышения и снижения эффективности их применения в определенных условиях. Важным направлением исследований представляется изучение взаимосвязей и перекрестных эффектов между системой нейротрофических факторов и другими системами, регулирующими ответ клеток на гипоксическое повреждение. Большинство адаптивных реакций клетки на гипоксию

связано семейством транскрипционных факторов, называемых факторами. с индуцируемыми гипоксией (HIF) (Semenza, 2009; Mitroshina et al., 2021). Гипоксический стресс инициирует стабилизацию комплекса HIF-1, который транслоцируется в ядро и активирует более 100 различных генов, улучшая снабжение тканей кислородом, биоэнергетику и выживаемость клеток (Dengler et al., 2014; Wu et al., 2019). На сегодняшний день большая часть экспериментальных работ посвящена роли фактора HIF в адаптации к гипоксии в тканях печени и почек, однако очевидно, что HIF-1 является универсальным адаптационным клеточным механизмом, в том числе и для нервной системы. В свете вышеизложенного чрезвычайно актуально исследование возможных нейропротекторных связанных с активацией HIF-1 при гипоксии головного эффектов. мозга И нейродегенерации, а также поиск возможных взаимосвязей между HIF-1 И нейротрофическими факторами.

Кроме того, особый интерес представляет вопрос о возможности длительного повышения эндогенного уровня экспрессии нейротрофических факторов для коррекции нейродегенеративных процессов. Поскольку белковые молекулы не могут преодолевать гематоэнцефалический барьер, наиболее рациональным представляется использование в качестве нейропротекторного агента генно-инженерных вирусных конструктов, несущих соответствующие гены (Katsu-Jiménez et al., 2016; Е. Mitroshina et al., 2018; Song et al., 2015). Вопрос о возможности применения подобных конструктов для коррекции изменений функционирования нейронных сетей как при ишемическом повреждении головного мозга, так и при развитии нейродегенеративных процессов на сегодняшний день остается открытым.

Одним из принципиальных моментов при исследовании нейропротекторных свойств различных соединений является изучения нейронных сетей — минимальных функциональных единиц нервной системы, ответственных за процессы реконсолидации и хранения информации (Mishchenko et al., 2019; Yuste, 2015). Нейронная сеть — это не только функционально связанная совокупность нейронов, но и единый функциональный ансамбль, способный консолидировано реагировать на изменения, вызванные как внешними, так и внутренними факторами (Hasan & Berdichevsky, 2016; Johnstone et al., 2010; Vedunova et al., 2015). Изучение отдельной нейронной сети в нативном головном мозге является крайне сложной, методически не решенной в данный момент задачей. Одной из адекватных современных биологических моделей являются первичные диссоциированные культуры клеток головного мозга. Культуры нейронов позволяют исследовать клеточные и сетевые реакции в условиях хронического эксперимента с возможностью многократной регистрации нейросстевой активности, что крайне важно при поиске подходов к коррекции различных патологических процессов в нервной системе.

В связи с этим, **целью** работы явилось изучение роли системы нейротрофических факторов (BDNF и GDNF) и индуцируемого гипоксией фактора HIF1 в адаптации и структурно-функциональной реорганизации нейронных сетей головного мозга при моделировании повреждающих факторов

#### Задачи исследования:

- 1. Оценка нейропротекторного действия нейротрофических факторов BDNF и GDNF при моделировании повреждающих факторов ишемии и ишемия-подобных состояний *in vitro*.
- 2. Изучение возможных молекулярных механизмов действия нейротрофических факторов: исследование роли ключевых рецепторных киназ-опосредованных механизмов действия BDNF и GDNF.
- 3. Исследование взаимного влияния нейротрофических факторов и фактора, индуцируемого гипоксией HIF-1а.
- 4. Исследование роли модуляции активности системы фактора, индуцируемого гипоксией, на функциональную активность нейронных сетей при моделировании гипоксического повреждения и β-амилоидопатии.

5. Исследование влияния хронического увеличения уровня нейропротекторного агента в моделях гипоксии и хронической β-амилоидопатии *in vitro*.

#### Научная новизна.

В представленной работе впервые исследовано нейропротекторное действие нейротрофических факторов BDNF и GDNF не только при действии отдельных повреждающих факторов ишемии, но и при комплексном моделировании ишемияподобных условий *in vitro*. Впервые проведено комплексное исследование возможных молекулярно-клеточных механизмов нейропротекторного действия нейротрофических факторов BDNF и GDNF при моделировании гипоксии. Исследованы рецепторные механизмы, активируемые исследуемыми регуляторными молекулами. Изучена роль ключевых участников нейронального кинома в реализации нейропротекторного действия BDNF и GDNF. Впервые показана роль Jak / STAT киназного пути, выявлен вклад киназ eEF2K, SRC и IKKb в опосредованное нейротрофическими факторами BDNF и GDNF поддержание функциональной активности нейронных сетей. Описано взаимодействие системы нейротрофических факторов и системы фактора HIF-1. Стабилизация комплекса НІГ-1 с помощью оригинального селективного ингибитора НІГ-пролилгидроксилазы Нейроадапт предотвращает индуцированное гипоксией увеличение экспрессии мРНК как BDNF, так и GDNF, а также рецептора TrkB. В то же время экзогенное применение нейротрофических факторов ингибирует индуцированное гипоксией увеличение уровня экспрессии HIF-1а.

Также впервые продемонстрировано, что использование Нейроадапта для стабилизации субъединицы HIF1a позволяет эффективно сохранять жизнеспособность и нейросетевую активность первичных культур гиппокампа при моделировании гипоксии, поддерживает уровень корреляции и сохраняет функциональные связи между клетками. Важно отметить, что данный подход демонстрирует высокую эффективность не только при превентивном использовании Нейроадапта, но и при внесении его в культуральную среду в постгипоксическом периоде.

В работе охарактеризованы особенности формирования нарушений сетевой биоэлектрической и кальциевой активности при фармакологическом моделировании βамилоидоза и использовании трансгенной модели болезни Альцгеймера 5xFAD *in vitro*. Показано выраженное угнетающее действие хронической амилоидопатии на сетевую функциональную биоэлектрическую и кальциевую активность первичных культур гиппокампа, выявлено выраженное упрощение архитектуры нейрон-глиальной сети.

Выполнена оценка возможности применения генно-инженерных конструктов, несущих ген нейротрофического фактора, для терапии повреждений ЦНС. Впервые хронической гиперэкспрессии BDNF. проведена комплексная оценка влияния индуцированной вирусным вектором AAV-Syn-BDNF-eGFP, на биоэлектрическую и кальциевую нейросетевую активность в норме и при моделировании гипоксии. Особый интерес представляют данные, свидетельствующие, что хроническое повышение BDNF поддерживает спонтанную нейросетевую концентрации активность И функциональную архитектуру нейронных сетей при воздействии стресс-факторов. При фармакологическом моделировании амилоидопатии BDNF оказал выраженный нейропротекторный эффект как при использовании рекомбинантного белка, так и при применении вектора AAV-Syn-BDNF-eGFP. Также впервые исследовано влияние модуляции активности фактора HIF-1 с помощью ингибитора HIF-пролилгидроксилазы при моделировании β-амилоидоза как наиболее распространенного типа нейродегенеративного процесса.

В исследовании использован комплекс современных методов клеточной биологии, электрофизиологии, нейроимиджинга, молекулярной биологии, в том числе и разработанные и усовершенствованные автором методы моделирования ишемия-подобных условий, а также амилоидопатии *in vitro*, что позволило детально изучить особенности

работы нейронных сетей при данных патологиях и оценить влияние нейропротекторных агентов на функциональную нейросетевую активность клеток головного мозга.

#### Практическая и теоретическая значимость работы.

Представленные в диссертационной работе данные о молекулярно-клеточных механизмах нейропротекторного действия нейротрофических факторов BDNF и GDNF, а также транскрипционного фактора HIF, расширяют теоретические представления о регуляторных системах головного мозга, позволяющих активировать адаптационные ресурсы организма. Разработанные экспериментальные модели ишемия-подобных условий и β-амилоидоза *in vitro* позволяют использовать их как модельные системы для изучения изменений физиологических процессов в локальных нейрон-глиальных сетях при данных патологиях. Выявленные особенности функционирования нейрон-глиальных сетей первичных культур гиппокампа *in vitro* при моделировании β-амилоидоза расширяют фундаментальные знания о механизмах развития нейродегенеративных процессов в центральной нервной системе. Показан нейропротекторный эффект применения генно-инженерного вирусного вектора AAV-BDNF-eGFP при моделировании ишемии и β-амилоидоза *in vitro*.

Полученные данные являются фундаментальной базой для разработки инновационных терапевтических подходов к коррекции функционирования нейронглиальных сетей головного мозга при поражениях центральной нервной системы.

#### Положения, выносимые на защиту:

- 1. Опосредованная нейротрофическими факторами (BDNF, GDNF) активация защитных внутриклеточных метаболических каскадов позволяет сохранять морфофункциональную активность нейронных сетей головного мозга при действии стресс-факторов in vitro. В опосредованном BDNF и GDNF сохранении нейросетевой активности помимо ранее описанных магистральных каскадов PI3K/Akt и MAPK/ERK принимают значимое участие киназы eEF2K, SRC и IKKb.
- Хроническое повышение концентрации BDNF при трансдукции нервных клеток аденовирусным вектором AAV-Syn-BDNF-eGFP поддерживает спонтанную нейросетевую активность в постгипоксическом прериоде и при моделировании βамилоидопатии.
- Модуляция активности индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 с помощью ингибирования HIF-пролилгидроксилазы позволяет активировать адаптационные возможности нервных клеток и сохранять активность нейрон-глиальных сетей при гипоксическом воздействии и β-амилоидопатии. BDNF и GDNF влияют на систему фактора HIF-1.

#### Внедрение результатов исследования.

Результаты исследования, а также разработанные и модифицированные методы и методические подходы внедрены в научно-исследовательскую работу НИИ Нейронаук ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Кроме того, результаты проведенных исследований внедрены в учебный процесс кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины ННГУ им Н.И. Лобачевского.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на 35 международных и 19 всероссийских конференциях, в том числе на международном форуме "11-th Gottingen Meeting of the German Neuroscience Society (Геттинген, Германия, 2015), Международной конференция "World conference on regenerative medicine" (Лейпциг, Германия, 2015), международной конференции "12th European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease Location" (Бильбао, Испания, 2015), международной конференции "The Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies and the Baltic Physiological Societies (FEPS 2015)" (Каунас, Литва, 2015), 11-м международном конгрессе по травме головного мозга (The eleventh world congress on brain injury) (Гаага, Нидерланды, 2016), международном симпозиуме 9th

International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair 2016 (Лейпциг, Германия, 2016), межлународном съезде 10th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays (MEA Meeting 2016) (Ройтлинген, Германия, 2016), международном форуме 10th FENS Forum of Neuroscience (Копенгаген, Дания, 2016), международном съезде 21st Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience From stem cells to behaviour in the normal and diseased nervous system (ISDN 2016) (Антиб, Франция, 2016), международной конференции «ISN-ESN 2017» (Париж, Франция, 2017), международной конференции «FEPS-2017» (Вена, Австрия, 2017), международной конференции «Brain Injury Across the Age Spectrum: Improving Outcomes for Children, Adolescents, and Adults in this issue of the Journal of Head Trauma Rehabilitation» (Хьюстон, США, 2018), 11-м международном симпозиуме по субстрат-интегрированным мультиэлектродным системам «MEA Meeting 2018» (Ройтлинген, Германия, 2018), международном форуме «11-th FENS forum of European Neuroscience» (Берлин, Германия, 2018), международной конференции «13th World Congress on Brain Injury» (Торонто, Канада, 2019), международной конференции «XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease» (Порту, Португалия, 2019, 15th Annual Conference on Brain Injury in this issue of the Journal of Head Trauma Rehabilitation (CIIIA, 2020), IV Scientific School "Dynamics of Complex Networks and their Application in Intellectual Robotics" (DCNAIR) (Нижний Новгород, 2020), Virtual World Congress on Brain Injury (Международный, онлайн-формат, 2021), XV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease Online July 5-9, 2021 (Марсель, Франция, 2021), VOLGA NEUROSCIENCE MEETING 2021 (Н.Новгород, 2021), Всероссийская с международным участием конференция Российского нейрохимического общества 22-24 мая 2022 года (RUSNEUROCHEM 2022) (Санкт-Петербург, 2022), International Conference Laser Optics (ICLO) 2022 (Санкт-Петербург, 2022), FENS Forum 2022 (the Federation of European Neuroscience Societes Forum 2022) (Париж, Франция, 2022), Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): The Thirteenth International Multiconference (Новосибирск, 2022).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 137 научных работ. Из них 40 статей в российских и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК, индексируемых в системах цитирования Web of Science и Scopus, 97 тезисов докладов на международных, российских и региональных конференциях. Зарегистрировано 4 программы для ЭВМ, 2 патента на изобретение.

#### Личный вклад автора

Автор лично принимал участие в постановке задач и разработке дизайна экспериментальных исследований, непосредственно принимал участие в проведении экспериментальных исследований, обработке, анализе и интерпретации полученных результатов, а также подготовке публикаций по результатам работы.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 296 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка литературы, включающего 515 источников и приложений. Работа иллюстрирована 70 рисунками и 13 таблицами.

Благодарности. Автор выражает благодарность д.б.н., проф. Тарабыкину Виктору Степановичу (Университет Charite, Германия) и д. м. н. Риме Аль-Авар (Ontario Institute for Cancer Research, Канада) за предоставленные ингибиторы киназ, к.х.н. Полозникову А.В. за предоставленный оригинальный ингибитор HIF-пролилгидроксилазы Нейроадапт, сотрудникам кафедры прикладной математики ИИТММ ННГУ д.ф.-м.н. Иванченко Михаилу Васильевичу и Кривоносову Михаилу Игоревичу за разработку оригинального алгоритма анализа сетевых характеристик кальциевой активности (программа AstroLab), к.ф.-м.н. Пимашкину Алексею Сергеевичу за разработку оригинального алгоритма анализа биоэлектрической активности клеточных культур (программа Meaman), Епифановой Екатерине Алексеевне, преподавателю каф. неорганической химии ХФ ННГУ за аденоассоциированного вирусного вектора AAV-Syn-BDNF-eGFP разработку И Широковой Олесе Михайловне (ПИМУ Минздрава России) за помощь в выполнении электронно-микроскопических исследований.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследований *in vitro* послужили первичные культуры клеток гиппокампа, полученные от 18-дневных мышиных эмбрионов линии C57BL/6, и первичные культуры клеток гиппокампа, полученные от 18-дневных мышиных эмбрионов линии 5xFAD. Всего в экспериментах было использовано 850 первичных культур гиппокампа мышей линии C57BL/6 и 40 первичных культур гиппокампа мышей линии 5xFAD. Содержание животных в сертифицированном виварии Национального исследовательского Нижегородского государственного университета и исследовательская работа проводились в соответствии с требованиями приказа №267M3 РФ от 19.06.2003, а также в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals», отвечали требованиям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006) и была согласована с локальным этическим комитетом Национального исследовательского Нижегородского государственного национального исследовательского нижегородского государствении о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006) и была согласована с локальным этическим комитетом Национального исследовательского Нижегородского государственного исследовательского.

Культивирование первичных культур клеток гиппокампа. Диссоциирование нервных клеток достигалось путем обработки ткани гиппокампа 0,25% трипсином (ThermoFisher, США). В качестве питательной среды использовалась нейробазальная среда Neurobasalmedium (ThermoFisher, США) с добавлением эмбриональной телячьей L-глутамина и питательной добавки B27 (ThermoFisher, сыворотки, США). Культивирование осуществлялось по ранее разработанному протоколу в течение 28 дней in vitro (DIV) (Vedunova et al., 2015). Исходная плотность клеток в культуре составляла 7000-9000 кл./см<sup>2</sup>. Жизнеспособность клеток поддерживалась в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора Binder (Германия). В процессе культивирования диссоциированные нервные клетки образовывали между собой нейрон-глиальные сети с характерной пространственной топологией и функциональной активностью, основные этапы формирования которых оценивались с помощью широкопольной световой микроскопии с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Zeiss Observer A1 (Carl Zeiss, Германия).

#### Оценка жизнеспособности клеток в диссоциированных культурах.

С целью идентификации мертвых клеточных ядер и общего количества клеточных ядер в культуре клеток гиппокампа применялась окраска пропидий йодидом (Sigma, Germany) и бис-бензимидом (Sigma, Germany) согласно ранее разработанному протоколу (Vedunova et al., 2015). Визуализация окрашенных клеток проводилась с помощью инвертированного микроскопа Zeiss Observer A1 (Carl Zeiss, Германия).

Регистрация и анализ спонтанной биоэлектрической активности первичных культур клеток гиппокампа. Спонтанную биоэлектрическую активность культивируемых нейронов регистрировали с помощью мультиэлектродной системы MEA60 (Multichannel Systems, Германия). Регистрация и анализ сигнала осуществлялись в соответствии с методикой, описанной в Mishchenko et al., 2019 и Mitroshina et al., 2020. Были оценены следующие параметры: количество малых сетевых пачек; количество спайков в малой сетевой пачке, количество больших сетевых пачек. Критерием малой сетевой пачки являлось наличие спайков минимум на 4-х различных электродах матрицы с межспайковым интервалом не более 100 мс (рис.1). Для получения и анализа данных использовался набор программного МС Rack<sup>TM</sup>, а также разработанный в программной среде Matlab<sup>TM</sup> оригинальный пакет алгоритмов Меатап (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2012611190).



**Рис. 1.** Схема выполения эксперимета по определению сетевой биоэлектрической активности культур клеток

#### Метод кросскорреляционного анализа и сетевых графов

Для анализа функциональной архитектуры нейрон-глиальных сетей применялся метод построения графа сети. Степень синхронизации всех возможных пар электродов с учётом синаптических задержек оценивалась с помощью был метода расчета доли переданных импульсов по аналогии с коэффициентом кросс-корреляции для непрерывных сигналов. Рассчитывалось число «синхронных» импульсов, попавших на обоих каналах в интервалы допуска, равные  $\delta$ , центры которых удалены на время задержки  $\tau$ , пропорциональное расстоянию между электродами. Использовалась нормировка на число принятых импульсов постсинаптическим нейроном —  $n_j$ . Таким образом, формула для вычисления матрицы кросс-корреляции выглядит так:

$$C_{ij} = \frac{n_{synchr}}{n_j} \tag{1}$$

где С<sub>ij</sub> – коэфициент синхронизации сети, n<sub>synchr</sub> – число синхронных импульсов, попавших на каналы, n<sub>j</sub> – число всех принятых импульсов (1).

Далее выбирались 1–5% наибольших коэффициентов  $C_{ij}$  и определялся набор индексов – клеток-хабов с максимальным числом функционально активных связей. Также для каждого хаба «i» рассчитывалось число связей как частота повторения индекса i среди множества  $C_{ij}$ , после чего проводилось построение графа связности. При этом размер вершины пропорционален числу значимых связей. Ребро графа соответствует функциональной связи, по которой сигнал одного электрода передаётся на другой за индивидуальное для каждой пары время синаптической задержки  $\tau \pm \delta/2$  (Shishkina et al., 2018, Mishchenko et al., 2019).

**Функциональный кальциевый имиджинг.** Для имиджинговых исследований функциональной кальциевой активности нервных клеток использовался лазерный сканирующий микроскоп LSM 800 (Zeiss, Германия), объектив W Plan-Apochromat  $20 \times / 1.0$ . В качестве кальциевого сенсора был использован Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB-1) 0.4  $\mu$ M, (Invitrogen, CША). Проводили регистрацию временной серии изображений для оценки динамики измерения концентрации внутриклеточного кальция. Разрешение полученного изображения составляло 512х512 пикселей, размер поля зрения 420х420 мкм, частота регистрации изображений 2 Hz. Выделение и анализ кальциевых осцилляций

проводили с помощью оригинальной программы Astrolab (Mitroshina et al., 2020а., свидетельство о регистрации программы ЭВМ № 2021612870 от 25.02.2021). Алгоритм включает несколько этапов: вычитание сдвига, фильтрация данных, определение базовой линии на основе оценки шума камеры по сигналу без объекта (культуры клеток), отсечение по адаптивному порогу по пространству в 3 стандартных отклонения и объединение получившихся пространственно-временных областей в кальциевые события с помощью кластеризации. Алгоритм рассматривает всю плоскость изображения как единое целое и идентифицирует кальциевые события, как пространственно-временные связные области со значимой активностью. Для анализа кальциевых событий в отдельных клетках: общая длительность осцилляции (с), частота возникновения осцилляций (количество кальциевых событий/мин), процент работающих клеток в культуре. Далее выполнялся анализ параметров связности сети.

Построение динамической нейрон-глиальной сети по данным кальциевого имиджнга. Простая динамическая нейрон-глиальная сеть представлялась в виде неориентированного графа G = (V, E), множество вершин V которого соответствует множеству клеток, множество ребер E – наличию корреляций между клетками:

$$V = \overline{1, n}, E = \{(i, j) : i, j \in V, \rho_{ij} > \rho_{thr}\},$$
 (2)  
где  $\rho_{ij}$  – коэффициент корреляции Пирсона между парами клеток  $i, j \in V$ :

$$\rho_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^{n} \tilde{x}_{k}^{i} \cdot \tilde{x}_{k}^{j}}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n} (\tilde{x}_{k}^{i})^{2} \cdot \sum_{i=1}^{n} (\tilde{x}_{k}^{j})^{2}}},$$
(3)
$$\tilde{x}_{k}^{i} = x_{k}^{i} - \langle x_{s}^{i} \rangle_{k-w,k}$$
(4)

 $x_k^i$  – характеристика *i*-ой клетки в момент времени *k*,

 $\breve{x}_{k}^{i}$  – характеристика за вычетом скользящего среднего с окном W.

Определялись следующие характеристики: средний уровень корреляции кальциевой активности в компонентах сети, средний уровень корреляции соседних клеток, среднее количество функционально значимых связей клетки, скорость распространения сигнала между клетками.

Визуальное представление функциональной архитектуры сети, определенной с помощью данного алгоритма, выполнено с применением двух видов графиков: ориентированный граф попарных взаимодействий (рис. 2В) и связь расстояния между клетками с уровнем корреляции (рис. 2Г).



**Рис. 2.** Пример визуализации результатов обработки кальциевой активности нейронглиальной сети: А – изображение первичной культуры гиппокампа, окрашенной кальциевым сенсором Oregon Green; Б - интенсивности кальциевой активности для трех выбранных клеток; В – ориентированный граф (цвет клеток выбран для контрастности); Г – зависимость расстояния между клетками и уровня корреляции интенсивностей кальция во времени для всех пар клеток; оранжевые точки соответствуют соседним парам клеток, синие точки – отдаленным парам клеток.

Граф демонстрирует функционально значимые взаимосвязи между клетками, определяемые как наличие уровня корреляции кальциевой активности выше 0.3 для пары клеток. В таком случае между парой клеток на рисунке строилось ребро. Направление стрелки от одной клетки к другой определяется в зависимости от знака задержки и указывает характерное направление распространения сигнала. На построения графика связи между корреляцией активности и расстоянием между клетками корреляция между интенсивностями кальциевой активности клеток вычислялась с задержкой сигналов друг относительно друга от 0 до 5 секунд. В качестве результирующего уровня корреляции между сигналами выбиралось максимальное значение корреляции, достигнутое при некоторой задержке (Mitroshina et al., 2020а).

#### Иммуноцитохимическое маркирование клеточных структур.

Клеточные культуры фиксировали в 4% -ном растворе параформальдегида в PBS в течение 20 мин при комнатной температуре; для демаскирования использовали раствор 0,2% Triton X-100 в фосфатном буферном растворе. Для иммуноцитохимического окрашивания  $\beta$ -амилоида применялись первичные куриные антитела к  $\beta$ -амилоиду (Abcam, Великобритания) и вторичные антитела к антителам курицы, конъюгированные с желтой флуоресцентной меткой (anti-chiken-Alexa 555) (Invitrogen, USA). Для маркирования нейронов использовались козьи антитела к  $\beta$ III-тубулину (Abcam, Великобритания) и вторичные антитела к  $\beta$ III-тубулину (Abcam, Великобритания) и вторичные антитела к  $\beta$ III-тубулину (Abcam, Великобритания) и вторичные антитела к козы, конъюгированные с красной флуоресцентной меткой Alexa 647 (Invitrogen, CША). Для маркирования нейротрофического фактора головного мозга BDNF использовались первичные поликлональные куриные антитела к BDNF (Abcam, CША) и вторичные поликлональные антитела, конъюгированные с красной флюоресцентной меткой Alexa 647 (Invitrogen, CША). Визуализация препаратов проводилась с использованием флуоресцентного конфокального микроскопа Zeiss 800 (Carl Zeiss, Германия). Полученные изображения были проанализированы с использованием пользовательского плагина ImageJ.

Электронно-микроскопический метод исследования *ультраструктуры диссоциированных культур.* Пробоподготовка образцов для электронной микроскопии проводилась по стандартной методике. Первичные культуры клеток гиппокампа фиксировали последовательно 2,5% раствором глутарового альдегида на фосфатном буфере (рН=7,4) и 1% раствором четырехокиси осмия. Материал обезвоживали в спиртах восходящей концентрации. Обработанную ткань заключали в смесь ЭПОН-АРАЛДИТ (Саркисов, 1996). Ультратонкие срезы, приготовленные с использованием ультрамикротома Leica EM UC7 ULTRA (Leica, Германия), окрашивали 4% уранилацетатом (SPI-chem, 02624-AB, США), цитратом и тригидратом свинца (SPI-chem, 512-26-5), а затем исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Morgagni 268D (FEI, CIIIA) (Mitroshina et al., 2019).

#### Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Тотальную РНК выделяли из первичных культур клеток гиппокампа через 24 часа после воздействия гипоксии (15 DIV) с использованием набора ExtractRNA (Eurogen, Россия). Затем кодирующую ДНК синтезировали с помощью обратной транскриптазой вируса мышиного лейкоза Молони (MMLV) (Eurogen, Россия) и случайного праймера.

Количественную ПЦР в реальном времени проводили с помощью набора qPCRmix-HS SYBR (Eurogen, Россия) и термоциклера Applied Biosystems 7500 RT-PCR. Были использованы следующие праймеры:

Oaz1 fw 5'-AAGGACAGTTTTGCAGCTCTCC-3' Oaz1\_rv 5'-TCTGTCCTCACGGTTCTTGGG-3' BDNF\_fw 5'-CCCAACGAAGAAAACCATAAGGA-3' BDNF rv 5'-CCAGCAGAAAGAGTAGAGGAGGCT-3' TrkB fw 5'-TTTCCGCCACCTTGACTTGTCT-3' TrkB rv 5'-GTCGGGGGCTGGATTTAGTCTCC-3' GDNF\_fw 5'-CCTTCGCGCTGACCAGTGACT-3', GDNF rv 5'-GCCGCTTGTTTATCTGGTGACC-3' GFRa1 fw 5'-TGTCTTTCTGATAATGATTACGGA-3' GFRa1\_rv 5'-CTACGATGTTTCTGCCAATGATA-3' Hif1a\_fw 5'-GCAATTCTCCAAGCCCTCCAAG-3' Hif1a rv 5'-TTCATCAGTGGTGGCAGTTGTG-3' Ikbkb fw 5'-AACCAGAATCCAGGAAGACACG-3' Ikbkb\_rv 5'-TCGTTTGTCTTGCTGTCTGAGATG-3' Gria2\_fw3, 5'-AGCCAAGGACTCGGGAAGTAAGG-3' Gria2 rv3, 5'-CACCAGCATTGCCAAACCAAGG-3 '

Обработка данных проводилась с использованием метода  $\Delta\Delta$ Ct и контрольного образца, в котором уровень целевого гена был принят за единицу. Нормализация была выполнена относительно контрольного гена (Oaz1).

# Получение аденоассоциированного вирусного вектора AAV-Syn-BDNF-EGFP и трансдукция первичных культур клеток гиппокампа

Для получения вирусного конструкта, кодирующего ген BDNF, были использованы плазмида AAV-Syn-EGFP и хелперные плазмиды pDP5, DJvector и pHelper. Вирус AAV-Syn-BDNF-EGFP включал следующие последовательности: (1) нейрональный промотор человеческого синапсина (hSyn) (2) регуляторный элемент WPRE, усиливающий работу hSyn; (3) мультилинкер для клонирования ORF (открытой рамки считывания) встроенного гена; (4) ген EGFP; (5) SV40 polyA сигнальная последовательность, фланкированная ITR-(Inverted terminal repeat) из AAV серотипа 2, а также несущая повторами последовательность ампицилиновой кассеты, необходимой для положительного отбора колоний, несущих данную плазмиду (AmpRпромотер И AmpR ген) И (7)последовательность, соответствующую нуклеотидной последовательности, кодирующей функциональный белок BDNF.

Инфицирование культур осуществлялось на 7 DIV согласно протоколу, описанному в Mitroshina et al., 2018.

#### Моделирование нормобарической гипоксии in vitro

Моделирование острой гипоксии in vitro проводилось заменой культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода на 10 минут. Для вытеснения кислорода культуральная среда насыщалась аргоном в течение 20 минут. Эксперимент проводился в герметичной камере, в которой воздух также был замещен на аргон. После 10-минутной обработки аргоном содержание кислорода в среде снижается с 4,66 мг/л (3,26 мл/л) до 0,53 мг/л (0,37 мл/л). Определение содержания растворенного кислорода проводилось при помощи методики йодометрического титрования (Vedunova et al., 2015).

#### Моделирование глюкозной депривации (ГД) in vitro

Для моделирования глюкозной депривации (ГД) культуральная среда заменялась на промышленную культуральную среду, идентичную по составу среде Neurobasal Medium, однако не содержащую питательные субстраты (глюкозу, лактат, пируват) (разработано компанией ПанЭко, Россия) на 1 час. Затем проводилась обратная замена на кондиционную среду (Митрошина с соавт., 2019).

#### Моделирование окислительного стресса (OC) in vitro

Окислительный стресс (OC) моделировался путем введения в культуральную среду фермента глюкозоксидазы (5 нг/мл) (Sigma). Глюкозоксидаза катализирует дегидрирование глюкозы и перенос отнятого водорода на кислород воздуха с образованием перекиси водорода, при этом глюкоза окисляется до глюконолактона (Митрошина с соавт., 2019).

#### Моделирование ишемия-подобных условий in vitro

Моделирование ишемия-подобных условий осуществлялось путем комбинированного воздействия всех трех моделей повреждающих факторов на первичные культуры гиппокампа в течение 10 минут (Митрошина с соавт., 2019).

#### Моделирование β-амилоидопатии in vitro.

Были разработаны два протокола моделирования β-амилоидопатии in vitro. Первый протокол предполагает однократное введение Аβ42 в культуральную среду на 10 день культивирования (DIV) с конечной концентрацией раствора 3,5 мкМ. Второй протокол заключается в хроническом внесении βA в культуральную среду начиная с 10 DIV каждый раз после смены среды (конечная концентрация Aβ 3,5 мкМ). Фибриллярный β-амилоид готовили путем растворения лиофилизованного порошка β-амилоидного пептида (Aβ42) (InnovaGen, Швеция) в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропаноле (HFIP) с дальнейшей обработкой диметилсульфоксидом (Mitroshina et al., 2020). BDNF (1 нг / мл, Millipore, CША), GDNF (1 нг / мл, Millipore, CША) и ингибиторы внутриклеточных киназ (1 мкМ) добавляли в культуральную среду за 20 минут до моделирования стресс-фактора

*Методы статистической обработки результатов.* Полученные данные были проверены на нормальность распределения с применением критерия Шапиро-Уилка. Данные, подчиняющиеся нормальному распределению, представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего (m±SEM). Данные, не подчиняющиеся нормальному распределению, представлены как «M [Q1; Q3]», где М – медиана, Q1 – первый квартиль (квантиль 0,25) и Q3 – третий квартиль (квантиль 0,75) групповых выборок. Достоверность статистических различий между выборками, имеющих нормальное распределение, проводилось с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. При повторных изменениях применялся метод гереаt-ANOVA. Для оценки значимости отличий между группами с распределением, отличающимся от нормального, проводилось с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни либо Краскела-Уоллеса для множественных сравнений. В каждой группе культур проводилось не менее пяти независимых биологических повторов. Различия между группами считались значимыми при р  $\leq 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние нейротрофических факторов BDNF и GDNF на адаптацию нервных клеток к действию факторов ишемии. На первом этапе исследования проведена оценка роли нейротрофических факторов в активации адаптационных процессов в нервной системе и выявления их нейропротекторного потенциала при комплексном ишемическом повреждении и действии отдельных звеньев ишемии. Для этого была разработана методика комплексного моделирования ишемия-подобных условий *in vitro*, сочетающая все три ключевых фактора ишемического повреждения – кислородную и глюкозную депривацию и хронический окислительный стресс. Было проведено исследование жизнеспособности клеток первичных культур гиппокампа при моделировании каждого фактора ишемии в отдельности и комплекса ишемия-подобных условий на фоне аппликации BDNF, GDNF, а также их совместного применения (табл. 1).

Показано, что различные звенья ишемического повреждения оказывают различное воздействие на жизнеспособность культуры. Гипоксическое повреждение вызывает достоверное увеличение процента мертвых клеток в культуре уже через 24 часа, далее в течение трех суток число мертвых клеток значимо не изменяется, однако на 7 сутки постгипоксического периода происходит резкое достоверное относительно 1 и 3 дня повышение доли мертвых клеток. При моделировании глюкозной депривации и окислительного стресса число мертвых клеток увеличивается постепенно без выраженных критических периодов (табл. 1). Таким образом, выявлены критические периоды гибели нервных клеток при действии гипоксии – 1 и 7 сутки после гипоксического воздействия. Первый этап, вероятно, связан с развитием митохондриальной дисфункции, второй этап связан с развитием эксайтотоксичности, вторичным повреждением клеток и развитием апоптоза. Повреждающее действие комплексного моделирования ишемия-подобных условий достоверно (ANOVA, р <0,05) более выражено, чем влияние каждого из факторов ишемии в отдельности.

Таблица 1.

Экспериментальная группа	Период после воздействия, сутки				
	1	3	7		
Интактная	4,95±0,83	5,65±1,16	6,32±2,26		
Гипоксия	24,72±1,99*	28,78±3,14*	49,55±3,72*		
Гипоксия + BDNF	6,78±2,7#	10,86±3,01#	12,98±4,8#		
Гипоксия +GDNF	7,07±1,39#	9,43±2,1#	11,12±3,21#		
$\Gamma$ ипоксия + BDNF + GDNF	7,93±1,34#	13,57±2,83*#	17,41±3,58*#		
ГД	15,93±2,12*	26,04±3,13*	59,36±1,94*		
ГД + BDNF	5,72±2,66#	10,28±4,75#	19,78±4,39*#		
ГД + GDNF	6,51±0,62#	8,56±0,48#	14,56±5,27#		
ГД +BDNF + GDNF	7,67±2,19#	13,88±2,53*#	22,06±4,12*#		
OC	12,95±1,18*	38,39±2,09*	54,26±5,61*		
OC + BDNF	8,42±2,25#	16,29±4,46*#	18,54±5,73*#		
OC + GDNF	4,56±1,41#	5,84±0,61#	8,21±3,61#		
OC + BDNF + GDNF	7,32±2,6#	17,48±2,94*#	17,23±5,88*#		
Ишемия	45,08±3,41*	61,24±4,65*	85,48±3,24*		
Ишемия+ BDNF	14,57±2,85*#	22,44±4,36*#	31,77±4,24*#		
Ишемия+ GDNF	18,29±4,39*#	26,95±4,14*#	38,51±6,83*#		
Ишемия+ BDNF + GDNF	12,56±4,66*#	21,38±2,87*#	28,48±4,73*#		

## Процент мертвых клеток в первичных диссоциированных культурах клеток гиппокампа после моделирования факторов ишемии.

\* - статистически достоверные отличия от группы «Интактная», # - статистически достоверные отличия от соответствующей контрольной группы («Гипоксия», «ГД», «ОС» или

«Ишемия»), р <0,05; N=9, ANOVA, post-hoc критерий Бонферрони (Митрошина с соавт. // БЭБиМ, 2019).

Проведенный анализ эффектов, оказываемых нейротрофическими факторами показал, что применение как BDNF (1нг/мл), так и GDNF (1 нг/мл), а также их сочетанное применение приводит к достоверному снижению числа мертвых клеток в культуре при моделировании всех изолированных факторов ишемии и их комбинированном действии.

Показано, что различные нейротрофические факторы отличаются по эффективности защитного действия при моделировании различных ишемических факторов. Превентивное применение BDNF демонстрирует наиболее выраженный эффект при моделировании нормобарической гипоксии и ишемия-подобных условий (7 день после воздействия «Интактные» 6,32±2,26%, «Гипоксия» 49,55±3,72%, «Гипоксия + BDNF» 12,98±4,8%, «Ишемия» 85,48±3,24%, «Ишемия + BDNF» 31,77±4,24% мертвых клеток). Нейропротективный эффект GDNF наиболее выражен при воздействии глюкозной депривации и окислительного стресса. В группе «OC+GDNF» процент мертвых клеток на 7 день после моделирования окислительного стресса составил всего 8,21±3,61%, что не отличается от показателей группы «Интактная».

Защитный эффект сочетанного применения нейротрофических факторов при моделировании ишемия-подобных условий сопоставим с эффектом применения BDNF, однако при действии изолированных повреждающих факторов ишемии менее выражен, чем при использовании каждого из нейротрофинов в отдельности, что может свидетельствовать об антагонистических отношениях исследуемых нейротрофинов.

Влияние нейротрофических факторов на морфофункциональную структуру первичных культур гиппокампа при моделировании гипоксии *in vitro*. На следующем этапе работы было проведено комплексное сравнительное исследование влияния BDNF и GDNF на морфофункциональное состояние нейрон-глиальных сетей при воздействии ключевого фактора ишемии – кислородной депривации. Именно гипоксия играет ключевую роль в патогенезе ишемического повреждения, а также множества неврологических расстройств, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и других возрастных нейродегенеративных заболеваний, а также эпилепсии и др. (Burtscher et al., 2021). Кроме того, гипоксия индуцирует вторичные повреждения ткани мозга, ведет к развитию эксайтотоксичности, а также развитию нейровоспаления за счет активации микроглии, увеличению количества активных форм кислорода и провоспалительных цитокинов.

Для изучения влияния нейротрофических факторов на ультраструктурные изменения нейрон-глиальных сетей первичных культур гиппокампа через сутки после моделирования острой гипоксии были проведены электронно-микроскопические исследования (рис. 3). В норме в культурах на 15 DIV наблюдаются многочисленные зрелые химические синапсы с преобладанием аксо-дендритных и аксо-шипиковых контактов (рис. 4а). Кристы в митохондриях хорошо визуализируются (рис. 36, 3в). Основной пул синаптических контактов составляют везикулярные симметричные и ассиметричные аксошипиковые и аксо-дендритные контакты (рис. 3а). Воздействие гипоксии приводит к морфологической деструкции нейрон-глиальных сетей, визуализируется большое количество клеток с разрушенными органеллами. В частности, кристы митохондрий, располагающихся в телах нейронов, не только изменяли свою конформацию, но и их количество существенно снижалось относительно интактной группы. В отростках нервных клеток отмечено появление митохондрий с утолщенной мембраной, измененной формой или полностью разрушенных, что свидетельствует о нарушениях в энергетическом снабжении клеток (рис. 3г, 3д, 3е). Среди синаптических везикул встречаются синаптические пузырьки с двойной мембраной. Количество аксональных бутонов с такими везикулами в группе "Гипоксия" возросло на 23,47% (рис. 4в). Количество зрелых синаптических контактов в группе «Гипоксия» было достоверно ниже значений интактной группы на 79,67±12,14 %. (рис. 4а).



Рис. 3. Репрезентативные электронно-микроскопические изображения первичных культур клеток гиппокампа на первые сутки после моделирования острой нормобарической гипоксии. (а-в) Интактные, (г-е) Гипоксия, (ж-и) Гипоксия+BDNF, (к-м) Гипоксия+GDNF. a) Ассиметричные везикулярные аксо-шипиковые и аксо-дендритные синапсы. Митохондрии в постсинаптической терминали интактной структуры, везикулы в аксональном бутоне имеют одинаковые размеры и осмиофильность, глиальные отростки заполнены осмиофильными гранулами. б) Аксо-дендритный синапс, митохондрия умеренной осмиофильности, множество крист, большое количество рибосом. в том числе на эндоплазматической сети, в) Митохондрии в теле клетки, множество рибосом, в том числе на гранулярной эндоплазматической сети, г) Везикулярные ассиметричные аксо- шипиковые контакты с вогнутой поверхностью, в отростках виднеются вакуоли, от разрушенных митохондрий, оболочка от пустого глиального отростка, д) Митохондрии в нейрональных отростках неправильной формы, в одном аксоне видна осмиофильная везикула с дополнительной оболочкой среди синаптических везикул, е) Разрушенная митохондрия в теле клетки - полное разрушение внутренней структуры, ж) Ассиметричные аксо-шипиковые контакты с хорошо выраженным постсинаптическим уплотнением, з) Митохондрии в теле клетки, имеются митохондрии с измененной внутренней структурой, множество рибосом, и) Аксо-шипиковые и аксо-дендритные контакты, набухшая митохондрия в дендрите, к) Аксо-шипиковый ассиметричный перфорированный контакт, глиальный отросток с осмиофильными гранулами, л) аксо- шипиковый и аксо-дендритный перфорированные контакты, митохондрия в аксоне имеет измененную форму, м) Митохондрии с измененной структурой в различных отростках. а – аксон, в –вакуоль, гл - глиальный отросток, грЭС гранулярная эндоплазматическая сеть, д - дендрит, к - конус роста, КГ - комплекс Гольджи, м – митохондрия, р – рибосомы, ш – шипик, черная стрелка – зрелый химический синапс; масштаб – 0,5 мкм (по Mitroshina et al., 2019, Mishchenko et al., 2019).



Рис. 4. Морфометрические характеристики первичных культур гиппокампа после моделирования острой нормобарической гипоксии in vitro. А - количество зрелых синаптических контактов; Б - процентное соотношение зрелых синаптических контактов со слабой (желтый) и высокой (зеленый) осмиофильностью постсинаптического уплотнения, В - процентное соотношение аксональных бутонов с нормальными (голубой) и с измененными (фиолетовый) синаптическими везикулами. \* — статистически значимые различия с группой «Интактные»; # — с группой «Гипоксия», ANOVA, post-hoc критерий Бонферрони, р <0.05 (по Mitroshina et al., 2019, Mishchenko et al., 2019).

Выявлено, что превентивное применение нейротрофических факторов BDNF, GDNF способствует частичному сохранению ультраструктуры клеток первичных культур гиппокампа при гипоксическом воздействии. Эффект нейротрофического фактора GDNF заключался в сохранении количества зрелых синаптических контактов на уровне интактных культур (рис. 4а), в случае нейротрофического фактора BDNF – сохранение ультраструктуры митохондрий и синаптических везикул, частичном сохранении количества зрелых синаптических везикул, нейропротекторное действие исследуемых регуляторных молекул на синаптический аппарат нервных клеток опосредовано разными клеточными механизмами.

# Исследование потенциальных молекулярно-клеточных механизмов, посредством которых реализуются нейропротекторные эффекты нейротрофических факторов BDNF, GDNF.

Для выявления молекулярных механизмов защитного действия исследуемых нейротрофических факторов нами были исследованы магистральные каскады. активируемые рецепторами TrkB и GFRα, а также ряд дополнительных внутриклеточных путей. Ключевыми участниками этих метаболических каскадов являются внутриклеточные Наиболее изученными каскадами, реализующими киназы. защитное действие нейротрофинов, являются ERK- (MAPK/ERK) и PI3K- сигнальные пути. Нами была проанализирована роль ключевых представителей данных сигнальных каскадов в реализации нейропротекторного действия BDNF, GDNF. Также кроме киназ. принадлежность которых к каскадам, активируемым BDNF и GDNF была ранее подробно описана, нами были исследованы киназы, роль которых в реализации нейропротекторных эффектов нейротрофических факторов в настоящее время обсуждена еще недостаточно киназ eEF2K, SRC и IKKb. Эти киназы имеют общие звенья и точки пересечения с каскадами, активируемыми нейротрофическими факторами BDNF и GDNF и могут являться мишенями, реализующими их нейропротекторные эффекты.

Анализ жизнеспособности клеток в постгипоксическом периоде в контексте совместного применения нейротрофических факторов и ингибиторов ключевых киназ показал, что нейропротекторный эффект нейротрофического фактора BDNF обусловлен

активностью рецептора TrkB и реализуется как MAPK/ERK-, так и PI3K-сигнальными путями, а эффект GDNF обусловлен активностью ключевого компонента рецепторного комплекса - RET-киназой, и в основном связан с активностью киназ PI3K-сигнального пути что согласуется с литературными данными (Chen et al., 2013; Saklani et al., 2022; Yue et al., 2017). Данные о жизнеспособности первичных культур нервных клеток гиппокампа при ингибировании внутриклеточных киназ представлены в табл. 2.

#### Таблица 2

Ингибируемая киназа	Нормальные условия	Гипоксия	ипоксия + BDNF	
Контроль	96,15±2,31	72,33±5,61*	84,41±2,02*#	83,84±2,29*#
TrkB	95,39±0,34	62,71±4,21*§	72,69 ± 3.21*§	-
RET	86,06±1,61*	54,25±6,61*&	-	28,27±1,57*#&
RAF	90,38±1,48*	74,48±2,89*	68,27±3,96*§	80,09±2,18*
MAP2K1/2, Erk2, RAF1	94,35±0,76	79,03±3,64*	74,54±3,71*§	81,21±4,19#
MAP2K1/2	91,7±0,97	78,77±1,09*	70,98±4,16*§	84,38±3,84*#
AKT1	96,84±0,52	70,22±3,61*	68,51±4,45*§	77,96±2,02*#&
Jak1, Jak2	95,09±2,12	79,4±0,44	77,27±3,96*	75.22±5.61*&
eEF2K	92,42±1,22	84,54±2,01*#	82,45±2,14*#	74,76±2,32*&
SRC	85,94±0,69*	87,03±1,02#	83,85±1,65*#	82,91±2,35*#
IKKb	94,72±1,29	94,83±1,39#	72,65±2,09*§	82,96±2,12*#

Жизнеспособность клеток первичных культур гиппокампа при ингибировании внутриклеточных киназ на 7 сутки после моделирования гипоксии in vitro

\* - достоверные отличия по сравнению с интактной группой, # - достоверные отличия по сравнению с группой "Гипоксия", § - достоверные отличия по сравнению с группой "Гипоксия+BDNF", & - достоверные отличия по сравнению с группой "Гипоксия+GDNF" (p <0,05, ANOVA post-hoc критерий Бонферрони) (Mitroshina et al. // Ox. Med & Cell Longiv., 2019; Mitroshina et al. // Int J Mol Sci., 2021)

Показано, что блокада киназ Jak1, Jak2 и eEF2K нивелировала защитное действие GDNF, а киназы IKKb - BDNF. При этом блокада данных киназ при гипоксическом повреждении без применения нейротрофических факторов напротив поддерживала жизнеспособность культур клеток гиппокампа в постгипоксическом периоде. Таким образом, впервые выявлена роль указанных киназ в нейропротекторном эффекте нейротрофических факторов.

участвующих Далее для впервые выявленных киназ, в реализации нейропротекторного действия киназ BDNF и GDNF, было исследовано влияние на функциональную кальциевую активность первичных культур нейронов при моделировании гипоксии. Показано, что гипоксия снижает уровень кальциевой активности в культуре, приводя к достоверному уменьшению числа активных клеток и частоты возникновения кальциевых событий (табл.3). Применение обоих нейротрофических факторов сохраняло долю активных клеток на уровне интактных культур. Частота возникновения кальциевых событий при аппликации нейротрофических факторов была достоверно выше, чем в группе «гипоксия», однако ниже по сравнению с интактными культурами. Показано, что ингибирование киназ eEF2K и SRC нивелирует защитный эффект как для BDNF, так и для GDNF. Блокада киназы IKKb нивелировала защитное действие BDNF, а киназы Jak1, Jak2 – GDNF.

#### Таблица 3

Ингибируемая киназа	Процент клеток, проявляющих Ca <sup>2+</sup> активность	Процент клеток, проявляющих Ca <sup>2+</sup> Длительность, с активность	
Контроль	61,05±3,4	12,1±0,49	$1,42\pm0,04$
Гипоксия	35,91±1,05*	12,12±0,25	0,56±0,06*
Гипоксия + BDNF	54,25±5,34#	12,79±0,91	0,94±0,09*#
Гипоксия + BDNF + Jak1, Jak2	58,52±2,95#	13,33±0,56	0,76 ±0,04*
Гипоксия + BDNF + eEF2K	45,76±5,66*	11,64±0,25	0,63±0,09*
Гипоксия + BDNF + SRC	21,12±2,82*	17,21±1,49*#	0,4±0,11*
Гипоксия + BDNF + IKKb	30,88±3,42*	12,21±0,33	0,54±0,09*
Гипоксия + GDNF	50,38±2,49#	10,95±0,46	0,73±0,08*#
Гипоксия + GDNF + Jak1, Jak2	38,65±4,82*	16,23±0,86	0,51 ±0,02*
Гипоксия + GDNF+eEF2K	23,58±4,05*	10,75±0,21	0,87±0,1*
Гипоксия + GDNF + SRC	28,35±2,24*	16,28±3,95*	0,56±0,13*
Гипоксия + GDNF + IKKb	52,02±4,68*	12,16±0,59	0,59±0,05*

Основные параметры кальциевой активности клеток первичных культур гиппокампа на 7 сутки после моделирования гипоксии in vitro

\* - достоверные отличия по сравнению с интактной группой, # - достоверные отличия по сравнению с группой "Гипоксия", (p < 0.05, ANOVA post-hoc критерий Бонферрони) (по Mitroshina et al. // Ox. Med & Cell Longiv., 2019)

Анализ параметров связности нейрон-глиальной сети подтвердил сохранение динамической нейрон-глиальной сети в постгипоксическом периоде при аппликации нейротрофических факторов. Как видно на рис. 5, в интактных культурах наблюдается высокий уровень корреляции активности между клетками в культуре и развитая система функционально значимых связей. Гипоксия приводит к снижению числа клеток, активность которых синхронизована друг с другом. При аппликации BDNF и GDNF при моделировании гипоксии сохраняется уровень корреляции кальциевой активности между клетками, однако не происходит сохранения количества функционально значимых связей (рис. 6,7)



Рис. 5. Репрезентативные примеры изменения корреляционных сетей в постгипоксическом периоде, 21 DIV: А – ориентированный граф, где ребра графа представляют собой функционально значимые связи между клетками (уровень корреляции кальциевого сигнала ≥ 0,3); Б - зависимость корреляций спонтанных кальциевых осцилляций от расстояния между клетками, красными точками показаны соседние клетки, контактирующие сомами, синими точками – удаленные друг от друга пар клеток



Рис. 6. Реорганизация кальциевой активности нейрон-глиальной сети в первичных культурах гиппокампа в постгипоксическом периоде (21 DIV): А - средний уровень корреляции активности всех клеток; Б - средний уровень корреляции всех клеток; В - среднее количество функциональных связей на клетку; Г - процент коррелированных связей от общего числа возможных связей, \* - достоверные отличия по сравнению с «Интактной группой», р <0,05, тест Краскела-Уоллеса



Рис. 7. Реорганизация кальциевой активности нейрон-глиальной сети в первичных культурах гиппокампа в постгипоксическом периоде (21 DIV): А - средний уровень корреляции активности всех клеток; Б - средний уровень корреляции всех клеток; В - среднее количество функциональных связей на клетку; Г - процент коррелированных связей от общего числа возможных связей. \* - достоверные отличия по сравнению с «Интактной» группой», р <0,05, тест Краскела-Уоллеса

Блокада киназ eEF2K, SRC и IKKb на фоне аппликации нейротрофических факторов нивелировала их защитный эффект на сетевые параметры функциональной кальциевой активности, вызывая катастрофическое снижение числа функциональных связей между клетками. Уровень корреляции кальциевых сигналов как между соседними, так и между удаленными клетками при применении блокаторов всех исследуемых киназ был достоверно снижен относительно интактной группы и не отличался от параметров группы «Гипоксия» (рис. 6,7). Таким образом, нами были выявлены новые киназ-ассоциированные механизмы нейропротекторного действия нейротрофических факторов BDNF и GDNF.

Еще одним возможным аспектом реализации нейропротекторного действия факторов является их взаимодействие с системой нейротрофических фактора. индуцируемый гипоксией HIF-1. Данный белковый комплекс является ключевым регулятором ответа клетки на гипоксию. Концентрация его субъединицы HIF-1a ферментами семейства пролил-4-гидроксилазного домена (PHD), контролируется активность которых зависит от концентрации кислорода. Ингибирование данного фермента приводит к накоплению HIF-1a субъединицы и стабилизации транскрипционного комплекса. Следует отметить, что исследований, посвященных взаимосвязям сигнальных каскадов, активируемых BDNF и активацией комплекса HIF-1 на сегодняшний день сравнительно мало, а возможные взаимодействия GDNF и HIF-1 практически не исследованы. Нами было проведено исследование взаимного влияния экзогенного введения нейротрофических факторов на уровень экспрессии мРНК НІF-1a, а также оценено влияние ингибитора PHD Нейроадапт на уровень экспрессии мРНК нейротрофических факторов и их рецепторов через 24 часа после моделирования гипоксии методом реал-тайм ПЦР.

Показано. что экзогенное применение нейротрофических факторов В физиологических условиях не влияет на уровень экспрессии их мРНК в первичных культурах клеток гиппокампа (рис. 8А, Б). После воздействия острой гипоксии происходило достоверное увеличение синтеза мРНК нейротрофического фактора BDNF в 1,9 раза, и GDNF в 1,74 раза, что следует расценивать как адаптационную реакцию организма. При превентивном применении нейротрофических факторов повышения уровня экспрессии мРНК нейротрофинов после эпизода гипоксии не происходило. Более того, при применении BDNF (1нг/мл) отмечалось достоверное снижение экспрессии мРНК BDNF и GDNF как относительно группы «Контроль гипоксия», так и «Контроль нормальные условия» (рис. 8).



Рис. 8. А - Оценка изменения уровня экспрессии мРНК BDNF, Б - Оценка изменения уровня экспрессии мРНК GDNF, В - Оценка изменения уровня экспрессии мРНК HIF-1a в клетках первичных культур гиппокампа через 24 часа после моделирования гипоксии. Данные нормализованы относительно контрольной группы в нормальных условиях, в качестве референсного гена использован Oaz1. \* - различия достоверны относительно группы «Контроль, нормальные условия» # - различия достоверны относительно группы «Контроль, с0.05, ANOVA, post-hoc критерий Бонферрони

Это может свидетельствовать об антагонистических отношениях между нейротрофинами и объяснять снижение нейропротекторного эффекта при их сочетанном использовании. При активации фактора HIF-1a с помощью Нейроадапта в постгипоксическом периоде экспрессия мРНК BDNF не изменялась, однако экспрессия мРНК GDNF достоверно увеличивалась, что свидетельствует об индукции фактором HIF-1а продукции глиального нейротрофического фактора.

Далее было оценено влияние нейротрофических факторов на уровень экспрессии мРНК НІF-1а в постгипоксическом периоде. Через 24 часа после моделирования гипоксии в контрольной группе, а также в группе с применением ингибитора PHD уровень экспрессии мРНК HIF-1a достоверно повышается относительно группы «Контроль нормальные условия» (рис. 8В). Показано, что в группах с аппликацией как BDNF, так и GDNF в постгипоксическом периоде изменения экспрессии мРНК HIF-1a не происходит. Таким образом, нейротрофические факторы подавляют экспрессию НІ**F**-1а в постгипоксическом периоде, что, возможно, объясняется тем, что HIF-1a является первой, быстрой фазой ответа клетки на снижение концентрации кислорода, а нейротрофические факторы – следующей ступенью адаптивного ответа, активация которой заканчивает действие первой фазы.

Также была оценена динамика экспрессии рецепторов BDNF и GDNF при воздействии острой нормобарической гипоксии. Выявлено, что гипоксия приводила к достоверному повышению уровня экспрессии мРНК TrkB-рецепторов в 1,52 раза, что является адаптационной реакцией организма. Важно отметить, что применения GDNF при гипоксии блокировало данную адаптационную реакцию (рис. 9А). При аппликации BDNF во время моделирования гипоксии увеличение экспрессии мРНК TrkB в постгипоксическом периоде сохранялось. Интересно отметить, что применение Нейроадапта не влияло на уровень экспрессии мРНК TrkB в нормальных условиях и предотвращало его увеличение в постгипоксическом периоде, что свидетельствует о взаимосвязи комплекса HIF-1a с основным рецептором зрелого BDNF. Рецептором, необходимым для реализации действия глиального нейротрофического фактора является рецепторный комплекс GFRα-RET. В нормальных условиях аппликация нейротрофического фактора BDNF не влияла на уровень продукции мРНК GFRα, а аппликация GDNF вызывала снижение уровня его экспрессии, что в целом может рассматриваться как сохранение гомеостатического баланса (рис. 9Б). В постгипоксическом периоде уровень экспрессии мРНК GFRa не изменялся во всех исследуемых группах.



Рис. 9. А – Оценка изменения уровня экспрессии мРНК тирозинкиназных рецепторов В типа, Б – Оценка изменения уровня экспрессии мРНК рецепторов GFRα в клетках первичных культур гиппокампа через 24 часа после моделирования гипоксии. Данные нормализованы относительно контрольной группы в нормальных условиях, в качестве референсного гена использован Oaz1. \* - различия достоверны относительно группы «Контроль, нормальные условия» # - различия достоверны относительно группы «Контроль, гипоксия»; р <0.05, ANOVA, роst-hoc критерий Бонферрони</p>

Первый этап работы убедительно показал, что оба исследуемых нейротрофических фактора обладают выраженным нейропротекторным действием при моделировании изолированных компонентов ишемического повреждения и комплексных ишемияподобных условиях in vitro, сохраняя жизнеспособность и морфофункциональную структуры нейрон-глиальных сетей. При этом BDNF более эффективно сохраняет жизнеспособность нервных клеток при гипоксическом повреждении и комплексе ишемияподобных условий. Кроме того, анализ литературных данных, свидетельствует о активации потенциальной онкогенности хронической RET-киназы, являющейся компонентом рецепторного комплекса GDNF (Mulligan, 2019). Это позволяет выбрать для разработки вирусного вектора увеличения экспрессии эндогенного для нейропротекторного соединения в качестве оптимального нейропротекторного агента нейротрофический фактор головного мозга BDNF.

Оценка влияния вектора AAV-BDNF-EGFP на морфофункциональную активность первичных культур клеток гиппокампа. С целью оценить возможное влияния повышенного уровня экспрессии BDNF на формирование паттерна функциональной активности нейрон-глиальных сетей было выполнено тестирование разработанного вектора AAV-Syn-BDNF-EGFP (рис. 10) в первичных культурах клеток гиппокампа. Экспрессия EGFP показана начиная с 4 суток от инфицирования и сохранялась на протяжение трех недель. С помощью иммуноцитохимического окрашивания было показано, что применение разработанного вектора для трансдукции первичных культур клеток гиппокампа мыши приводит к увеличению продукции BDNF клетками культуры (рис. 11).



Рис. 10. А – Карта плазмиды pAAV-Syn-BDNF-EGFP-kid2 (карта построена с помощью программы SnapGene Viewer 3.1.2), Б, В – Качественный анализ результатов ПЦР (Б) и рестрикции (В) методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Б: 1 – маркер длин ДНК, 2 – BDNF; В: 1 – Маркер длин, 2 – Рестрикция AAV-Syn-BDNF-EGFP ферментом EcoRI, 3 – Рестрикция AAV-Syn-BDNF-EGFP ферментами EcoRI и BamHI (по Митрошина с соавт., CTM, 2018)

Иммуноцитохимическое маркирование белка BDNF продемонстрировало, что в трансдуцированных культурах уровень экспрессии BDNF значительно повышается по сравнению с интактными культурами, что подтвердило работоспособность и высокую эффективность разработанного конструкта (рис. 11А). Показано отсутствие цитотоксичности разработанного вирусного вектора (рис. 11С).



Рис. 11. Иммуноцитохимическое маркирование белка BDNF в первичной культуре клеток гиппокампа, инфицированной вирусным вектором AAV-Syn-BDNF-EGFP. Красный канал – окрашивание антителами с флуоресцентной меткой Alexa647, зеленый канал – флуоресценция зеленого белка EGFP. А – интактная культура, Б – культура, инфицированная вирусом AAV AAV-Syn-BDNF-EGFP, 7 сутки после трансдукции, увеличение x40, С – оценка жизнеспособности первичных культур клеток гиппокампа после трансдукции вирусным вектором AAV AAV-Syn-BDNF-EGFP (по Mitroshina et al. // Int J Mol Sci, 2018)

Для оценки влияния воздействия разработанного вирусного конструкта на нейросетевую активность был проведен анализ основных параметров спонтанной биоэлектрической активности при инфицировании первичных культур гиппокампа AAV-Syn-BDNF-EGFP. Достоверных изменений инфицированных культур по сравнению с интактными культурами в ответ не выявлено. Отмечена тенденция к увеличению числа спайков в пачке в культурах, инфицированных AAV-Syn-BDNF-EGFP по сравнению с интактными на 13-15 DIV (рис. 12, A, B).

Однако следует отметить, что гиперэкспрессия BDNF оказывает воздействие на паттерн активации, увеличивая время распространения сигнала по сети на 21 DIV (время возникновения первого спайка в пачке у интактных культур составляет в среднем 5-10 мс, в группе культур инфицированных AAV-Syn-BDNF-eGFP 10-15 мс) (рис. 14 Б,Г). Следовательно, BDNF не обладает ярко выраженной нейротропной активностью, однако, при хроническом воздействии способен влиять на функциональную структуру нейронной сети.

Исследование нейропротекторных эффектов гиперэкспрессии BDNF при моделировании острой гипоксии in vitro. На следующем этапе нами было проведено комплексное исследование антигипоксических и нейропротекторных эффектов, оказываемых индуцированной AAV-Syn-BDNF-eGFP гиперэкспрессией BDNF в стрессусловиях в сравнении с хронической аппликацией рекомбинантного BDNF 1 нг/мл. Продемонстрировано, что трансдукция AAV-Syn-BDNF-eGFP поддерживает не только жизнеспособность клеток после повреждающего воздействия (табл. 4), но и сохраняет основные параметры биоэлектрической активности (число малых сетевых пачек импульсов и количество спайков в пачке) в постгипоксическом периоде вплоть до 7 суток после моделирования гипоксии (рис. 13).



Рис. 12. Спонтанная биоэлектрическая активность в первичных культурах клеток гиппокампа на 7, 14 и 21 сутки in vitro (DIV). (A, B) Количество спайков / 50 мс и растровые диаграммы спонтанной биоэлектрической активности в первичных культурах гиппокампа: (A) Интактные, (B) AAV-Syn-BDNF-EGFP; (Б, Г) репрезентативные примеры паттерна активации спонтанной биоэлектрической активности в первичных культурах гиппокампа: (Б) Интактные, (Г) АAV-Syn-BDNF-EGFP. Цветовая шкала – время появления спайков в сетевой малой пачке, регистрируемых с электродов, мс

#### Таблица 4.

Анализ жизнеспособности клеток в диссоциированных культурах гиппокампа в постгипоксический период (по Mitroshina et al. // Int J Mol Sci, 2018)

	Интактные Гипоксия Гипоксия+		Гипоксия+	Гипоксия+ ААV-
			BDNF I нг/мл	Syn-BDNF-EGFP
1 сутки после гипоксии	98,07±0,58	91,23±0,22*	97,21±0,43#	96,28±0,58#
3 сутки после гипоксии	95,34±0,81	81,23±4,34*	93,21±0,34#	90,13±0,99*#
7 сутки после гипоксии	91,39±1,34	70,46±5,14*	86,86±4,57#	91,75±1,51#

\* - статистически значимые отличия по сравнению с группой «Интактные», # - статистически значимые отличия по сравнению с группой «Гипоксия», р < 0,05, ANOVA, post-hoc критерий Бонферрони

Сравнение эффектов, оказываемых гиперэкспрессией BDNF и применением рекомбинантного BDNF на биоэлектрическую активность показало сходное влияние обоих способов применения нейротрофина. Показано, что гиперэкспрессия BDNF поддерживает сложную структуру нейронных сетей в постгипоксическом периоде. Сохраняется число связей, составляющих хабы, число хабов также сохраняется либо увеличивается (рис. 14). Также было продемонстрирована способность AAV-Syn-BDNF-EGFP частично нивелировать негативные эффекты гипоксии, оказываемые на кальциевую активность культур (табл.5). Таким образом, полученные данные, указывают на потенциальную возможность применения данного вирусного конструкта для генной терапии при состояниях, требующих длительного повышения уровня продукции нейротрофического фактора головного мозга.

#### Таблица 5.

Основные параметры спонтанной кальциевой активности в первичных культурах гиппокампа в постгипоксический период

Параметр	Интактные	Гипоксия	Гипоксия + AAV-Syn-
			BDNF-EGFP
Количество работающих клеток, %	97,66±1,47%	35,58±5,46%*	65,14±5,27%*#
Длительность Ca2+ осцилляций, с	6,23±0,16	7,17±0,28*	5,87±0,9
Частота Ca2+ осцилляций, осц/мин	6,9±0,31	1,24±0,134*	5,84±0,28*#

\* - статистически значимые отличия по сравнению с группой «Интактные», # - статистически значимые отличия по сравнению с группой «Гипоксия», р < 0,05 (ANOVA)



Рис. 13. Число спайков / 50 мс и растровые диаграммы спонтанной биоэлектрической активности в первичных культурах гиппокампа во время гипоксии и в постгипоксическом периоде: А - гипоксия, В - гипоксия + BDNF, С - гипоксия + AAV-Syn-BDNF-EGFP. Вверху –

число спайков за 50 мс, внизу – растровая диаграмма спонтанной биоэлектрической активности (по Mitroshina et al. // Int J Mol Sci, 2018)



Рис. 14. Функциональные перестройки нейронных сетей в постгипоксическом периоде (15 DIV) (модифицировано из Mitroshina et al., Int J Mol Sci, 2019)

Роль BDNF в сохранении функциональной целостности нейронных сетей при моделировании  $\beta$ -амилоидопатии in vitro. Болезнь Альцгеймера (БА) – наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание, частота встречаемости которого неуклонно растет. Однако в настоящее время не существует эффективного метода коррекции нейродегенеративных явлений при БА. Нейродегенеративные заболевания ассоциированы со снижением уровня продукции нейротрофических факторов клетками головного мозга. Известно, что при БА значительно снижен уровень BDNF (Ibrahim et al., 2022). Несколько исследований показали, что передача сигналов BDNF/TrkB играет важную роль в процессинге амилоида (Wang et al., 2019). Это делает BDNF перспективным кандидатом для разработки подходов к коррекции деменции, вызванной БА. Кроме того, гипоксия играет значимую роль в индукции развитии болезни Альцгеймера (Zhang et al., 2018; Nucera et al., 2018), что также позволяет предположить возможную роль BDNF в поддержании синаптической передачи и функционирования нейроных сетей при БА.

Разработано несколько экспериментальных моделей болезни Альцгеймера *in vitro*. Первой является модель с использованием клеток гиппокампа, полученных от 5xFAD. Выраженных отличий в морфологии клеточных культур, полученных из мутантных эмбрионов, от контрольных культур выявлено не было. Также не было обнаружено

снижения жизнеспособности клеток первичных культур гиппокампа, полученных от эмбрионов линии 5xFAD. Однако, несмотря на отсутствие морфологических изменений и повышенного накопления  $\beta$ -амилоида (A $\beta$ ) в культурах клеток гиппокампа мышей линии 5xFAD, нами были выявлены особенности формирования их функциональной кальциевой активности, проявляющееся в уменьшении количества клеток, генерирующих кальциевые осцилляции, начиная с 21 дня культивирования, а также снижении частоты и увеличении длительности кальциевых осцилляций (табл. 6).

#### Таблица 6.

Основные параметры спонтанной кальциевой активности в первичных культурах гиппокампа мышей линии 5хFAD

П	Контроль (дикий тип)				5xFA	AD
День культивирова ния	Активн ые клетки,	Частота Са <sup>2+</sup> событи й, осц./мин	Длительно сть Са <sup>2+</sup> событи	Активны еклетки, %	Частота Са <sup>2+</sup> событий,	Длительност ь Са <sup>2+</sup> событий
	<b>%</b> 0		И, С		осц./мин	, c
14 DIV	81,09±4,38	$0,69\pm0,05$	$12,3\pm0,87$	$60,2\pm10,12$	$0,57\pm0,09$	14,02±1,94
21 DIV	78,2±10,02	$0,97{\pm}0,07$	10,79±0,3	44,3±7,02*	0,58±0,11*	17,58±0,85*
28 DIV	65,1±4,6	$1,32\pm0,23$	9,45±0,76	35,5±7,91*	0,72±0,18*	15,02±2,1*

\* - статистически значимые отличия по сравнению с группой «Контроль, р < 0,05, ANOVA, post-hoc критерий Бонферрони

Полученные данные об угнетении функциональной кальциевой активности нейронных сетей в культурах, полученных от эмбрионов мышей линии 5xFAD, представляют большой интерес, поскольку предложенная модель может являться способом оценки функциональных изменений и выявления механизмов реорганизации нейронных сетей на самых ранних этапах семейной формы БА. Однако с целью исследования влияния амилоидопатии данную экспериментальную модель использовать невозможно.

Также нами разработана *in vitro* модель β-амилоидопатии, основанная на аппликации в культуральную среду синтетического АВ 1-42. Были протестированы два протокола моделирования амилоидопатии *in vitro*, основанные на острой однократной и хронической аппликации фибриллярной формы АВ 1-42. Оценка жизнеспособности культур показала, что только хроническое введение АВ приводит к достоверному снижению процента жизнеспособных клеток и выраженному угнетению кальциевой исследования влияния гиперэкспрессии активности. поэтому для **BDNF** на функционирование нейронных сетей при БА была выбрана именно эта модель. Для оценки потенциального влияния самого векторного конструкта был использован вектор AAV-Syn-EGFP, несущий только флуоресцентный белок и не несущий ген BDNF.

Иммуногистохимически показано формирование конгломератов амилоида при хронической, но не при острой аппликации А $\beta$  (рис. 15). Также продемонстрировано, что хроническая амилоидопатия приводит к резким деструктивным изменениям нейрональной кальциевой активности (рис. 16 Б-Г). Поэтому на данной модели было исследовано влияние различных форм применения нейротрофического фактора BDNF на изменения функциональной нейросетевой активности при амилоидопатии. Продемонстрировано нейропротекторное действие нейротрофического фактора головного мозга BDNF при нейродегенеративных процессах, индуцированных  $\beta$ -амилоидом. Применение BDNF как в форме рекомбинантного белка, так и его гиперэкспрессия с помощью аденовирусного вектора поддерживает жизнеспособность клеток (рис. 16А) и спонтанную кальциевую активность в культурах клеток гиппокампа. Выявлено достоверное снижение частоты осцилляций и увеличения длительности кальциевых осцилляций на 21 DIV, вызванное хронической аппликацией А $\beta$  (рис. 16). При этом в группах "AB+BDNF" и "AB+AAV-SynBDNF" частота осцилляций была выше чем в группе "Аβ" (14 DIV - 3,06± 0,029 осц/мин, 1,94± 0,17 и 0,41±0,09 осц/мин соответственно). Данный эффект сохранялся вплоть до 28 DIV. Следует отметить, что длительность осцилляций в группах с применением BDNF на 28 день культивирования не отличалась от интактной группы.



Рис. 15. Иммуноцитохимическое маркирование Аβ в первичных культурах клеток гиппокампа на 28 DIV. Красный канал – βIII тубулин, желтый канал – β-амилоид. А – интактные культуры, В – первичные культуры с однократной аппликацией Аβ, С – первичные культуры с хронической аппликацией Аβ (Mitroshina et al. // Front. Cell. Dev. Biol., 2020)

Далее был выполнен анализ основных параметров связности, характеризующих воздействие гиперэкспрессии BDMF на кальциевую динамику в нейрон-глиальных сетях при моделировании амилоидоза. Построение корреляционных графов показало, что на 21 DIV при хронической аппликации  $\beta$ -амилоида практически отсутствуют взаимосвязанные сигналы между отдаленными клетками (рис. 16). При применении экзогенного рекомбинантного BDNF в группе « $\beta$ A + BDNF» уровень скоррелированности коллективной кальциевой динамики остался на прежнем уровне сравнимым с группой контроля (все клетки в культуре 0,61 [0,58; 0,66], соседние клетки 0,74 [0,72; 0,79]). Уровень корреляции кальциевых сигналов в группе « $\beta$ A+AAV-BDNF-eGFP» отмечается снижение скоррелированности сетевой активности относительно уровня интактной группы, однако достоверно выше, чем в группе « $\beta$ A» (все клетки в культуре 0,47 [0,46; 0,55], соседние клетки 0,58 [0,55; 0,6]).



**Рис. 16.** А - Анализ жизнеспособности клеток в первичных культурах клеток гиппокампа при экзогенном введении рекомбинантного Аβ и BDNF. (B–D) Основные параметры спонтанной кальциевой активности в первичных культурах клеток гиппокампа при хроническом экзогенном

воздействии Аβ и BDNF в процессе развития in vitro. (В) Доля клеток, проявляющих Ca2+ активность; (С) число колебаний Ca2+ в минуту; (D) длительность Ca2+ событий, с. \* - различия достоверны по сравнению с «Интактные», # по сравнению с «Аβ», р < 0,05, ANOVA (Mitroshina et al. // Front. Cell. Dev. Biol., 2020).



Рис. 17. А - Репрезентативные примеры изменения корреляционных сетей при хронической аппликации β-амилоида, 21 DIV: белыми линиями (ребра графа) соединены клетки, уровень корреляции активности которых ≥ 0,3. Б - Зависимость корреляции спонтанных кальциевых осцилляций от расстояния между клетками, красными точками показаны соседние клетки, контактирующие сомами, синими точками – удаленные друг от друга пар клеток.

Также выполнено исследование биоэлектрической сетевой активности. Показано, что формирование амилоидных конгломератов приводит к нарушению формирования нейросетевой активности при развитии первичных культур гиппокампа, а именно к снижению количества сетевых пачек импульсов, снижению числа спайков в пачке, а также к нарушению пространственной структуры нейронной сети и уменьшению количества ключевых активных элементов сети - хабов, и числа связей, соединяющих элементы сети (рис. 18, табл. 7).



**Рис. 18.** Количество спайков за 50 мс (сверху) и характерные растровые диаграммы спонтанной биоэлектрической активности первичных культур клеток гиппокампа на фоне хронического применения β-амилоида, 21 DIV (Mitroshina et al. // Front. Cell. Dev. Biol., 2020).

#### Таблица 7

Основные параметры спонтанной биоэлектрической активности первичных культур клеток гиппокампа на фоне хронической аппликации β-амилоида

1. Ronu ecinoo mune	πλ εεπτεθοίλ πα чек/3	мин		
День	Интактные	β-амилоид	Aβ+BDNF	Aβ+AAV-syn-BDNF
культивирования				
14 DIV	163,2±28,5	112,8±31,92	142,1±32,21	97,6±35,43
21 DIV	217,5±35,8	74,3±20,8*	131,8±23,54*#	117,9±24,29*
28 DIV	253,7±41,3	50,1±14,71*	175,5±35,2#	147,3±42,3*#
Б. Количество спай	ков в малой сетево	й пачке		
День	Интактные	β-амилоид	Aβ+BDNF	Aβ+AAV-syn-BDNF
культивирования				
14 DIV	382,7±56,9	149,1±42,2*	163±31,48*	172±51,2*
21 DIV	189,5±34,7	68,1±13,2*	157±40,2#	164±38,4#
28 DIV	$238.5\pm24.6$	136.1±31.9*	187.2±39.6#	200.4±47.2#

В. Количество больших сетевых пачек/ 10 минут в первичных культурах клеток гиппокампа на фоне хронической аппликации В-амилоида

День культивирования	Интактные	β-амилоид	Aβ+BDNF	Aβ+AAV-syn-BDNF
14 DIV	12,5±8,3	0*	0	0
21 DIV	17,9±5,8	0*	10,2±5,3	15,1±4,9
28 DIV	15,4±4,3	22±4,7	13,1±4,8	16,5±4,2

\* - значения достоверны относительно группы «Интактные»; # - значения достоверны относительно группы «Гипоксия», § - значения достоверны относительно 3 суток постгипоксического периода, p<0.05, repeated ANOVA (Mitroshina et al. // Front. Cell. Dev. Biol., 2020).

Применение BDNF позволяло частично предотвратить снижение уровня спонтанной биоэлектрической активности. Количество малых сетевых пачек на 21 DIV в группе

«Аβ+BDNF» было достоверно выше, чем в группе «β-амилоид». Количество спайков в пачке в группах «Аβ+BDNF» и «Аβ+AAV-syn-BDNF» не отличалось от показателей интактных культур. В культурах с добавлением Аβ большие сетевые пачки на 14 и 21 DIV полностью отсутствовали, и были зарегистрированы только на 28 DIV. При применении нейротрофического фактора головного мозга как в виде рекомбинантного белка, так и в форме вирусного вектора, большие сетевые пачки возникали в культурах на 21 DIV.

Выявлено, что хроническая  $\beta$ -амилоидопатия приводит к нарушению формирования внутренней структуры нейронной сети уже на 14 DIV. Наблюдается уменьшение числа связей между элементами сети в 5 раз (табл. 8). Упрощение сети продолжается по мере культивирования нервных клеток при хроническом применении  $\beta$ -амилоида, на 21 день культивирования происходит практически полная потеря активных центров, не отмечается элементов, формирующих 10 и более связей с соседними, к 28 дню культивирования сетевая активность практически полностью прекращается. В культурах с хронической аппликацией рекомбинантного BDNF и гиперэкспрессией BDNF, индуцированной аденоассоциированным вирусным вектором, формировалась сложная мультицентровая архитектура нейрональной сети. Отмечалось сохранение активных центров на протяжение всего срока культивирование. Число связей на активных элементах- хабах не отличалось от значений интактных культур (табл. 8).

Таблица 8.

День	Интактные	β-амилоид	Aβ+BDNF	Aβ+AAV-Syn-BDNF-eGFP
культивирования				
14 DIV	11,2±2,8	2,2±1,6*	12,4±3,2#	8,9±2,8#
21 DIV	16,5±4,3	1,1±1,3*	12,25±4,1#	11,4±3,2#
28 DIV	12,6±3,9	0*	12,31±3,7#	13,5±4,6#

Среднее количество связей в хабах нейронной сети первичных культур гиппокампа в разные дни развития при моделировании β-амилоидопатии *in vitro*.

\* - различия достоверны относительно группы "Интактные" р <0.05; # - относительно группы "А $\beta$ " р < 0.05, repeated ANOVA (Mitroshina et al. // Front. Cell. Dev. Biol., 2020).

## Влияние модуляции системы фактора, индуцируемого гипоксией на адаптацию нервных клеток к действию гипоксии.

Поскольку нами была выявлена взаимосвязь системы нейротрофических факторов и системы транскрипционных факторов, индуцируемых гипоксией, мы исследовали влияние ингибирования фермента PHD, отвечающего за протеасомную деградацию субъединицы HIF-1a, на резистентность нейрон-глиальных сетей к гипоксическому повреждению. Показано, что используемый оригинальный ингибитор Нейроадапт в концентрациях от 0,5 мкМ до 20 мкМ не цитотоксичен и не влияет на жизнеспособность нервных клеток in vitro.

Мы использовали два протокола введения Нейроадапта – непосредственно при моделировании гипоксии и в период «терапевтического окна» через два часа после гипоксического воздействия и далее ежедневно до 7 дня постгипоксического периода. Аппликация ингибитора PHD в культуральную среду при моделировании гипоксии и сразу после нее в концентрациях 0,5 мкМ – 20 мкМ сохраняет жизнеспособность первичных нервных клеток гиппокампа достоверно выше по сравнению с группой «Гипоксия» и не отличается от интактных культур (табл. 9). При аппликации ингибитора PHD через 2 часа после гипоксии и далее ежедневно составила жизнеспособность нервных клеток гиппокампа была достоверно выше показателей группы «Гипоксия», однако ниже, чем в группе «Интактная».

#### Таблица 9.

Грудира	Жизнеспособ	Enverto	Жизнеспособн
i pynna	ность, %	i pyilla	ость, %
Интактные	91,24±0,75	Гипоксия	73,11±1,76*
Растворитель (ДМСО)	89,71±1,26	Гипоксия + ДМСО	81,29±3,82*
Гипоксия + Нейроадапт 0,5 µМ	91,21±1,97#	Гипоксия + Нейроадапт 10 µМ	89,37±2,37#
Гипоксия + Нейроадапт 1 µМ	89,55±1,75#	Гипоксия + Нейроадапт 15 µМ	92,67±0,49#
Гипоксия + Нейроадапт 5 µМ	90,43±1,73#	Гипоксия + Нейроадапт 20 µМ	92,78±1,13#
Гипоксия + Нейроадапт 1 µМ	<u>80 85+1 41* #</u>	Гипоксия + Нейроадапт 15 µМ	80 70+1 10* #
через 2 часа после	00,0 <i>3</i> ±1,41°, #	через 2 часа после	80,70±1,19*,#

Анализ жизнеспособности клеток в диссоциированных культурах гиппокампа в постгипоксический период (по Savyuk et al. //Anioxidants, 2020)

\* - достоверность различий по сравнению с интактной группой; # - достоверность различий по сравнению с группой "Гипоксия", р < 0,05, ANOVA, post-hoc критерий Бонферрони

Анализ кальциевой активности показал, что применение Нейроадапта во время моделирования гипоксии и сразу после нее сохраняла спонтанную кальциевую активность на уровне интактных культур по параметру числа клеток, проявляющих кальциевую активность (рис. 19). При аппликации ингибитора PHD в постгипоксическом периоде нейропротекторный эффект оказала только концентрация 15 мкМ. Гипоксическое воздействие в отдаленном периоде приводило к достоверному увеличению длительности кальциевых осцилляций сравнению с интактной группой, что может свидетельствовать о преобладании астроцитарной активности на фоне потери важных нейрональных функциональных компонентов сети. При аппликации ингибитора PHD в концентрации 15 мкМ как во время моделирования гипоксии, так и в постгипоксическом периоде наблюдается поддержание нормальной длительности кальциевых осцилляций.



**Рис.18.** Основные параметры кальциевой активности первичных культур гиппокампа на 7 сутки после моделирования гипоксии in vitro. А – Доля клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность, Б – Длительность кальциевых осцилляций, В – Частота кальциевых осцилляций. 1 – «Интактные», 2 – «Гипоксия», 3 – «Гипоксия + Нейроадапт 1 мкМ», 4 – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ», 5 – «Гипоксия + Нейроадапт 1 мкМ через 2 часа», 6 – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ через 2 часа», \* - достоверность различий по сравнению с группой «Гипоксия», р < 0,05, критерий Краскела-Уоллеса (по Savyuk et al., 2020).

Анализ сетевых характеристик кальциевой активности показал, что применение блокатора Нейроадапт в концентрации 15 мкМ во время моделирования гипоксии позволяет сохранить все показателей, характеризующих связанность сети достоверно выше, чем в группе «Гипоксия» (рис. 19). Однако, при применении ингибитора PHD в постгипоксическом периоде через 2 часа после воздействия повреждающего фактора и далее ежедневно сетевые характеристики в культурах клеток гиппокампа не отличались от соответствующих параметров в группе «Гипоксия».



Рис. 19. А -Е - Репрезентативные примеры изменения корреляционных сетей при хронической аппликации  $\beta$ -амилоида, 21 DIV: белыми линиями (ребра графа) соединены клетки, уровень корреляции активности которых  $\geq 0,3$ . А – «Интактные», Б – «Гипоксия», », В – «Гипоксия + Нейроадапт 1 мкМ», Г – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ», Д – «Гипоксия + Нейроадапт 1 мкМ через 2 часа», Е – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ через 2 часа», Ж – средний уровень корреляции кальциевой активности соседних клеток, З – среднее число функционально значимых связей на клетку. 1 – «Интактные», 2 – «Гипоксия», 3 – «Гипоксия + Нейроадапт 1 мкМ», 4 – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ через 2 часа», 6 – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ», 5 – «Гипоксия + Нейроадапт 1 мкМ через 2 часа», 6 – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ через 2 часа», 8 – «Сипоксия + Нейроадапт 1 мкМ через 2 часа», 6 – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ через 2 часа», 6 – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ через 2 часа», 6 – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ через 2 часа», 6 – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ через 2 часа», 6 – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ через 2 часа», 8 – «Сипоксия + Нейроадапт 10 мкМ через 2 часа», 6 – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ через 2 часа», 6 – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ через 2 часа», 6 – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ через 2 часа», 8 – достоверность различий по сравнению с интактной группой; # - достоверность различий по сравнению с интактной Краскела-Уоллеса (по Savyuk et al., 2020).

Также выполнено исследование влияния Нейроадапта на коллективные характеристики кальциевой активности при моделировании β-амилоидоза. Стабилизация комплекса HIF-1 при хроническом применении Нейроадапт (1 μM) поддерживает функциональную активность нейрон-глиальных сетей при моделировании β-амилоидоза. В группе «Аβ +Нейроадапт» уровень корреляции кальциевой активности и число функциональных связей между клетками не отличались от показателей интактных культур на 21 DIV.



Рис. 20. Основные параметры, характеризующие связность сети в первичных культурах клеток гиппокампа. А - Средний уровень корреляции  $Ca^{2+}$  активности всех клеток; Б - Средний уровень корреляции  $Ca^{2+}$  активности всех клеток; Б - Средний и уровень корреляции  $Ca^{2+}$  активности соседних клеток; В - Среднее число функциональных связей на одну клетку; Г - Процент скоррелированных связей от общего числа возможных связей, \* - достоверность различий по сравнению с интактной группой; # - достоверность различий по сравнению с с интактной группой; # - достоверность различий по сравнению с группой «Аβ», р < 0,05, критерий Краскела-Уоллеса

Таким образом, нами показано, что стабилизация комплекса HIF-1 с помощью селективного ингибитора HIF-пролилгидроксилазы. Нейроадапт позволяет сохранять жизнеспособность клеток и нейросетевую активность не только при превентивном применении, но и при использовании в постгипоксическом периоде, а также при моделировании β-амидлидоза.

#### Заключение

Проведенные исследования убедительно продемонстрировали, что нейротрофические факторы BDNF и GDNF обладают выраженным нейропротекторным действием при моделировании повреждающих факторов ишемии. Обнаружено, что эффективность их применения при различных стрессорных воздействиях различна. Это обусловлено различиями в молекулярных механизмах действия каждого ИЗ нейротрофических факторов. Выявлено, что BDNF оказывает наиболее выраженный защитный эффект при моделировании гипоксии и комплекса ишемия-подобных условий, что делает его чрезвычайно перспективной мишенью для повышения адаптационных возможностей нервной системы при сосудистых патологиях, травмах и развитии нейродегенеративных заболеваний, патогенетическим компонентом которых является гипоксия, например болезни Альцгеймера. Нейропротекторный эффект GDNF наиболее выражен при воздействии глюкозной депривации и окислительного стресса.

Впервые выполнено комплексное исследование возможных молекулярноклеточных механизмов действия нейротрофических факторов BDNF и GDNF. Исследована роль ключевых представителей нейронального кинома, входящих в магистральные и побочные метаболические каскады, активируемые исследуемыми регуляторными молекулами. Показано, что для обоих нейротрофических факторов ключевую роль играет активация PI3K/Akt – киназного пути, а в реализация действия BDNF значимую роль играет так же иMAPK/ERK киназный каскад. Впервые показана роль Jak / STAT киназного пути в реализации действия глиального нейротрофического фактора и киназы eEF2K, что, вероятно, объясняется ее участием в процессах синаптической пластичности (Suzuki & Monteggia, 2020). Киназа IKKb, напротив, участвует преимущественно в реализации защитного действия BDNF. Вероятным механизмом этого действия является участие этой киназы в активации комплекса транскрипционного фактора NF-кB (Sadek et al., 2020; Pordanjani & Hosseinimehr, 2016). Киназа SRC необходима для поддержания скоординированной кальциевой активности первичных культур гиппокампа.

Кроме того, нами показано негативное взаимодействие системы фактора HIF-1 и нейротрофических факторов BDNF, GDNF и их рецепторов. Стабилизация комплекса HIF-1 с помощью ингибитора HIF-пролилгидроксилазы предотвращает индуцированное гипоксией увеличение экспрессии мPHK обоих нейротрофических факторов, а также рецептора TrkB. В то же время при экзогенном применении как BDNF, так и GDNF не происходит индуцированного гипоксией увеличения уровня экспрессии HIF-1a.

Схема предполагаемого взаимодействия исследуемых биоактивных молекул представлена на рис. 20.



Рис. 20. Схема молекулярных каскадов, обуславливающих взаимодействие системы нейротрофических факторов и HIF-1

Поскольку BDNF проявлял наиболее выраженное нейротропное действие при гипоксии и при сочетанном действии факторов ишемии, было выполнено исследование влияния гиперэкспрессии BDNF, индуцированного аденоассоциированным вирусным вектором, на устойчивость нервных клеток к гипоксическому повреждению. Этот подход представляется значимым и перспективным, поскольку позволяет длительно увеличивать экспрессию целевого нейротрофина, что представляет интерес с точки зрения потенциальных методов коррекции гипоксического повреждения. Применение AAV-Syn-BDNF-EGFP также позволяло не только предотвратить гибель клеток в постгипоксическом периоде, но и поддерживало функциональную архитектуру нейронных сетей вплоть до 7 суток после моделирования гипоксии. Важно отметить, что при применении данного конструкта в нормальных физиологических условиях не наблюдалось выраженного

влияния на работу нейрон-глиальных сетей. Также были изучены особенности реорганизации активности нейрон-глиальных сетей при моделировании болезни Альцгеймера с использованием разработанных автором экспериментальных моделей. Показано, что хроническое повышение концентрации BDNF эффективно поддерживает нейросетевую активность при амилоидопатии. Полученные результаты указывают на перспективу исследования возможностей использования данного нейротрофического фактора в качестве эффективного агента для генной терапии хронических патологий ЦНС.

На заключительном этапе работы с показано, что стабилизация комплекса HIF-1 позволяет не только сохранить жизнеспособность и функциональную сетевую активность нервных клеток при применении данного соединения во время гипоксии, но поддерживать жизнеспособность и высокий уровень кальциевой активности нервных клеток при применении через 2 часа после гипоксического эпизода.

#### выводы:

- 1. Выявлены особенности действия BDNF и GDNF при моделировании изолированных факторов ишемии, а также моделировании ишемия-подобных условий. Показано, что применение нейротрофических факторов позволяет сохранять жизнеспособность клеток первичных культур гиппокампа на достоверно более высоком уровне по сравнению с группой «Гипоксия». BDNF обладает наибольшей эффективностью при кислородной депривации, а GDNF при субстратном голодании и окислительном стрессе. Применение исследуемых нейротрофинов позволяет поддерживать не только жизнеспособность нервных клеток, но и функциональную кальциевую и биоэлектрическую активность нейрон-глиальных сетей in vitro.
- 2. Выявлены новые киназ-опосредованные механизмы нейропротекторного действия нейротрофических факторов (BDNF и GDNF). Показано, что активность киназы IKKb необходима для реализации нейропротекторного действия BDNF. В реализации нейропротекторного действия GDNF участвует Jak/STAT киназный путь, а также киназа eEf2K. Охарактеризована роль киназы SRC в реализации эффектов, оказываемых обоими нейротрофическими факторами. Выявлено взаимное влияние нейротрофических факторов. Экзогенное применение GDNF (1нг/мл) подавляет индуцированное гипоксией увеличение экспрессию мPHK BDNF, а также снижает уровень экспрессии рецептора TrkB. Аппликация BDNF (1нг/мл) приводит к снижению экспрессии мPHK BDNF и GDNF при моделировании гипоксии.
- 3. Аппликация нейротрофических факторов BDNF и GDNF при моделировании гипоксии приводит к снижению уровня экспрессии HIF-1a. Стабилизация комплекса HIF-1a с помощью ингибирования HIF-пролилгидроксилазы селективным ингибиторов Нейроадапт приводит к увеличению экспрессии мPHK GDNF в постгипоксическом периоде.
- 4. Хроническая β-амилоидопатия приводит к значимому нарушению формирования кальциевой и биоэлектрической сетевой активности in vitro, в том числе снижению числа малых сетевых пачек импульсов и количества спайков в них, отставанию в формировании больших сетевых пачек, значительному упрощению функциональной архитектуры нейронных сетей, снижению уровня корреляции кальциевой активности между клетками.
- 5. Показано, что гиперэкспрессия BDNF, индуцированная AAV-Syn-BDNF-eGFP, позволяет эффективно поддерживать жизнеспособность клеток, а также функциональную активность нейронных сетей в моделях острой гипоксии и β-амилоидопатии in vitro.
- 6. Использование селективного ингибитора HIF-пролилгидроксилазы Нейроадапт позволяет сохранять жизнеспособность нервных клеток и нейросетевую активность при применении во время моделирования гипоксии и β-амилоидоза. Применение ингибитора Нейроадапт в постгипоксическом периоде сохраняет активность нервных

клеток и кальциевую активность в отдельных функциональных элементах нейронглиальной сети, но не коллективную синхронизированную кальциевую динамику.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ Работы, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК РФ, индексируемых в базах WoS и Scopus

1. Gavrish M., Urazov M., Mishchenko T., Turubanova V., Epifanova E., Krut' V., Babaev A., Vedunova M., **Mitroshina E.** Overexpression of Brain- and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factors Is Neuroprotective in an Animal Model of Acute Hypobaric Hypoxia // International Journal of Molecular Science. 2022. Vol. 23.

2. **Mitroshina E.,** Loginova M., Yarkov R., Urazov M., Novozhilova M., Krivonosov M., Ivanchenko M., Vedunova M. Inhibition of Neuronal Necroptosis Mediated by RIPK1 Provides Neuroprotective Effects on Hypoxia and Ischemia In Vitro and In Vivo // Int J Mol Sci. 2022. Vol. 23, № 2. P. 735.

3. Loginova M., Novozhilova M., Urazov M., Yarkov R., Krivonosov M., Kravchenko G., **Mitroshina E.**, Vedunova M. Effects of SRC and IKK $\beta$  Kinase Inhibition in Ischemic Factors Modeling In Vitro and In Vivo // Applied Sciences. 2022. Vol. 12, No 7. P. 3469.

4. **Mitroshina E.,** Mishchenko T., Lukovnikova L., Vedunova M. The Role Of MCT1 Transporters In The Implementation Of The Neuroprotective Effect Of Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor // Opera Med Physiol. 2022. Vol. 91, N 1. P. 31–41.

5. **Mitroshina E.,** Savyuk M. Vedunova M. Necroptosis in CNS diseases: focus on astrocytes // Front. Aging Neurosci. 2022, in press

6. **Mitroshina E.**, Pakhomov A., Krivonosov M., Yarkov R., Gavrish M., Ivanchenko M., Vedunova M. Novel approaches to studying the role of astrocytes in neuronal activity in Alzheimer's disease models // International Journal of Molecular Science. 2022. In press

7. Savyuk M.O., Krivonosov M., Ivanchenko M., Poloznikov A., **Mitroshina E**., Vedunova M. Network activity in primary hippocampal cultures upon HIF-prolyl hydroxylase inhibition // Izvestiya VUZ. Applied Nonlinear Dynamics. 2021. Vol. 29, № 3. P. 421–427.

8. **Mitroshina E.**, Loginova M., Savyuk M., Krivonosov M., Mishchenko T., Tarabykin V., Ivanchenko M., Vedunova M. Neuroprotective Effect of Kinase Inhibition in Ischemic Factor Modeling In Vitro // Int J Mol Sci. 2021. Vol. 22, № 4. P. 1885.

9. Mitroshina E., Savyuk M., Ponimaskin E., Vedunova M. Hypoxia-Inducible Factor (HIF) in Ischemic Stroke and Neurodegenerative Disease // Front Cell Dev Biol. 2021. Vol. 9.

10. **Mitroshina E.**, Krivonosov M., Burmistrov D., Savyuk M., Mishchenko T., Ivanchenko M., Vedunova M. Signatures of the Consolidated Response of Astrocytes to Ischemic Factors In Vitro // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21, № 21. P. 7952.

11. **Mitroshina E.**, Yarkov R., Mishchenko T., Krut' V., Gavrish M., Epifanova E., Babaev A., Vedunova M. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Preserves the Functional Integrity of Neural Networks in the  $\beta$ -Amyloidopathy Model in vitro // Front Cell Dev Biol. 2020. Vol. 8.

12. Savyuk M., Krivonosov M., Mishchenko T., Gazaryan I., Ivanchenko M., Khristichenko A., Poloznikov A., Hushpulian D., Nikulin S., Tonevitsky E., Abuzarova G., **Mitroshina E.,** Vedunova M. Neuroprotective Effect of HIF Prolyl Hydroxylase Inhibition in an In Vitro Hypoxia Model // Antioxidants. 2020. Vol. 9, № 8. P. 662.

13. Mishchenko T., Turubanova V., **Mitroshina E.,** Alzeibak R., Peskova N., Lermontova S., Klapshina L., Balalaeva I., Vedunova M., Krysko D. Effect of novel porphyrazine photosensitizers on normal and tumor brain cells // J Biophotonics. 2020. Vol. 13, N 1.

14. Shchelchkova N., Kokaya A., Bezhenar' V., Rozhdestvenskaya O., Mamedova M., Mishchenko T., **Mitroshina E.**, Vedunova M. The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Chronic Fetal Oxygen Deprivation // Sovremennye tehnologii v medicine. 2020. Vol. 12, № 1. P. 25.

15. **Mitroshina E.**, Mishchenko T., Loginova M., Tarabykin V., Vedunova M. Identification of Kinome Representatives with Neuroprotective Activity // Neurochemical Journal. 2020. Vol. 14,  $N_{0}$  4. P. 394–407.

16. Mishchenko T.A., **Mitroshina E.**, Usenko A., Voronova N., Astrakhanova T., Shirokova O., Kastalskiy I., Vedunova M. Features of Neural Network Formation and Their Functions in Primary

Hippocampal Cultures in the Context of Chronic TrkB Receptor System Influence // Front Physiol. 2019. Vol. 9.

17. **Mitroshina E.**, Mishchenko T., Shirokova O., Astrakhanova T., Loginova M., Epifanova E., Babaev A., Tarabykin V., Vedunova M. Intracellular Neuroprotective Mechanisms in Neuron-Glial Networks Mediated by Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor // Oxid Med Cell Longev. 2019. Vol. 2019. P. 1–15.

18. Mishchenko T., **Mitroshina E.**, Turubanova V., Alzeibak R., Balalaeva I., Vedunova M., Krysko D. Effect of Photosensitizers Photosens, Photodithazine and Hypericin on Glioma Cells and Primary Neuronal Cultures: a Comparative Analysis // Sovremennye tehnologii v medicine. 2019. Vol. 11, № 4. P. 52.

19. **Митрошина Е.В.,** Мищенко Т.А., Шишкина Т.В., Ведунова М.В. Роль нейротрофических факторов BDNF и GDNF в адаптации нервной системы к действию факторов ишемии // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2019. № 2. Р. 121–127.

20. **Mitroshina E.**, Mishchenko T., Shishkina T., Vedunova M. Role of Neurotrophic Factors BDNF and GDNF in Nervous System Adaptation to the Influence of Ischemic Factors // Bull Exp Biol Med. 2019. Vol. 167, № 4. P. 574–579.

21. Urazov M., Astrakhanova T., Usenko A., Mishchenko T., Schelchkova N., Kravchenko G., Vedunova M., **Mitroshina E**. New Aspects of Central Nervous System Adaptation to Prenatal Hypoxia // Sovremennye tehnologii v medicine. 2018. Vol. 10,  $N_{0}$  4. P. 60.

22. Astrakhanova T., Urazov M., Usenko A., **Mitroshina E.**, Mishchenko T., Schelchkova N., Vedunova M. BDNF-Mediated Regulation of the Brain Mitochondria Functional State in Hypoxia // Sovremennye tehnologii v medicine. 2018. Vol. 10, № 3. P. 88.

23. **Mitroshina E.,** Epifanova E., Mishchenko T., Yarkov R., Babaev A., Vedunova M. Application of the AAV-Syn-BDNF-EGFP Virus Vector as a Neuroprotective Agent in Modeling Hypoxia in vitro // Sovremennye tehnologii v medicine. 2018. Vol. 10,  $N_{0}$  2. P. 47.

24. Mishchenko T., **Mitroshina E.,** Kuznetsova A., Shirokova O., Khaydukov E., Savelyev A., Popov V., Zvyagin A., Vedunova M. Features of Primary Hippocampal Cultures Formation on Scaffolds Based on Hyaluronic Acid Glycidyl Methacrylate // Sovremennye tehnologii v medicine. 2018. Vol. 10, № 1. P. 103.

25. **Mitroshina E.,** Mishchenko T., Usenko A., Epifanova E., Yarkov R., Gavrish M., Babaev A., Vedunova M. AAV-Syn-BDNF-EGFP Virus Construct Exerts Neuroprotective Action on the Hippocampal Neural Network during Hypoxia In Vitro // Int J Mol Sci. 2018. Vol. 19, № 8. P. 2295.

26. Мищенко Т.А., **Митрошина Е.В.,** Шишкина Т.В., Ведунова М.В. Антиоксидантные свойства глиального нейротрофического фактора головного мозга // Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины. 2018. Vol. 166, № 8. Р. 257–260.

27. Мищенко Т.А., **Митрошина Е.В.**, Шишкина Т.В., Астраханова Т.А., Прохорова М.В., Ведунова М.В. Применение методики прижизненного детектирования экспрессии мРНК в сочетании с кальциевым имиджингом для исследования нейросетевой активности in vitro // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. 2018. № 2. Р. 104–114.

28. Mishchenko T., **Mitroshina E.**, Shishkina T., Vedunova M. Antioxidant Properties of Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) // Bull Exp Biol Med. 2018. Vol. 166, № 2. P. 293–296.

29. Shishkina T., Mishchenko T., **Mitroshina E.,** Shirokova O., Pimashkin A., Kastalskiy I., Mukhina I., Kazantsev V., Vedunova M. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) counteracts hypoxic damage to hippocampal neural network function in vitro // Brain Res. 2018. Vol. 1678. P. 310–321.

30. **Mitroshina E.,** Mishchenko T., Voronova N., Yarkov R., Asyutin D., Mishchenko M., Vedunova M. Endocannabinoid System Participates in Neuron-Glial Networks Adaptation to Modeled Ischemia Factors in vitro // Sovremennye tehnologii v medicine. 2017. Vol. 9, № 4. P. 66.

31. **Mitroshina E.,** Mitroshina E., Abogessimengane B., Urazov M., Hamraoui I., Mishchenko T., Astrakhanova T., Shchelchkova N., Lapshin R., Shishkina T., Belousova I., Mukhina I., Vedunova M. Adaptive Role of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Cerebral Ischemia // Sovremennye tehnologii v medicine. 2017. Vol. 9, № 1. P. 68.

32. Vedunova M., Mishchenko T., **Mitroshina E.**, Ponomareva N., Yudintsev A., Generalova A., Deyev S., Mukhina I., Semyanov A., Zvyagin A. Cytotoxic effects of upconversion nanoparticles in primary hippocampal cultures // RSC Adv. 2016. Vol. 6, № 40. P. 33656–33665.

33. **Mitroshina E.V.** Mishchenko T., Vedunova M., Yudintsev A., Generalova A., Nechaev A., Deyev S., Mukhina I., Zvyagin A. The Influence of Different Types of Upconversion Nanoparticles Surface Coatings on Neurotoxicity // Sovremennye tehnologii v medicine. 2016. Vol. 8, № 4. P. 133–142.

34. Ведунова М.В., Тимашев П.С., Мищенко Т.А., **Митрошина Е.В.**, Королева А.В, Чичков Б.Н., Панченко В.Я., Баграташвили В.Н., Мухина И.В. Формирование нейронных сетей на трехмерных матриксах, полученных методом лазерной микростереолитографии // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2016. № 2. Р. 138–144.

35. Ведунова М.В., Шишкина Т.В., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Астраханова Т.А., Пимашкин А.С., Мухина И.В. Нейропротективное И Антигипоксическое действие глиального нейротрофического фактора (GDNF) при моделировании гипоксии в культурах диссоциированных клеток гиппокампа // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2016. № 1. Р. 33–39.

36. Тимашев П., Бардакова К., Минаев Н., Дёмина Т., Мищенко Т., **Митрошина Е.,** Акованцева А., Королёва А., Асютин Д., Пименова Л., Коновалов Н., Акопова Т., Соловьёва А., Мухина И., Ведунова М., Чичков Б., Баграташвили В. Совместимость клеток нервной системы и структурированных биодеградируемых гидрогелевых матриц на основе хитозана // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Vol. 52, № 5. Р. 495–503.

37. Vedunova M., Timashev P., Mishchenko T., **Mitroshina E.,** Koroleva A., Chichkov B., Panchenko V., Bagratashvili V., Mukhina I. Formation of Neural Networks in 3D Scaffolds Fabricated by Means of Laser Microstereolithography // Bull Exp Biol Med. 2016. Vol. 161, № 4. P. 616–621.

38. Timashev P., Vedunova M., Guseva D., Ponimaskin E., Deiwick A., Mishchenko T., **Mitroshina** E., Koroleva A., Pimashkin A., Mukhina I., Panchenko V., Chichkov B., Bagratashvili V. . 3D in vitro platform produced by two-photon polymerization for the analysis of neural network formation and function // Biomed Phys Eng Express. 2016. Vol. 2, No 3. P. 035001.

39. Mishchenko T.A., Vedunova M., **Mitroshina E.,** Pimashkin A., Mukhina I. Neurotropic Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor at Different Stages of Dissociated Hippocampal Cultures Development in vitro // Sovremennye tehnologii v medicine. 2015. Vol. 7, № 3. P. 47–54.

40. Vedunova M., Mishchenko T., **Mitroshina E**., Mukhina I. TrkB-Mediated Neuroprotective and Antihypoxic Properties of Brain-Derived Neurotrophic Factor // Oxid Med Cell Longev. 2015. Vol. 2015. P. 1–9.

#### Патенты

1. Ведунова М.В., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Шишкина Т.В., Мухина И.В Способ частичного восстановления функциональной активности нейронных сетей in vitro в условиях их значительного повреждения. Патент на изобретение № 2594065 от 19.07.2016.

2. Носитель для трансплантируемых клеток для замещения дефекта, полученного при черепномозговой травме Тихобразова О.П., Балябин А.В., Мухина И.В., Тимашев П.С., Юсупов В.С., Понятовская А.П., Гладков А.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Мищенко Т.А.. Тихобразова О.П., Балябин А.В., Мухина И.В., Тимашев П.С., Юсупов В.С., Понятовская А.П., Гладков А.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Мищенко Т.А. Патент на изобретение № 2659842 от 27.12.2016.

3. Программа анализа флуоресцентного имиджинга для лабораторного использования с функционалом автоматического детектирования клеточной активности в монокультурах. Кривоносов М.И., Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Иванченко М.В. Свидетельство на программу ЭВМ № 2021612870 от 25.02.2021.

4. Программа для обработки сигнала кальциевой интенсивности и поиска кальциевых событий в культурах нейроглии для отдельных клеток на основе экспоненциального скользящего среднего. Кривоносов М.И., Пахомов А.М., Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Иванченко М.В. Свидетельство на программу ЭВМ № 2022667691 от 23.09.2022.

5. Программа для построения и анализа динамических сетей передачи кальция между нейроглиальными клетками на основе данных флуоресценции клеток. Кривоносов М.И., Пахомов А.М., Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Иванченко М.В. Свидетельство на программу ЭВМ № 2022667580 от 22.09.2022.

6. Программа автоматического детектирования контуров ядер клеток и подсчета соотоношения живых и мертвых клеток на основе изображений флуоресцентного имиджинга. Кривоносов М.И., Тихомиров С.Н., Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Иванченко М.В. Свидетельство на программу ЭВМ № 2022668038 от 29.09.2022.

#### Также опубликовано более 100 тезисов в материалах конференций