

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

**«Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»**

На правах рукописи

ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА МИТРОШИНА

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

1.5.5 – физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:
доктор биологических наук,
профессор Ведунова Мария Валерьевна

Нижегород – 2022

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	21
1.1. Ключевые повреждающие факторы ишемического повреждения головного мозга.....	21
1.1.1. Гипоксия как компонент патогенетического комплекса ишемического повреждения головного мозга	23
1.1.2. Дефицит энергетических субстратов.....	28
1.1.3. Окислительный стресс	31
1.1.4. Нейрон-глиальные сети при ишемическом повреждении.....	35
1.1.4.1. Нейрон-глиальные сети и их морфофункциональные характеристики.....	35
1.1.4.2. Влияние ишемии на функционирование нейрон-глиальных сетей.....	44
1.2. Нейродегенеративные заболевания и ишемическое повреждение. Болезнь Альцгеймера.....	48
1.2.1. Гипоксия как триггер развития болезни Альцгеймера	48
1.2.2. Патогенетические особенности болезни Альцгеймера	50
1.2.3. Астроциты и их роль в патогенезе БА.....	58
1.2.4. Кальциевая сигнализация нервных клеток при болезни Альцгеймера	63
1.2.5. Экспериментальные модели болезни Альцгеймера.....	66
1.3. Эндогенные регуляторные системы мозга.....	71
1.3.1. Система нейротрофических факторов.....	71
1.3.1.1. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF).....	72

1.3.1.2. Глиальный нейротрофический фактор (GDNF).....	81
1.3.1.3. Применение нейротрофических факторов в нейропротекции..	85
1.3.2. Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF) в физиологии нервной системы	98
1.3.2.1. Строение и основные функции индуцируемого гипоксией фактора.....	99
1.3.2.2. Нейропротекторная роль HIF-1 при ишемическом повреждении.....	103
1.3.2.3. Негативные эффекты, оказываемые HIF-1 при ишемии.....	108
1.3.2.4. Нейропротекторная роль HIF-1 при нейродегенеративных заболеваниях.....	110
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	116
2.1. Объект исследования.....	116
2.2. Схема и объем экспериментов.....	116
2.3. Методы культивирования клеточных культур	118
2.3.1. Культивирование первичных культур клеток гиппокампа	118
2.3.2. Культивирование первичных культур клеток гиппокампа, полученных от мышей 5xFAD.....	119
2.4. Оценка жизнеспособности клеток в диссоциированных культурах ...	121
2.5. Исследование спонтанной биоэлектрической активности первичных культур клеток гиппокампа	121
2.5.1. Регистрация спонтанной биоэлектрической активности первичных культур клеток гиппокампа	121
2.5.2. Детекция спайков и малых сетевых пачек	123
2.5.3. Метод кросс-корреляционного анализа и сетевых графов.....	123
2.6. Исследование спонтанной кальциевой активности первичных культур нервных клеток.....	124

2.6.1. Функциональный кальциевый имиджинг	124
2.6.2. Анализ сетевых характеристик кальциевой динамики в культурах клеток	125
2.7. Иммуноцитохимическое маркирование клеточных структур.	129
2.8. Электронно-микроскопический метод исследования ультраструктуры диссоциированных культур	130
2.9. Полимеразная цепная реакция в реальном времени	131
2.10. Получение аденоассоциированного вирусного вектора AAV-Syn-BDNF-EGFP и трансдукция первичных культур клеток гиппокампа.....	132
2.11. Моделирование повреждающих факторов <i>in vitro</i>	133
2.11.1 Моделирование нормобарической гипоксии <i>in vitro</i>	133
2.11.2. Моделирование глюкозной депривации <i>in vitro</i>	133
2.11.3. Моделирование окислительного стресса (ОС) <i>in vitro</i>	133
2.11.4. Моделирование ишемия-подобных условий <i>in vitro</i>	134
2.11.5. Моделирование β -амилоидопатии <i>in vitro</i>	134
2.12. Режим аппликации нейротрофических факторов и ингибиторов внутриклеточных киназ.....	135
2.13. Методы статистической обработки результатов	136
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	137
3.1. Молекулярно-клеточные механизмы, лежащие в основе эффектов, оказываемых нейротрофическими факторами BDNF и GDNF на адаптацию нервных клеток к действию повреждающих факторов	137
3.1.1. Воздействие нейротрофических факторов BDNF и GDNF на жизнеспособность нервных клеток первичных культур гиппокампа при моделировании факторов ишемии и ишемия-подобных условий <i>in vitro</i>	137

3.1.2. Влияние нейротрофических факторов на ультраструктуру первичных культур гиппокампа при моделировании гипоксии <i>in vitro</i> .	144
3.1.3. Воздействие нейротрофических факторов BDNF и GDNF на спонтанную биоэлектрическую активность клеток первичных культур гиппокампа при моделировании гипоксии <i>in vitro</i>	152
3.1.4. Роль нейрональных киназ в реализации нейропротекторного действия BDNF GDNF.....	158
3.1.5. Взаимное влияние нейротрофических факторов BDNF, GDNF и фактора HIF-1 в норме и при моделировании гипоксии	167
Заключение по разделу 3.1.....	173
3.2. Исследование влияния хронического увеличения уровня экспрессии BDNF на функциональное состояние нейрон-глиальных сетей при моделировании повреждающих факторов <i>in vitro</i>	177
3.2.1. Оценка влияния вектора AAV-BDNF-EGFP на морфофункциональную активность первичных культур клеток гиппокампа	178
3.2.2. Исследование нейропротекторных эффектов гиперэкспрессии BDNF при моделировании острой гипоксии <i>in vitro</i>	184
3.2.3. Роль BDNF в сохранении функциональной целостности нейронных сетей при моделировании β -амилоидопатии <i>in vitro</i>	192
3.2. 3.1. Морфофункциональные особенности нейрон-глиальных сетей гиппокампа в экспериментальных моделях β -амилоидоза <i>in vitro</i>	192
3.2.3.2. Влияние гиперэкспрессии BDNF на морфо-функциональную активность нейроглиальных сетей первичных культур гиппокампа при моделировании β -амилоидоза <i>in vitro</i>	198
Заклучение по разделу 3.2.....	208

3.3. Влияние модуляции системы фактора, индуцируемого гипоксией на адаптацию нервных клеток к действию повреждающих факторов.....	211
3.3.1. Влияние стабилизации комплекса HIF-1 на морфо-функциональное состояние нейронглиальных сетей при моделировании гипоксии <i>in vitro</i>	211
3.3.2. Влияние стабилизации комплекса HIF-1 на морфо-функциональное состояние нейрон-глиальных сетей при моделировании нейродегенерации <i>in vitro</i>	217
Заключение по разделу 3.3.....	222
Заключение.....	225
Выводы.....	228
Список цитированной литературы.....	230
Приложения,.....	293
Приложение 1.....	293
Приложение 2.....	294

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AAV – аденоассоциированный вирус

AMPA - рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты, ионотропный рецептор глутамата

ANLS - астроцит-нейронный лактатный шаттл

AQP — аквапорины

A β — β -амилоид

APP (Amyloid precursor protein) – белок-предшественник амилоида

BDNF — нейротрофический фактор головного мозга

CAMKII - Ca²⁺/кальмодулинзависимая протеинкиназа типа II

Cx30 и Cx43 коннексины 30 и 43

DIV — day in vitro, срок культивирования культур клеток in vitro

eEF2K - киназа фактора элонгации эукариот-2, также известная как кальмодулин-зависимая протеинкиназа III и кальций/кальмодулин-зависимая киназа фактора элонгации эукариот 2

eGFP(enhanced green fluorescent protein) -зеленый флуоресцентный белок с усиленной интенсивностью флуоресценции

GDNF — глиальный нейротрофический фактор

GFAP — глиальный фибриллярный кислый белок

GFP (green fluorescent protein) – зеленый флуоресцентный белок

GLUTs - глюкозо-транспортирующий протеин

GPX — глутатион-пероксидаза,

GR - глутатион-редуктаза,

GRXr, GRXo - восстановленный и окисленный глутаредоксин,

GSHr, GSSG — глутатион в восстановленной и окисленной форме,

GST - глутатион-S-трансферазы

HIF — фактор, индуцируемый гипоксией

IKK β - ингибитор субъединицы бета-субъединицы киназы каппа-B ядерного фактора

IL - интерлейкин
IP3 - инозитол-3-фосфат
IP3Rs - инозитол-1,4,5-трифосфатные рецепторы
LTP (Long term potentiation) – долговременное потенцирование
MAPK - митоген-активируемая протеинкиназа
MCT — монокарбоксилатный переносчик (транспортер)
MEA (multielectrode arrays) - мультиэлектродная система для регистрации внеклеточных потенциалов действия
Mito-ETC - дыхательная цепь митохондрий,
MMP — металлопептидазы
NAD - никотин-амид-аденин-динуклеотид
NEMO (NF-kappa-B essential modulator) - субъединица киназного комплекса IкВ, которая активирует NF-кВ
NF-кВ — транскрипционный фактор
NF-кВ — ядерный фактор «каппа-би»
NMDAR - ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат
NQO1 - NADPH-хинон-оксидоредуктаза-1
NRF2 — транскрипционный фактор-2, связанный с эритроидным ядерным фактором
PI3K - фосфоинозитид-3-киназа
QR - хинон-редуктаза
ROC - лиганд-управляемые Ca²⁺-каналы
RT-PCR – полимеразная цепная реакция в реальном времени
RyR — рианодиновые рецепторы
SERCA - Ca²⁺-АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума
SOCE - лиганд-управляемые ионные каналы и депо-управляемые кальциевые входные каналы
SOD — супероксиддисмутаза,
SRC - протоонкогенная тирозинкиназа Src

TNF α – фактор некроза опухоли α
TRXr, TRXo - восстановленный и окисленный тиоредоксин,
UGT - УДФ-глюкуронозилтрансфераза
VGCC - потенциалзависимые Ca²⁺-каналы
ХО- ксантинооксидаза
АТФ - аденозинтрифосфат
АФК (ROS) - активные формы кислорода
БА (AD) — болезнь Альцгеймера
БП (PD) — болезнь Паркинсона
ГД – глюкозная депривация
ГЭБ — гематоэнцефалический барьер
ММД - малые мозговые дисфункции
ОС – окислительный стресс
ПСУ — постсинаптическое уплотнение
ЦНС — центральная нервная система
ЭПР (ER) - эндоплазматический ретикулум

ВВЕДЕНИЕ

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. (Singh and Joshi, 2017; Nucera and Nachinski, 2018; Salminen et al., 2021). Снижение поступления кислорода к нервным клеткам ведет к нарушению окислительного фосфорилирования, повышению проницаемости мембраны митохондрий и активации свободнорадикальных процессов (Pfisterer and Khodosevich, 2017; Zhao et al., 2019). Это приводит 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 для нервной системы 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. Некоторые из них, прежде всего нейротрофический фактор головного мозга BDNF и глиальный нейротрофический фактор GDNF, оказывают нейропротекторное действие при различных патологиях центральной и периферической нервной системы, в том числе при ишемическом повреждении головного мозга (Cruz Duarte et al., 2012; Liu et al., 2014; Huang et al., 2017), травмах и нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Паркинсона (Yurek et al., 2017; Aly et al., 2019; Xiao et al., 2022), болезнь Альцгеймера (Revilla et al., 2014; Josiane et al., 2015; de Pins et al., 2019) 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 (Zhang et al., 2021; Bazzari and Bazzari, 2022; Saklani et al., 2022). Активация этих молекулярных каскадов объединяет всю нейрон-глиальную сеть в единую функциональную и метаболическую систему, способную к комплексному адаптивному ответу (Mitre et al., 2017; Skaper, 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 с семейством транскрипционных факторов, называемых факторами, индуцируемыми гипоксией (HIF) (Semenza, 2004; Dengler et al., 2014). 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 эффектов, связанных с активацией HIF-1 при гипоксии головного мозга и нейродегенерации, а также поиск возможных взаимосвязей между HIF-1 и нейротрофическими факторами.

Кроме того, особый интерес для исследования 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 конструкторов, несущих соответствующие гены (Katsu-Jiménez et al., 2016; Albert et al., 2017; Leake et al., 2020). Вопрос о возможности применения подобных конструкторов для коррекции изменений функционирования нейронных сетей как при гипоксическом и 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 изучение нейронных сетей – минимальных функциональных единиц нервной системы, ответственных за процессы реконсолидации и хранения информации (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 (Johnstone et al., 2010; Hasan and Berdichevsky, 2016). В настоящее время помимо нейронов как полноценные участники функциональных сетей рассматривают и глиальные клетки — астроциты (Singh & Joshi, 2017). Изучение отдельной функциональной 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 нервных клеток головного мозга. Первичные культуры позволяют исследовать клеточные и сетевые реакции в условиях хронического эксперимента с возможностью многократной регистрации нейросетевой 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 нейрон-глиальных 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-1a.

4. Исследование роли модуляции активности системы фактора, индуцируемого гипоксией, на функциональную активность нейрон-глиальных 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 ишемия-подобных условий *in vitro*. Впервые проведено комплексное исследование возможных молекулярно-клеточных механизмов нейропротекторных эффектов, оказываемых нейротрофическими факторами 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 IKK β в опосредованное нейротрофическими факторами BDNF и GDNF поддержание функциональной активности нейронных сетей. Описано взаимодействие системы нейротрофических факторов и системы фактора HIF-1. Стабилизация комплекса HIF-1 с помощью оригинального селективного ингибитора HIF-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-1 α .

Также впервые продемонстрировано, что использование Нейроадапта для стабилизации субъединицы HIF1 α позволяет эффективно сохранять

жизнеспособность и кальциевую активность первичных культур клеток 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 β -амилоидоза и использовании трансгенной модели болезни Альцгеймера 5xFAD *in vitro*. Показано выраженное угнетающее действие хронической амилоидопатии на сетевую функциональную биоэлектрическую и кальциевую активность нейрон-глиальных сетей, выявлено выраженное упрощение их архитектуры.

Выполнена оценка возможности применения генно-инженерных конструкторов, несущих ген нейротрофического фактора, для терапии повреждений ЦНС. Впервые проведена комплексная оценка влияния хронической гиперэкспрессии BDNF, индуцированной вирусным вектором AAV-Syn-BDNF-eGFP, на биоэлектрическую и кальциевую нейросетевую активность в норме и при моделировании гипоксии. Особый интерес представляют результаты, свидетельствующие, что хроническое повышение концентрации BDNF поддерживает спонтанную нейросетевую 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 NIF, 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 для изучения изменений физиологических процессов в нейрон-глиальных сетях при данных состояниях. Полученные данные, описывающие функционирование и особенности реорганизации нейрон-глиальных сетей первичных культур клеток гиппокампа при моделировании β -амилоидоза *in vitro* расширяют имеющиеся фундаментальные знания о механизмах развития нейродегенеративных процессов в ЦНС. 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 новых высокоэффективных подходов к коррекции нарушений функционирования нейрон-глиальных 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 нейрон-глиальных 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 IKK β .
2. Хроническое повышение концентрации BDNF при трансдукции нервных клеток аденовирусным вектором AAV-Syn-BDNF-eGFP поддерживает спонтанную нейросетевую активность в постгипоксическом периоде и при моделировании β -амилоидопатии.
3. 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 диссертационного исследования, а также разработанные и модифицированные при его выполнении методы и методические подходы внедрены в научно-исследовательскую работу кафедры нейротехнологий и НИИ Нейронаук ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Кроме того, результаты проведенных исследований используются в учебном процессе, реализуемом на кафедре 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), международном 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 (США, 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 нейробиологического 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 Societies 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 в подготовке и написании 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 Н1F-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), Елифановой Екатерине Алексеевне, преподавателю каф. неорганической химии ХФ ННГУ за разработку аденоассоциированного вирусного вектора AAV-Syn-BDNF-eGFP и Широковой Олесе Михайловне (ПИМУ Минздрава России) за помощь в выполнении электронно-микроскопических исследований.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ключевые повреждающие факторы ишемического повреждения головного мозга

Неврологические и нейрососудистые заболевания являются ведущей причиной инвалидности и второй по встречаемости причиной смерти во всем мире. Наиболее распространенными из данной группы заболеваний по данным ВОЗ являются ишемический инсульт, болезнь Альцгеймера, неонатальная гипоксически-ишемическая энцефалопатия и ряд других (<https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>). Молекулярные механизмы, лежащие в основе их развития, являются весьма сложными и включают множество компонентов, что является основным препятствием к разработке методов коррекции последствий этих заболеваний (Ranjan & Gulati, 2022).

Ишемией называется состояние снижения кровотока до уровня, недостаточного для поддержания нормальной клеточной функции. Ткань головного мозга очень чувствительна к воздействию ишемии, так что даже небольшие нарушения мозгового кровообращения могут инициировать каскад патобиохимических реакций, который в итоге приводит к гибели нервных клеток. Среди многообразия патофизиологических механизмов развития острой ишемии ключевым фактором является остро возникающий дефицит поступления к мозгу кислорода и глюкозы, угнетение процессов энергопродукции (Гусев, Скворцова, 2001; Siesjö et al., 1999). В дальнейшем ишемическое повреждение мозга приводит к развитию ряда патологических каскадов: нарушению белкового синтеза, эксайтотоксичности, окислительного стресса (Radak et al., 2017; Ryou and Mallet, 2018). Кроме того, ишемическое повреждение головного мозга усугубляется сильной воспалительной реакцией, приводящей к увеличению проницаемости гематоэнцефалического барьера и поступлению в мозг клеток иммунной системы, вырабатывающих воспалительные медиаторы, такие как цитокины,

хемокины, протеазы, активные формы кислорода и молекулы сосудистой адгезии (Kawabori and Yenari, 2015; Maida et al., 2020).

Выделяют несколько типов ишемии головного мозга. Самым распространённым типом является фокальная ишемия, развивающаяся из-за нарушения кровотока в отдельных сосудах, вследствие образовавшихся тромбов, и как правило ограничивающаяся небольшой областью головного мозга. Вторым типом является глобальная ишемия, характеризующаяся снижением или прекращением кровообращения во всём мозге или его значительной части. Причинами могут являться нарушения сердечного ритма, свёртываемости крови, патологии крупных церебральных сосудов, снижение концентрации кислорода в атмосфере и т.д. Третьим типом является лакунарный инсульт, при котором образуются небольшие, до 15 мм, полости (лакуны) заполненные ликвором, возникающие вследствие поражения малых пенетрирующих артерий и капилляров (Гусев, 2007).

Ишемический инсульт является широко распространенным заболеванием и считается основной причиной гипоксического стресса мозга (Aleyasin et al., 2015; Mozaffarian et al., 2016). Гипоксия также может являться одним из компонентов патологического комплекса и быть связанной с такими нейродегенеративными заболеваниями, сопряженными со снижением когнитивных функций и памяти, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др. (Panchision, 2009; Snyder et al., 2017; Yagishita & Hirasawa, 2017).

Область мозга, в которой наблюдается наибольшее снижение уровня кровотока (менее 10 мл/100 г в 1 мин) носит название «очага» ишемии. Повреждения в этой зоне развиваются очень быстро, в течение не более чем 8 мин с момента острого нарушения уровня кровоснабжения.

Для разработки методов нейропротекции при ишемическом повреждении важно, что в течении нескольких часов это «очаг» окружено зоной ишемизированной, но живой ткани (с уровнем кровотока выше 20 мл/100 г в 1 мин) - так называемой зоной пенумбры, в которой присутствуют

функциональные, но не структурные изменения, с сохранением нормального уровня энергетического метаболизма. За счет зоны пенумбры происходит постепенное увеличение размеров инфаркта (Radak et al., 2017). Длительность существования пенумбры и период, в течение которого в клетках сохраняются обратимые изменения у каждого больного индивидуальна. Именно этот период, называемый «терапевтическим окном» определяет наиболее эффективные для терапии временные рамки. В первые часы и дни после развития инсульта именно пенумбра является главной мишенью применения нейропротекторных средств с целью восстановления жизнедеятельности клеток (Yang and Liu, 2021). Поддержание жизнеспособности и функционирования поврежденных областей мозга осуществляется в основном за счет подавления процессов, которые приводят к гибели клеток и индукции нейрорегенерации (Davis & G.K., 2020). Содействие нейрорегенерации и активация нейрогенеза так же важны, как и предотвращение гибели клеток.

Таким образом, для поиска эффективных методов активации адаптационных механизмов нервных клеток к воздействию ишемии и коррекции ее последствий необходимы исследования специфических компонентов ишемического повреждения.

1.1.1. Гипоксия как компонент патогенетического комплекса ишемического повреждения головного мозга

Содержание кислорода в тканях играет чрезвычайно важную роль в поддержании нормального функционирования клеток и регуляции их развития. Следует отметить, что влияние гипоксии на организм различается в зависимости от выраженности и длительности снижения содержания кислорода. Разработано несколько классификаций типов гипоксии. Исходя из причин возникновения и механизмов развития выделяют: экзогенную (гипо- и нормобарическую) гипоксию, кровяную (гемическую), сердечно-сосудистую (циркуляторную), тканевую (первично-тканевую), дыхательную

(респираторную), и смешанную (Агаджанян, 1986). Действие гипоксии на организм различается в зависимости от степени ее выраженности и времени воздействия. Во взрослом состоянии «физиологическая» гипоксия поддерживает недифференцированное состояние нескольких популяций стволовых клеток и клеток-предшественников, в том числе и нервных стволовых клеток и защищает их ДНК от окислительного повреждения (Mohyeldin et al., 2010). Продолжительная и выраженная гипоксия приводит к нарушению функционирования и гибели клеток. Наиболее чувствительна к недостатку кислорода центральная нервная система. Несмотря на то, что головной мозг человека составляет лишь небольшую часть массы тела (около 2%), он является главным потребителем энергии в организме - на него приходится более 20% общего кислородного обмена. Из этого количества 75–80% энергии расходуют нейроны (Hyder et al., 2013). Эта энергия в первую очередь необходима для поддержания синаптической трансмиссии и требуется для восстановления мембранных потенциалов нейронов после деполяризации (Harris et al., 2012).

Другие функции нейронов, такие как рециклинг синаптических везикул, синтез нейромедиаторов и аксоплазматический транспорт, также являются энергозависимыми и способствуют истощению энергии и являются фактором, определяющим повышенную интенсивность кислородного метаболизма в нейронах (Pathak et al., 2015; Rangaraju et al., 2014).

В основе гипоксического повреждения клетки лежат последовательные изменения свойств митохондриально-ферментного комплекса. В работах Л.Д. Лукьяновой с соавторами описана последовательность развития гипоксических изменений в ткани мозга (рис. 1).

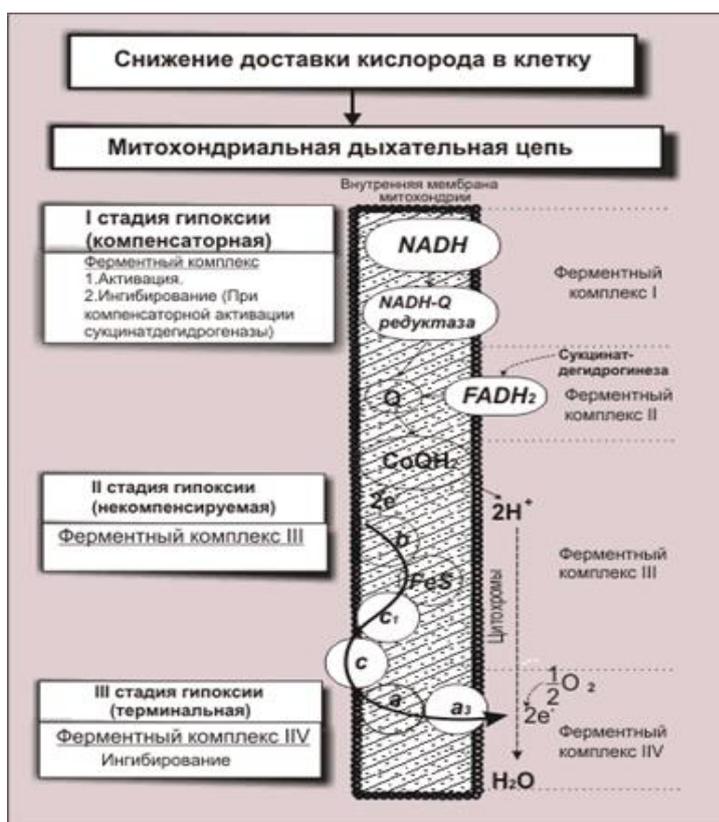


Рисунок 1. Влияние снижения концентрации кислорода на работу митохондриальной дыхательной цепи (Лукьянова, 2019)

Сначала развивается компенсаторная стадия гипоксии, во время которой происходит инактивация никотин-амид-аденин-динуклеотид (NAD/NADH) - зависимого пути окисления. Активация сукцинат-оксидазного пути компенсирует эти изменения. Во время первой фазы острой гипоксии происходит повышение содержания АТФ в нервных клетках и усиливается функциональная активность нейронов. В этот период возбуждение преобладает над торможением, данное явление было названо «гипоксическая деполяризация биологических мембран нейронов» (Новиков, 1994).

На следующей стадии происходит подавляется активность митохондриального ферментного комплекса-I: снижается интенсивность окисления NAD-зависимых субстратов и как следствие производительность окислительного фосфорилирования (Лукьянова с соавт., 1999). Клетка перестает быть способна окислять энергетические субстраты и развивается «субстратное голодание». Однако, на данном этапе отсутствует необратимое

повреждение цитохромов и митохондриальное дыхание еще возможно восстановить. Значительного падения внутриклеточной концентрации АТФ на превой стадии гипоксии не происходит, функциональная активность клеток сохраняется. Вероятно, это связано с активацией компенсаторных метаболических путей (особенно сукцинатоксидазного пути), что позволяет поддерживать работу цитохромного участка и способность клетки к окислительному фосфорилированию (Лукьянова, 2019; Sveinsson et al., 2014).

Нарастание недостатка кислорода ведет к развитию дальнейших нарушений: угнетению электронтранспортной функции дыхательной цепи митохондрий из-за нарушения работы цитохромов b-c. При развитии второго этапа гипоксии синтез АТФ сохраняется, поскольку еще активен ферментативный комплекс-IV, однако уже снижается, поскольку снижается активность цитохромоксидазы. В аноксических условия цитохромоксидазы полностью прекращает функционировать, в таком случае происходит прекращение окислительного фосфорилирования. Это терминальный (третий) этап развития гипоксического повреждения (Лукьянова с соавт., 1999; Ramenter et al., 2012).

Фактически, митохондрии поддерживают биоэнергетику клетки, настраивают внутриклеточную динамику ионов Ca^{2+} и регулируют доступность глутамата, используя его в качестве метаболического субстрата. При патологических процессах, когда митохондриальная функция уже нарушена, развивается процесс, называемый эксайтотоксичность. Впервые он был описан Джоном Олни, который опубликовал ряд работ, свидетельствующих, что чрезмерная активация ионотропных или метаботропных рецепторов возбуждающими нейромедиаторами, прежде всего глутаматом, могут приводить к развитию нейротоксичности (Olney, 1994). Внеклеточная концентрация глутамата при ишемическом инсульте может достигать десятков мкМ, что подтвердило предположение, что эксайтотоксичность может быть причиной развития вторичного повреждения нейронов и формирования области ишемической полутени (пенумбры) (Pál,

2018). Чрезмерная стимуляция глутаматных рецепторов приводит к повышенному поступлению и накоплению Ca^{2+} внутри клетки до токсических значений. Среди разнообразных источников притока Ca^{2+} увеличение цитозольного Ca^{2+} , вызванное глутаматергической синаптической передачей, в первую очередь связано с: (1) активацией рецепторов NMDA; (2) активацией потенциалзависимых каналов Ca^{2+} после деполяризации мембраны, вызванной активацией AMPAR, и (3) облегчением высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных запасов путем активации метаботропных рецепторов глутамата (Pellegrini-Giampietro, 1997). Превышение физиологической концентрации Ca^{2+} в цитоплазме запускает нейротоксические процессы, в том числе разобщение митохондриальной транспортной цепи, стресс эндоплазматического ретикулума, что в дальнейшем ведет к активации протеолитических ферментов, повреждающих нейроны, образованию свободных радикалов и в итоге к гибели клетки. Эксайтотоксичность является общим компонентом в механизмах развития как ишемии, так и многих нейродегенеративных заболеваний (Mehta et al., 2013; Namura et al., 2013).

Транзиторная ишемическая гипоксия может вызвать тяжелое острое повреждение головного мозга, особенно в гиппокампе, который является крайне чувствительным к гипоксии регионом (Gao et al., 2019; Gordan et al., 2012). Апоптоз нейронов гиппокампа является одной из основных причин неврологического дефицита и когнитивных нарушений, так как гиппокамп критически важен для пространственного обучения и памяти (Simões Pires et al., 2014). Повреждения этой области приводят к выраженному снижению когнитивных функций, что серьезно влияет на качество жизни пациентов (Lagali et al., 2010; S. Yang et al., 2017). Апоптоз, некроз и некроптоз являются основными путями гибели нейронов во время гипоксического повреждения (Ünal-Çevik et al., 2004; S. Yang et al., 2017).

1.1.2. Дефицит энергетических субстратов

Вторым важнейшим компонентом ишемического повреждения головного мозга является дефицит энергетических субстратов, прежде всего глюкозы. Хронические нарушения энергетического метаболизма в головном мозге могут возникать также при таких широко распространенных состояниях как инсульт, черепно-мозговые травмы, шейный остеохондроз, бессонница, депрессии, нейродегенеративные заболевания, диабет и ряде других (Thomas et al., 2000; Black et al., 2018; Holla et al., 2022). Использование позитронно-эмиссионной томографии позволило показать, что нарушение энергетического метаболизма является характерной чертой многих нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, эпилепсия, возрастные нарушения памяти, малые мозговые дисфункции (ММД), болезнь Паркинсона, атаксия Фридрейха, рассеянный склероз, вызванные анестезией нарушения памяти, болезнь Хантингтона и многие другие (Yin et al., 2016; Barros et al., 2017). Относительно некоторых из перечисленных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера и эпилепсии, имеются данные, указывающие на то, что энергетический стресс может рассматриваться как один из основных триггерных механизмов активации патологии (Yin et al., 2016; Bukke et al., 2020).

Важнейшую роль в снабжении нейронов энергетическими субстратами играют астроциты. Астроциты способны запасать гликоген, который при необходимости может быть быстро преобразован в лактат или пируват, который далее поступает в цикл трикарбоновых кислот, также гликоген может быть использован для биосинтеза глутамата и в синтезе глюкозы. Существует молекулярный механизм, в котором астроциты и нейроны метаболически связаны. Данный механизм носит название астроцит-нейронный лактатный шаттл (ANLS), концепция которого была сформулирована в 1994 году (Pellerin & Magistretti, 1994). Согласно модели лактатного челнока, лактат, который высвобождается из астроцитов, поступает в нервные клетки, преобразуется в пируват, а затем непосредственно используется в цикле трикарбоновых кислот

для выработки энергии (Bélanger et al., 2011). Транспорт глюкозы и лактата между клетками мозга осуществляют соответственно глюкозо-транспортирующие протеины (GLUTs) и монокарбоксилатные переносчики (MCTs), трансмембранные белки, принадлежащие к суперсемейству транспортёров растворенных веществ (SLC). Было показано, что молочная кислота, продуцируемая астроцитами, важна для поддержания активности нейронов при дефиците глюкозы (Wyss et al., 2011). Наиболее энергозатратным является процесс синаптической передачи, поэтому энергетическая астроцитарная поддержка – ключевое условие сохранения функционирования нейронных сетей. Таким образом, одной из важнейших функций астроцитов является компенсация энергетических субстратов для нейронов при развитии ишемического повреждения.

Глутамат, вырабатываемый при развитии эксайтотоксичности при ишемическом и гипоксическом повреждении головного мозга, вызывает активацию Na^+/K^+ -АТФ-азы в астроцитах и способствует поглощению ими внеклеточной глюкозы (Kitano et al., 2002). Одновременно происходит активация лактатдегидрогеназы, которая превращает пируват в лактат. Перенос лактата из астроцитов в нейроны обеспечивают монокарбоксилатные транспортеры, присутствующими в каждой клетке. Основными типами таких транспортеров в астроцитах являются MCT1 и MCT4. После перемещения данными транспортерами лактат переносится нейрональными транспортерами MCT2 и используется в качестве энергетического субстрата. Показано, что после транзиторной ишемии в астроцитах увеличивались как продукция лактата, так и экспрессия MCT1, MCT2 и MCT4 (Rosafio et al., 2016).

Нарушение нейрон-глиального взаимодействия, в том числе нарушение функционирования MCT транспортеров, может активировать ряд метаболических каскадов, ведущих к нарушению передачи нервного импульса и в итоге к гибели нейронов. В настоящее время активно исследуется гипотеза о том, могут ли астроциты посредством данных транспортеров оказывать

протективное воздействие на нейроны при остром дефиците глюкозы, а также поиск способов, с помощью которых можно было бы активировать этот процесс (Curcio et al., 2015).

Дисфункция лактатного челнока оказывает негативное воздействие на центральную нервную систему, например, она может отрицательно влиять на рост нейритов (K. Chen et al., 2018). Метаболическая связь между нейронами и астроцитами влияет на обучение и память. Предполагается, что астроцит-нейронный лактатный шаттл играет важную роль в развитии нервных клеток и формировании нейронных сетей (K. Chen et al., 2018). Показано, что лактат, секретируемый астроцитами, не только используется в качестве энергетического субстрата для нервных клеток, но и является сигнальной молекулой, регулирующей такие функции, как возбудимость нервных клеток и пластичность синаптической передачи. Выявлен рецептор гидроксикарбоновой кислоты 1 типа (HCAR1), орфанный рецептор, связанный с G-белком, который является сенсором внеклеточного лактата и модулирует функции клеток в условиях дефицита кислорода (Cai et al., 2008). Кроме того, показано, что лактат может влиять на некоторые гомеостатические функции нейронов (Magistretti & Allaman, 2018). Таким образом, регуляция поступления лактата из астроцитов в нейроны через МСТ может быть важным фактором в адаптации нервных клеток к кислородной и глюкозной депривации (Gao et al., 2019; Yamagata, 2020).

С другой стороны, активация гликолиза при ишемическом повреждении и как следствие повышенная продукция лактата глиальными клетками приводит к повышению его концентрации с 1-3 ммоль/л в норме до 10-50 ммоль/л в области инфаркта (Banerjee et al., 2016). Лактат из области инфаркта диффундирует в область пенумбры, где действует как сигнальная молекула, связываясь с лактатными орфанными рецепторами. Повышение концентрации лактата приводит к тканевому ацидозу в области инфаркта, pH снижается от 7,0 до 6,6 (Regli et al., 1995; (Liu et al., 2020)), что приводит к апоптозу нейронов и астроцитов (Rossi et al., 2007). Кроме того, лактат может

индуцировать продукцию провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли- α (TNF α), интерлейкины IL-6 и IL-8 глияльными клетками. Таким образом, роль дефицита энергетических субстратов при ишемическом повреждении достаточно многогранна.

1.1.3. Окислительный стресс

Окислительный стресс развивается в том случае, если продукция свободных радикалов превосходит емкость антиоксидантной системы клетки (Wakabayashi et al., 2003). Окислительный стресс для нервной ткани является одним из ключевых патофизиологических звеньев развития целого ряда заболеваний. К развитию окислительного стресса приводят различные эндогенные или экзогенные факторы, которые индуцируют образование активных форм кислорода (АФК, ROS) (например, супероксиданион-радикал (O_2^-), гидроксильный радикал (OH^\cdot), перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород и др.), активные формы азота (например, оксид азота, пероксинитрит, нитроксильный анион и др.), активные соединения серы (персульфиты, тиосульфат и др.), различные заряженные частицы и свободные радикалы (Singh and Devasahayam, 2020). Для активных форм кислорода, азота и серы типично наличие неспаренных электронов или нестабильных, высокореакционных химических связей. АФК взаимодействуют с липидами, белками и нуклеиновыми кислотами, зачастую приводя к необратимому повреждению молекул. В том числе, АФК могут вызывать повреждение мембраны митохондрий и развитие митохондриальной дисфункции, ведущей к гибели клетки (Rodrigo et al., 2013). Однако, активные формы кислорода в физиологических условиях выполняют важные для организма функции: участвуют в защите от патогенов, регулируют ряд внутриклеточных процессов и участвуют в биохимических каскадах (рис.2).

Защиту клеток от окислительного стресса обеспечивает антиоксидантная система. Выделяют два типа низкомолекулярных антиоксидантов: I - прямые антиоксиданты, обладающие окислительно-восстановительной активностью, короткоживущие, расходуемые в процессе своего антиоксидантного действия и нуждающиеся в пополнении или регенерации. К данному типу относятся глутатион, аскорбат, токоферолы (витамин E), липоевая кислота, витамин K, убихинон и другие полифенольные соединения.

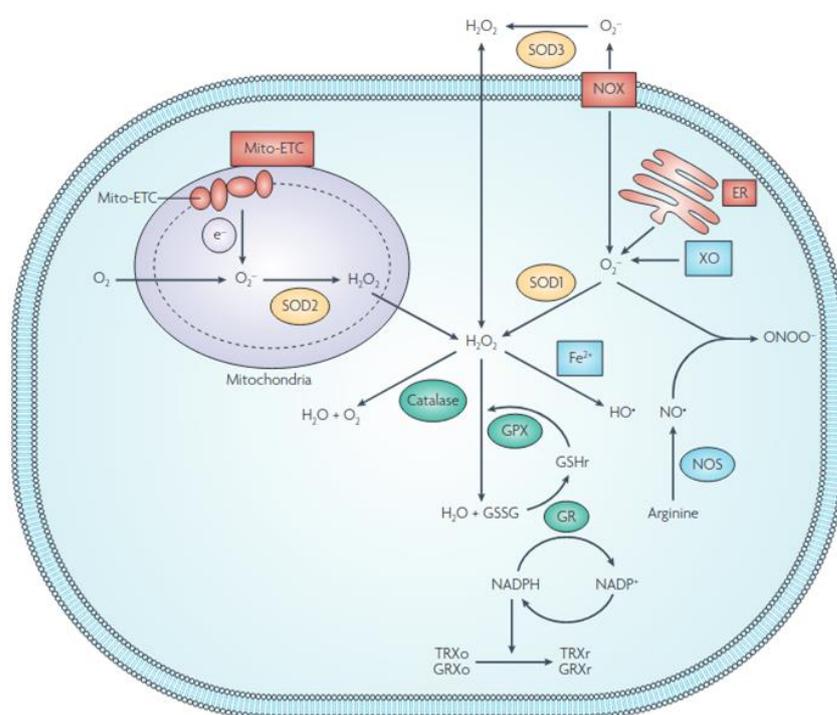


Рисунок 2. Продукция и превращения АФК в клетке. Показаны ключевые участники реакций синтеза и метаболизма АФК, включая ферменты антиоксидантной системы клетки. ER - эндоплазматический ретикулум GPX - глутатион-пероксидаза, GR - глутатион-редуктаза, GRXr, GRXo - восстановленный и окисленный глутаредоксин, GSHr, GSSG — глутатион в восстановленной и окисленной форме, Mito-ETC - дыхательная цепь митохондрий, SOD - супероксиддисмутаза, TRXr, TRXo - восстановленный и окисленный тиоредоксин, XO- ксантинооксидаза (Trachootham et al., 2009)

Ко второму типу антиоксидантной защиты относятся непрямые антиоксиданты. Непрямые антиоксиданты активируют путь Keap1/Nrf2/ARE, что приводит к индукции транскрипции пула цитопротекторных белков (также известных как ферменты фазы 2), которые действуют каталитически, не расходуются, имеют длительный период полураспада, например такие ферменты, как глутатион-S-трансферазы (GST), УДФ-глюкуронозилтрансфераза (UGT), NADPH-хинон-оксидоредуктаза-1 (NQO1), хинон-редуктаза (QR) (Dinkova-Kostova and Talalay, 2008). Эти защитные системы вовлечены в сложное функциональное взаимодействие, так что многие цитопротекторные белки участвуют в синтезе и/или регенерации прямых антиоксидантов, тогда как некоторые прямые антиоксиданты необходимы для каталитических функций цитопротекторных белков.

Работа антиоксидантной системы клетки в значительной степени опосредуется каскадом Keap1/Nrf2/ARE. В нормальных условиях, когда клетка не подвергается воздействию стрессовых условий, клеточная концентрация редокс-чувствительного транскрипционного фактора NRF2 (фактора-2, связанного с эритроидным ядерным фактором) остается низкой. Nrf2 в физиологических условиях связывается с белком KEAP1, который направляет его на протеосомную деградацию путем убиквитинирования. Когда в клетке повышается концентрация АФК, активных форм азота и т. д., NRF2 диссоциирует от KEAP1, перемещается к ядру и связывается со специфическим участком ДНК. Таким образом, он активирует элемент антиоксидантного ответа (ARE) и активирует экспрессию ряда генов антиоксидантов и цитопротекторов, например гемеоксигеназы 1, NAD(P)H хинон-оксидоредуктазы 1, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы (Magesh et al., 2012).

Гипоксическое повреждение ведет к усилению свободнорадикального перекисного окисления липидов и окислительному стрессу. Важно отметить, что усиление продукции свободных радикалов - общий патофизиологический компонент для большого количества патологий нервной системы, в том числе

при ишемическом инсульте и нейродегенеративных заболеваниях (Olmez and Ozyurt, 2012; Lorigados Pedre et al., 2018; Singh and Devasahayam, 2020). Известно, что экспрессия митохондриальной супероксиддисмутазы повышается в нервных клетках при БА (de Leo et al., 1998), при этом нокаут гена, кодирующего SOD, индуцировал развитие заболевания (Esposito, 2006). Также известно, что митохондриальная супероксиддисмутазы чрезвычайно важна для защиты нейронов от гибели после ишемии (Jung et al., 2009).

У пациентов с болезнью Паркинсона выявлено повышение экспрессии глутатионпероксидаз (Damier et al., 1993), а гиперэкспрессия глутатионпероксидазы 4 повышала устойчивости нейронов мышей к окислительному стрессу (Ran et al., 2004). Интересно отметить, что в дофаминергических нейронах черной субстанции и пирамидных нейронах гиппокампа отмечается очень низкий уровень экспрессии пероксиредоксинов - ферментов, восстанавливающих пероксид и органические перекиси, что, возможно, объясняет окислительное повреждение этих клеток при развитии болезней Паркинсона и Альцгеймера (Goemaere and Knoops, 2012). Гиперэкспрессия этих ферментов защищала нервные клетки от ишемического повреждения *in vitro* (Gan et al., 2012).

Таким образом, антиоксидантные системы клетки чрезвычайно сложны и разнообразны, а окислительный стресс играет важную роль в развитии различных неврологических патологий. В настоящее время остаются неизученными ряд вопросов, касающихся того, почему некоторые типы нейронов, включая клетки гиппокампа, более подвержены окислительному стрессу и каким образом можно регулировать их адаптацию к повышению продукции АФК.

1.1.4. Нейрон-глиальные сети при ишемическом повреждении

1.1.4.1. Нейрон-глиальные сети и их морфофункциональные характеристики

Современная нейробиология рассматривает нейронные сети в качестве функциональной основы функционирования головного мозга, в том числе всех ключевых процессов высшей нервной деятельности (память, эмоции, мышление). Первыми данную концепцию предложили А.Бэйн и У.Джеймс еще в конце 19 века. Эта концепция предполагала, что любое действие приводит к активации ансамбля нейронов, при этом нейроны могут находиться как в одном, так и в разных отделах нервной системы. повторение этого действия ведет к усилению связей между этими нейронами, что ведет формированию памяти (Wilkes & Wade, 1997).

«Узлами» этих сетей могут быть либо нейроны, либо целые области мозга (формирующие макро контуры), которые функционально или анатомически взаимосвязаны (Greicius et al., 2003; Nieto-Posadas et al., 2014; Becker et al., 2016; Cohen and D'Esposito, 2016). Структура и характер взаимодействий между узлами нейронной сети можно выявить либо с помощью различных имиджинговых наблюдений (например, визуализации синаптических контактов) (Tecuapetla et al., 2014; Qin et al., 2017) или регистрации динамической активности (например, определение корреляции электрических сигналов между клетками) (Cohen and D'Esposito, 2016; Zhang et al., 2016).

Нейронные сети классифицируют на два основных типа: иерархические и локальные (Chinnery, 2006). В иерархических сетях сигналы передаются последовательно от одного уровня иерархии к другому. Выделяют конвергентные сети — в них несколько нейронов одного уровня связаны с меньшим количеством нейронов следующего уровня, и дивергентные — нейроны одного уровня связаны с большим количеством нейронов. В реальных биологических сетях комбинируются многочисленные

конвергентные и дивергентные пути, что позволяет осуществлять сложную обработку и фильтрацию сигнала и повышает устойчивость системы. Локальные сети расположены в одном функциональном отделе головного мозга и анализируют информацию на одном иерархическом уровне, являясь относительно изолированной структурой (Agatonovic-Kustrin and Beresford, 2000); Berne et al., 1998; Chinnery, 2006).

В силу вышеизложенного одним из принципиальных моментов при исследовании нейропротекторных свойств различных соединений является изучение нейронных сетей как 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 консолидированно 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, окончательно не решенной в данный момент задачей. Одной из адекватных современных биологических моделей являются первичные диссоциированные культуры клеток гиппокампа. Иерархические сети чрезвычайно сложно устроены, кроме того они морфологически разобщены, поэтому наиболее подходящим экспериментальным объектом являются первичные культуры нейронов коры головного мозга, гиппокампа, а также гипоталамуса, то есть тех отделов головного мозга, для которых характерно формирование локальных нейронных сетей. В первичных культурах нервной ткани возможно выполнение исследований отдельных клеточных и сетевых реакции при действии как стресс-факторов, так и нейропротекторов в условиях хронического эксперимента с возможностью многократной регистрации нейросетевой активности, например при помощи мультиэлектродных матриц (Mitroshina et al., 2020; Vedunova et al., 2016). Особый интерес исследователей прикован к изучению особенностей

функционирования сетей гиппокампа связана, что обусловлено тем, что гиппокамп регулирует возникновение эмоций, а также является отделом, в котором происходит консолидация памяти. Перспективным для исследования нейронных сетей является то, что в гиппокампе присутствуют локальные, генетически детерминированные нейронные сети (Chinnery et al., 2003; Purves, 1985).

Одной из наиболее значимых характеристик функционирования нейронной сети является ее биоэлектрическая активность. Паттерн активности меняется с ходом онтогенеза и в различных функциональных состояниях (Ham et al., 2008; Molnár et al., 2020). Ранее нами было показано, что при культивации первичные культуры гиппокампа проходят основные стадии, характерные для нейронных сетей *in vivo*, включая смену преобладающего типа синапсов, изменение нейрон-глиального соотношения и формирование устойчивого паттерна электрических сигналов (Широкова и др., 2013). На сегодняшний день для регистрации нейросетевой биоэлектрической активности наиболее релевантной методикой является применение мультиэлектродных систем для регистрации внеклеточных потенциалов действия (multielectrode arrays, MEA), которые дают возможность длительно и неинвазивно исследовать работу нейронных сетей и оценивать различные фармакологические воздействия, а также моделировать патологические состояния ЦНС. Помимо регистрации сигналов возможно выполнять различные протоколы стимуляции клеток, а также применять методы визуализации, что делает возможным изучение способности к обучению и механизмов формирования памяти (Bonini et al., 2013; B. Li et al., 2007; Wagenaar, 2005; Xiang et al., 2007).

Помимо биоэлектрической активности, важной характеристикой нейросетевой активности является динамика ионов кальция в цитоплазме. Ca^{2+} является наиболее важным вторичным мессенджером как в нейронах, так и в клетках глии, и участвует в регуляции активности множества молекулярных

каскадов, регулирующих ключевые аспекты функционирования нейронов и астроцитов.

Основными источниками поступления Ca^{2+} в нейронах являются потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы (VGCC), лиганд-управляемые ионные каналы и депо-управляемые кальциевые входные каналы (SOCE) (рис. 3). Каналы SOCE активируются истощением эндоплазматического ретикулума, основного внутриклеточного хранилища Ca^{2+} , которое детектируется с помощью белков-кальциевых сенсоров STIM1/2. Также Ca^{2+} мобилизуется из ЭПР в цитоплазму при активации метаболитных глутаматных рецепторов. Их активация ведет к синтезу инозитол-3-фосфата и соответственно активации инозитол-1,4,5-трифосфатных рецепторов (IP3Rs), основных локализованных в ЭПР каналов для высвобождения Ca^{2+} (рис. 3). Ca^{2+} также может высвобождаться из ЭПР через рианодиновые рецепторы (RyR), которые активируются самим Ca^{2+} посредством Ca^{2+} -индуцированного высвобождения Ca^{2+} , что позволяет усиливать цитозольные кальциевые сигналы. Помимо ЭПР, внутриклеточными Ca^{2+} депо являются аппарат Гольджи, ядро и лизосомы. Низкая концентрация Ca^{2+} в цитоплазме нейронов поддерживается благодаря наличию этих внутриклеточных депо, в которых Ca^{2+} депонируется посредством активности Ca^{2+} -АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA). Митохондрии и пероксисомы также участвуют в передаче кальциевых сигналов, но не считаются конститутивными хранилищами Ca^{2+} . Поскольку поддержание концентрации кальция в цитоплазме на низком уровне важно для поддержания нормального функционирования и жизнеспособности нейронов, есть целый ряд механизмов контроля концентрации Ca^{2+} , включая $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник, Ca^{2+} -насосы плазматической мембраны и Ca^{2+} -буферные белки, такие как кальбиндин-D28, кальретинин и парвальбумин в цитоплазме, а также кальретикулин и кальнексин в ЭПР (Callens et al., 2021).

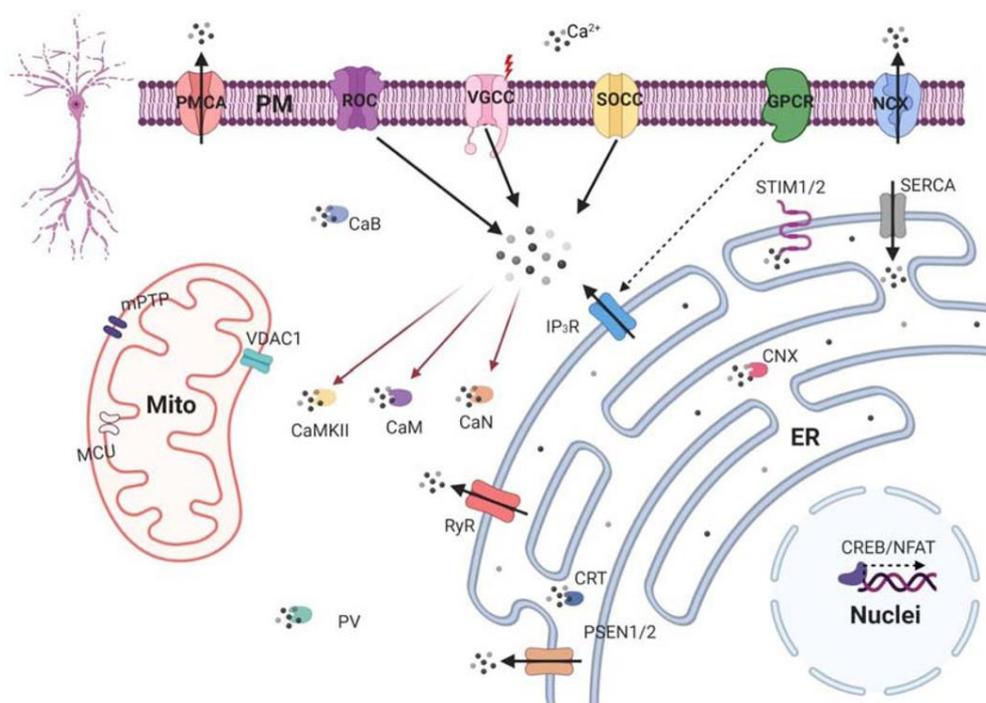


Рисунок 3. Кальциевая сигнализация в нейронах. Основными путями поступления Ca^{2+} через плазматическую мембрану (PM) являются потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы (VGCC), лиганд-управляемые Ca^{2+} -каналы (ROC) и депо-управляемые Ca^{2+} -каналы (SOCC). Ca^{2+} -АТФаза, локализованная в плазматической мембране (PMCA) и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник (NCX) выводят Ca^{2+} из цитоплазмы во внеклеточное пространство. Активация метаботропных глутаматных рецепторов (mGluR) стимулирует выход Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (ЭПР, ER) за счет активации инозитол-1,4,5-трифосфатных рецепторов (IP₃R). Ca^{2+} также может поступать в цитозоль из ER через рианодиновые рецепторы (RyR). Поступление Ca^{2+} в ER регулируется АТФазой SERCA. Истощение запасов Ca^{2+} в ЭПР определяется Ca^{2+} сенсорами STIM1/2. Для поддержания баланса, Ca^{2+} высвобождается из ЭПР через каналы пассивной утечки пресенилинов (PSEN1/2). Передача Ca^{2+} -зависимых сигналов в ядро происходит с помощью транскрипционных факторов CREB и NFAT. Митохондриальные системы регуляции концентрации Ca^{2+} включают митохондриальный Ca^{2+} унипортер (MCU), потенциалзависимый анионный канал типа 1 (VDAC1), митохондриальную пору перехода проницаемости (mPTP). Кроме того, концентрацию Ca^{2+} в цитозоле на стабильном уровне сохраняют Ca^{2+} -связывающие белки: парвальбумин (PV), кальбиндин-28 (CaB) и кальретинин (CaR), а внутри ЭПР - кальретикулин (CRT) и кальнексин (CNX). Ca^{2+} -активируемые белки включают кальмодулин (CaM), Ca^{2+} /кальмодулинзависимую протеинкиназу типа II (CaMKII) и Ca^{2+} /кальмодулинзависимую протеинфосфатазу кальциневрин (Callens et al., 2021)

Если в конце 20 века большинство исследователей придерживались концепции нейронных сетей, то в последние годы наблюдается интенсивный рост интереса к исследованию особенностей метаболизма клеток глии, прежде всего, астроцитов, и их взаимодействия с нейронами. Современная нейробиология рассматривает астроциты как непосредственного участника синаптической передачи и обработки информации. Также получено множество экспериментальных подтверждений того, что нарушения функционирования астроцитов и переход их в реактивное состояние может быть важным механизмом развития многих заболеваний ЦНС, в том числе болезни Альцгеймера, Хантингтона, бокового амиотрофического склероза и других (Bose, 2017; Yamanaka & Komine, 2018; Yi et al., 2018).

В настоящее время астроциты рассматривают не только как индивидуальные клетки, но и как единый функциональный синцитий, поскольку они могут обмениваться сигнальными молекулами, формируя астроцитарную сеть (Giaume et al., 2010). Являясь электрически невозбудимыми клетками, астроциты способны генерировать кальциевые волны в астроцитарных сетях. Это явление открыто достаточно давно. Charles et al., 1991 и Cornell-Bell et al., 1990 впервые сообщили, что астроциты способны не только повышать концентрацию кальция в цитоплазме в ответ на внешнюю стимуляцию, но и способны передавать эти кальциевые сигналы соседним не стимулированным астроцитам, в виде межклеточные кальциевых волны, что явилось чрезвычайно важным открытием. Обнаружение феномена кальциевых волн, распространяющихся от астроцита к астроциту, явилось основой гипотезы о том, что сети астроцитов представляют собой экстранейрональный путь для быстрой передачи сигнала на большие расстояния в ЦНС (Newman & Zahs, 1997).

Было показано, что нейронная активность гиппокампа запускает кальциевые волны в астроцитарных сетях (Dani et al., 1992), а кальциевые волны астроцитов модулируют нейронную активность (Dani et al., 1992; Kang et al., 1998; Nedergaard, 1994; Pappas et al., 1994; Parri et al., 2001). Таким

образом, нейроны и астроциты двунаправленно регулируют активность в нейрон-глиальных сетях (рис. 4).

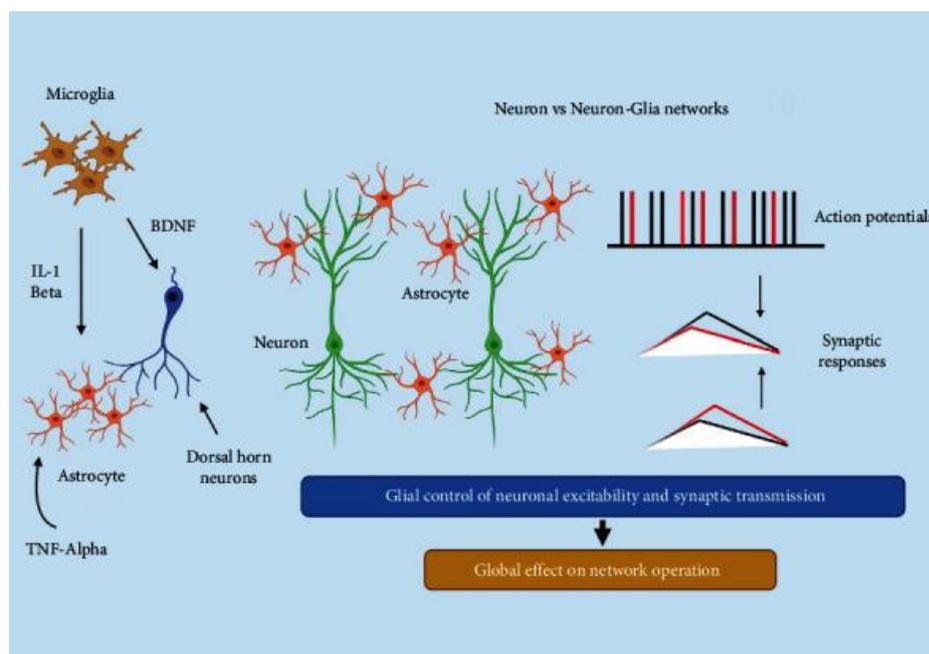


Рисунок 4. Схематическое изображение нейрон-глиальной сети. Астроциты (красные) взаимодействуют с нейронами (зеленые) и влияют на их возбудимость и синаптические ответы, изменяя функционирование нейронной сети. Справа черный и красный маркеры показывают активность нейронов и глии (Rahman et al., 2022)

Было также продемонстрировано, что запуск кальциевых волн астроцитов влияет на синаптическую передачу и зависит от регулируемого экзоцитоза глутамата, АТФ и D-серина (Bezzi et al., 2004; Cocco et al., 2003; Mothet et al., 2005; Pascual et al., 2005). Таким образом, к пре- и постсинаптическим компонентам нейрональной передачи дополнились новые элементы - окоლოსинаптическая глия, образуя структуру, получившую название, «трехсторонний синапс» (Araque et al., 1998; Bazargani & Attwell, 2016; Noriega-Prieto and Araque, 2021).

Кальциевая волна — это локальное повышение концентрации цитоплазматического Ca^{2+} , которое запускает последовательность подобных событий волнообразным образом. Эти кальциевые волны могут быть

ограничены одной клеткой (внутриклеточные) или передаваться между астроцитами (межклеточные) (Leybaert & Sanderson, 2012). Ключевыми механизмами, вызывающими запуск внутриклеточных волн Ca^{2+} , обычно являются активация рецепторов, ассоциированных с G-белком, что ведет к активации фосфолипазы C и синтезу IP₃, который связывается с рецепторами IP₃R на мембране эндоплазматического ретикулума, что приводит к высвобождению Ca^{2+} в цитоплазму (рис. 5). Далее внутриклеточные волны Ca^{2+} могут передаваться в соседние клетки в виде межклеточных кальциевых волн двумя возможными механизмами - переносом Ca^{2+} - мобилизующих вторичных мессенджеров (в основном- IP₃) непосредственно из цитозоля одной клетки в цитозоль соседних через гап-контакты, либо путем «de novo» генерации таких мессенджеров в соседних клетках за счет активации мембранных рецепторов вследствие внеклеточной диффузии агонистов (Bock et al., 2014).

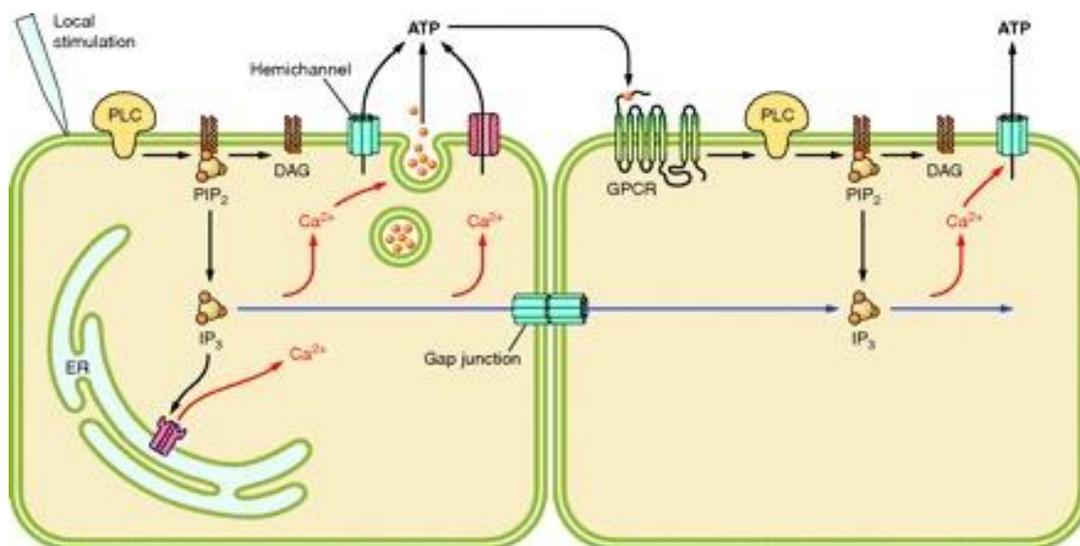


Рисунок 5. Схема распространения межклеточной кальциевой волны между астроцитами. Локальная стимуляция может привести к повышению IP₃ в клетке-инициаторе. Когда IP₃ диффундирует через эту клетку, он индуцирует внутриклеточную Ca^{2+} -волну за счет высвобождения Ca^{2+} из ЭПР через RyR. Диффузия IP₃ через щелевой контакт в соседнюю клетку инициирует вторую внутриклеточную Ca^{2+} -волну, опосредованную взаимодействием IP₃R и RyR. Кроме того, стимулированная клетка может высвобождать АТФ (либо Ca^{2+} -зависимым, либо Ca^{2+} -независимым образом) через каналы плазматической мембраны (гемиканалы и др.) или везикулярное высвобождение.

Внеклеточная диффузия АТФ к соседним клеткам активирует рецепторы P2, которые, в свою очередь, стимулируют продукцию IP3 для генерации Ca²⁺ сигнала в соседней клетке. Эти механизмы могут реализовываться как изолированно, так и синергически (Leybaert & Sanderson, 2012)

Ключевую роль в формировании астроцитарных конгломератов играют щелевые межклеточные каналы (гап-контакты), образованные белками-коннексинами 30 и 43 (Cx30 и Cx43). Через них осуществляется обмен ионов, метаболитов и нейромодуляторов, опосредующих сигнализацию в масштабе сети (Pannasch & Rouach, 2013). Экспрессия и функции коннексинов, обеспечивающих такую межклеточную связь, были описаны в норме, а также исследованы при некоторых патологиях - преимущественно при эпилепсии и нейроонкологических заболеваниях (Caltabiano et al., 2010; Collignon et al., 2006; Fonseca et al., 2002; Vasile et al., 2017). Эти данные позволяют предположить, что изменения межастроцитарных контактов играют значимую роль в патогенезе различных заболеваний.

Открытие кальциевого сигналинга в астроцитах дало начало развитию концепции функционального астроцитарного синцития, формирующегося между астроцитами за счет щелевых контактов (Scemes & Giaume, 2006). Было показано, что гап-контакты могут снижать электрическое сопротивление между соединенными астроцитами. В результате соседние клетки могут постоянно выравнивать свои мембранные потенциалы до сопоставимых уровней, так что весь синцитий может электрофизиологически вести себя как единое целое, что было названо синцитиальной изопотентностью и впервые продемонстрировано на астроцитах гиппокампа (Ma et al., 2016). Позже синцитиальная изопотентность была также обнаружена в астроцитах серого вещества спинного мозга (W. Huang et al., 2018).

В настоящее время помимо концепции астроцитарного синцития, активно развивается гипотеза о существовании астроцитарных сетей с более специализированной организацией (Claus et al., 2016; Houades et al., 2008; Roux

et al., 2011). Первым свидетельством этого явился тот факт, что после введения внутриклеточного красителя в отдельные астроциты, были обнаружены немеченые астроциты, расположенные в периметре диффузии красителя (Claus et al., 2016; Houades et al., 2008; Roux et al., 2011). Механизм, лежащий в основе этой преференциальной связи, еще предстоит исследоваться. Известно, что не все соседние астроциты функционально связаны с помощью щелевых контактов (Houades et al., 2006; Houades et al., 2008; Roux et al., 2011), что может быть связано с гетерогенной экспрессией коннексинов Roux Cx43 и Cx30 в астроцитах или функционированием четких глиальных популяций, возникающих в результате распределения астроцитов в определенных пространственных доменах во время развития (Tsai et al., 2012). Тот факт, что субпопуляции астроцитов можно различить по их морфологическим, молекулярным и функциональным свойствам, предполагает, что гетерогенность астроцитов может поддерживать преференциальные связи сети и способствовать точности локальной обработки нейрональной информации, способствуя астроцитарным взаимодействиям с соседними нейронами (Oberheim et al., 2012; Theis & Giaume, 2012; Verkhratsky, 2019).

1.1.4.2. Влияние ишемии на функционирование нейрон-глиальных сетей

Нейронные сети могут подвергаться процессу реконфигурации и реструктуризации как в ходе развития нейронной сети, так и под влиянием различных повреждающих воздействий. Реструктуризация сети может быть связана с изменением количества нейронов, в том числе их гибелью, изменением их связности или активности составляющих сеть элементов. Процессы реконфигурации могут также включать изменения в количестве соединений и/или прочности и силы связи между элементами сети. Такие изменения позволяют биологическим нейронным сетям формировать различные топологии для выполнения разнообразных функций или изменять свои реакции в ответ на различные физиологические или патологические состояния. Таким образом, нейронные сети не являются жестко

структурированными, а представляют собой гибкие функциональные схемы, которые можно постоянно перенастраивать в ответ на различные стимулы (Peña-Ortega, 2017).

Ишемия является одним из самых распространенных патологических процессов, вызывающих гибель нервных клеток. Безусловно, исследование функционирования нейронных сетей, в том числе и при различных патологиях, не может быть ограничено изучением только одного компонента сети, требуется рассмотрение эмерджентных свойств, возникающих в результате динамических взаимодействий между элементами всей сети (de Vico Fallani et al., 2014). Однако исследований, посвященных изучению нейросетевой активности при ишемическом и гипоксическом повреждении, сравнительно немного.

Например, в работе Kuebler et al. исследовали активность нейронных сетей в культурах нейронов при моделировании церебральной ишемии *in vitro*. Нейрональные культуры культивировали на протяжении 17 дней. Были идентифицированы предикторы (инициаторы) возникновения пачек импульсов как те электроды, которые последовательно активировались непосредственно перед сетевыми пачками. Часть культур подвергали моделированию эксайтотоксического воздействия (апликация глутамата) на DIV 18, что привело к гибели части клеток в этих культурах. Несмотря на снижение частоты генерации пачек импульсов, предикторы их возникновения сохраняли исходный уровень активности. Устойчивость предикторов после моделирования эксайтотоксического инсульта предполагает ключевую роль этих функциональных единиц в поддержании сетевой активности после повреждающего воздействия, что важно для объяснения избирательных повреждающих эффектов ишемии в головном мозге (Kuebler et al., 2016).

Joost le Feber с соавт. исследовали влияние транзиторной гипоксии различной интенсивности (10-90% содержания кислорода от нормального уровня) и продолжительности (6-48 ч) на активность и функциональную связность нейронных сетей с использованием первичных культур нейронов

коры головного мозга мыши. Показано, что дефицит кислорода приводил к быстрому снижению биоэлектрической активности. Снижение активности было обратимым, если интенсивность и продолжительность гипоксического эпизода были достаточно легкими (4-6 часов) (рис. 6). Выявлено два периода восстановления сетевой активности: первый в интервале 6-18 ч после индукции гипоксии и второй после возврата к нормоксии. При частичном восстановлении функциональной активности после гипоксического повреждения преобладали восстановленные исходные связи, а не вновь образованные. Восстановление сетевой активности после реоксигенации подтверждает обратимость синаптической недостаточности при восстановлении доступности АТФ (le Feber et al., 2017).

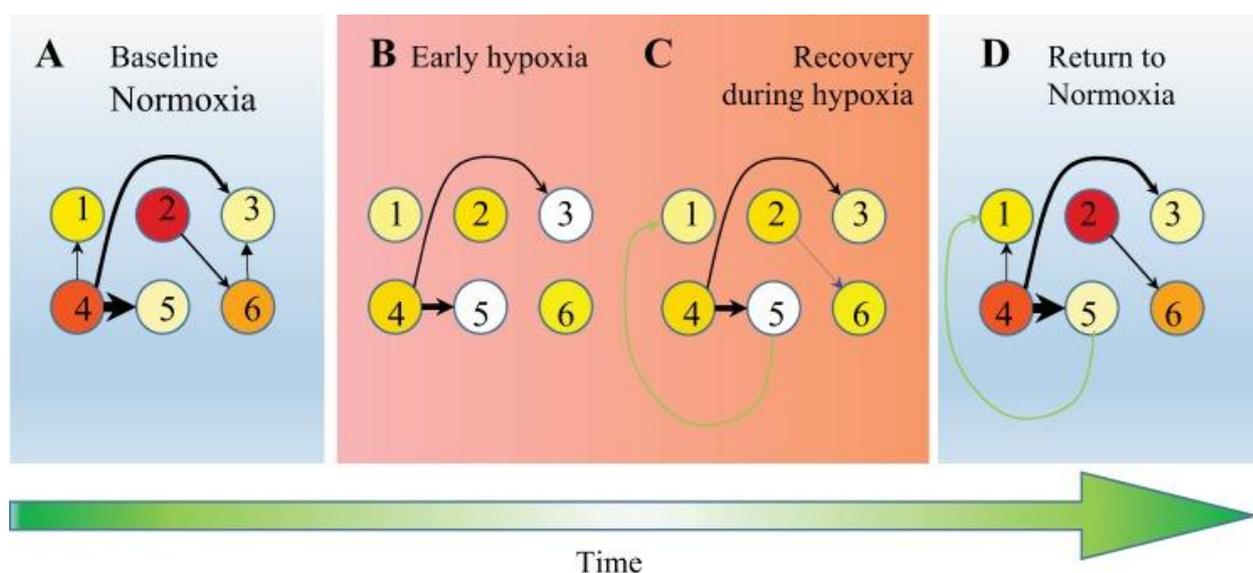


Рисунок 6. Схематическое изображение активности и изменения связей в нейронных сетях во время и после гипоксии (le Feber et al., 2017)

Большой интерес представляет исследование Pires Monteiro с соавт., в котором нейроны, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от здорового донора, культивировали на мультиэлектродных матрицах. Показано, что гипоксическое повреждение ведет к снижению активности и синхронности сигналов в сети в условиях низкого содержания кислорода. При этом степень восстановления активности

(полная, частичное или отсутствие восстановления) зависела от времени реоксигенации. Авторами было также показано, что гипоксическое прекондиционирование улучшает устойчивость ко второму гипоксическому инсульту (Pires Monteiro et al., 2021).

С точки зрения исследования роли глиальных клеток в нейросетевой активности при различных повреждениях интерес вызывает тот факт, что в результате травм, патологий или стрессорных факторов астроцитарные сети могут морфологически и функционально перестраиваться (Charvériat et al., 2017). Например, локальные (невзаимодействующие) сети реактивных астроцитов могут начинать взаимодействовать (Oberheim et al., 2008). В частности, после последовательности эпилептических припадков процессы, протекающие в отдельных доменах астроцитов, распространяются на соседние, что свидетельствует о реорганизации астроцитарной сети. Существуют работы, свидетельствующие о том, что хронический стресс вызывает дегенерацию белка цитоскелета GFAP астроцитов в префронтальной коре, вызывая морфологические изменения астроцитарных сетей (Tynan et al., 2013).

Известно, что по сравнению с нейронами астроциты являются более устойчивыми к кислородной и глюкозной депривации. Показано, что астроциты, выделенные из разных областей мозга, таких как кора, стриатум и гиппокамп, отличаются своей чувствительностью к кислородной и глюкозной депривации (Ouyang et al., 2007). Большинство нейронов в нейрон-астроцитарных культурах погибает после 60-90 мин и даже 20 мин моделирования кислородной и глюкозной депривации, в то время как выживаемость культур астроцитов составляет 4-6 часов. Также показано, что протоплазматические астроциты теряют свою целостность быстрее, чем фиброзные астроциты, что может объяснить различия восприимчивости к ишемии между фиброзными астроцитами белого вещества и протоплазматическими астроцитами серого вещества. Кроме того, в рамках изучения воздействия различных стресс-факторов, было обнаружено, что

ацидоз – нарушение кислотно-щелочного баланса в организме, является губительным фактором для астроцитарных культур (Barreto et al., 2011). С другой стороны, известно, что ишемия приводит к дефосфорилированию гар-контактов (Cx43) и частичной потери взаимодействия между астроцитами, что так же может существенно влиять на функциональность астроцитарной сети (W. E. I. Li et al., 1998) и, следовательно, на нейронную активность. Кроме того, астроцитарные сети являются одним из важнейших путей, регулирующих бесперебойное снабжение нейронов энергетическими субстратами. Однако на сегодняшний день крайне мало работ, посвященных исследованию функциональных перестроек астроцитарных сетей при действии повреждающих факторов ишемии

1.2. Нейродегенеративные заболевания и ишемическое повреждение.

Болезнь Альцгеймера

1.2.1. Гипоксия как триггер развития болезни Альцгеймера

Гипоксия играет ключевую роль в патогенезе множества неврологических расстройств, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и других ассоциированных с возрастом нейродегенеративных заболеваний (Burtscher et al., 2021). Второй по распространенности после ишемического повреждения патологией ЦНС является развитие нейродегенеративных процессов, прежде всего болезни Альцгеймера. В последние годы все больше подтверждений получает парадигма, согласно которой эпизод гипоксии/ишемии головного мозга может быть одним из основных пусковых факторов, которые провоцируют развитие деменции и/или болезни Альцгеймера. Например, ряд работ свидетельствуют, что гипоксия в перинатальном периоде может быть пусковым фактором развития болезни Альцгеймера во взрослом возрасте (Tarkowska, 2021).

Также интересен ряд работ, свидетельствующих, что апноэ и гипоксия во сне коррелирует с развитием болезни Альцгеймера. Более 70% пациентов с

деменцией имели расстройства дыхания во сне (Mullins et al., 2020; Osorio et al., 2015).

Последние экспериментальные данные указывают на то, что отдаленное постишемическое повреждение головного мозга связано в том числе с накоплением белков, подвергшихся неправильному фолдингу, таких как амилоид и тау-белок, как внутри нейронов, так и во внеклеточной нервной ткани. Показано как при экспериментальном моделировании ишемии, так и у пациентов, перенесших ишемический инсульт, что после ишемического эпизода возможно развитие деменции по типу болезни Альцгеймера. Ишемия/реперфузия может вызвать патологию укладки белков, характерную для болезни Альцгеймера, путем образования и накопления амилоида (Pluta et al., 2020; Zetterberg et al., 2011), а также патологический фолдинг тау-белка, что также играет важную роль в прогрессировании нейродегенерации головного мозга в постишемическом периоде (Pluta, Bogucka-Kocka, et al., 2018; Pluta, Ułamek-Kozioł, et al., 2018; Randall et al., 2013).

Хроническая гипоксия вызывает развитие нейровоспаления за счет активации микроглии, резидентных иммунных клеток в головном мозге. Хроническое воспаление является неотъемлемым компонентом нейродегенеративных процессов. Это приводит к увеличению количества активных форм кислорода и провоспалительных цитокинов, характерных для многих дегенеративных заболеваний центральной нервной системы (Hambali et al., 2021). Также интересно, что помимо активации микроглии по воспалительному профилю M1, вероятно гипоксия/ишемия, увеличивает на клетках микроглии экспрессию CD33 и его нижестоящей мишени SHP-1, тирозинфосфатазы, которая подавляет фагоцитоз, управляемый TREM2. В результате микроглия не фагоцитирует амилоидные конгломераты, что ведет к накоплению бляшек в тканях головного мозга. Кроме того, гипоксия/ишемия увеличивает отложение сialiрированных ганглиозидов, например, GM1, GM2, GM3 и GD1, которые являются лигандами для ингибирующих рецепторов CD33/Siglec-3 (Salminen et al., 2021).

Также ведет к активации микроглии и развитию нейровоспаления прерывистая гипоксия, характерная для нарушений дыхания во сне. Сходные нейроиммунные изменения были описаны при нарушениях дыхания во сне и развитии БА (Ulland et al., 2021).

Таким образом, гипоксия играет ключевую роль в патогенезе множества неврологических расстройств, включая болезнь Альцгеймера и другие возрастные нейродегенеративные заболевания (рис. 7).

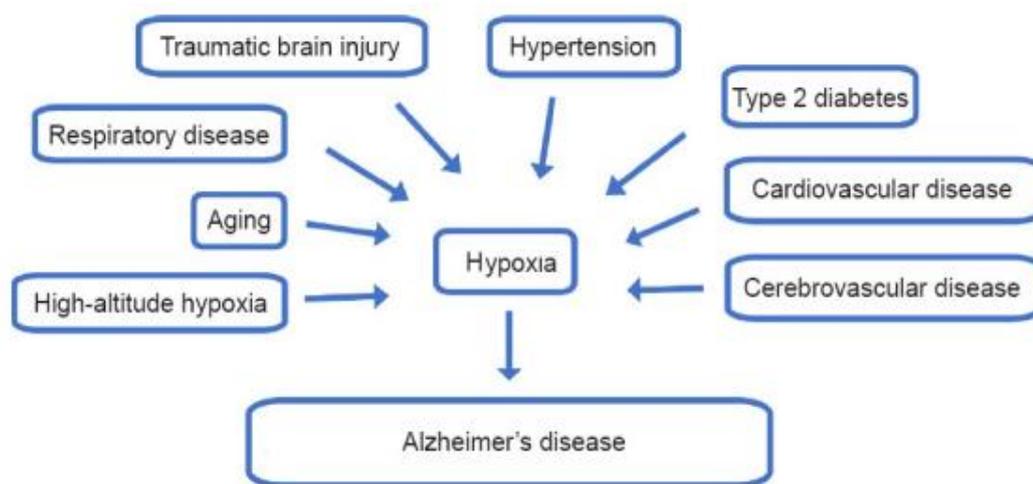


Рисунок 7. Гипоксия как фактор риска развития болезни Альцгеймера (Yang et al., 2022)

1.2.2. Патогенетические особенности болезни Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера – это медленно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, являющееся наиболее частой причиной деменции у людей пожилого и старческого возраста. Болезнь Альцгеймера была впервые описана как “предстарческая деменция (слабоумие)” в 1906 году немецким психиатром Алоисом Альцгеймером. В 1901 году Альцгеймер наблюдал пациента Августу Д., у которого наблюдалась прогрессирующая потеря когнитивных функций. После смерти Августы в апреле 1906 г., Альцгеймер исследовал её мозг post-mortem с помощью ряда гистологических методик, описав многочисленные просообразные очаги в верхних слоях коры. Позже Эмиль Крепелин, известный немецкий психиатр и коллега Альцгеймера,

предложил использовать эпоним “Болезни Альцгеймера” вместо “предстарческой деменции”. В настоящее время БА известна как хроническое нейродегенеративное заболевание и является наиболее распространенной формой старческого слабоумия. В развитых странах БА диагностируется у 27% людей в возрасте 65–74 лет и у 37% людей в возрастной группе 75–84 лет (Rajan et al., 2015). В то же время в последние годы наблюдается все более ранняя манифестация БА, и на сегодня 10% случаев зарегистрировано у людей моложе 65 лет. Клинические симптомы БА включают такие проявления, как прогрессирующая потеря памяти, зрительно-пространственные нарушения, речевые нарушения, такие как афазия, потеря исполнительных функций (Lane et al., 2018).

Существует две формы болезни Альцгеймера: семейная и спорадическая. Спорадическая (несемейная) форма болезни Альцгеймера чаще всего проявляется у пациентов после в возрасте 60-65 лет. Она развивается на фоне естественных процессов старения, при этом разворачиваются специфические для синдрома Альцгеймера события, центральные из которых — отложения амилоида в коре больших полушарий головного мозга и гиппокампе и созревания сенильных бляшек. Это вызывает целый каскад молекулярных изменений, которые приводят к дисфункции и гибели нервных клеток, что клинически выражается прогрессирующей деменцией. В тканях мозга отмечается дефицит холинэргических нейронов, развитие окислительного стресса, повышенный уровень провоспалительных цитокинов и глутамата (Rajan et al., 2015).

В то время как у подавляющего большинства пациентов болезнь Альцгеймера возникает на спорадической основе, для семейной формы характерны мутации в трех генах: в 21 хромосоме в белке-предшественнике амилоида (APP), в 14 хромосоме в белке пресенилине 1 (PSEN1) и в 1 хромосоме в белке пресенилине 2 (PSEN2). Симптомы развиваются раньше, чем при спорадической болезни Альцгеймера, обычно между 30 и 50 годами жизни. У людей, которые наследуют мутации пресенилина-1,2 раньше

выявляют признаки развития болезни Альцгеймера. В таких семьях данные мутации передаются по аутосомно-доминантному типу с вероятностью 50% для каждого поколения. (Lane et al., 2018) Мутации в *APP*, *PSEN1* или *PSEN2* с вероятностью 100% вызывают патологическое состояние. Более того, можно быть уверенным, что носитель симптоматической аутосомно-доминантной мутации имеет нейропатологическое изменение даже без использования биомаркеров (Jack et al., 2018).

Ключевую роль в патогенезе болезни Альцгеймера играет агрегированный амилоидный бета-пептид (A β 42). Участки мозга, вовлеченные в патогенез БА на ранних стадиях - энторинальная область фронтальной коры и СА1 регион гиппокампа, с последующим вовлечением лимбической системы, на поздних стадиях – неокортекс (Braak and Braak, 1995). Нейродегенеративный процесс характеризуется поражением синапсов, сопровождающейся ретроградной дегенерацией аксонов и последующей атрофией дендритного дерева. Потеря синапсов хорошо согласовывается с когнитивными нарушениями у людей с болезнью Альцгеймера. Нейропатологические изменения включают образование многочисленных внеклеточных амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков, состоящих из гиперфосфорилированного тау-белка (Bourdenx et al., 2017).

Изучение патогенеза данного заболевания привело к появлению множества гипотез развития патологии, однако, несмотря на значительный прогресс нейробиологии и медицины, многие аспекты развития БА остаются нераскрытыми. Две наиболее распространенные на сегодняшний день гипотезы патогенеза БА – это амилоидная гипотеза и тау-гипотеза. Амилоидная теория предполагает, что ключевой причиной развития нейродегенеративных процессов при БА является амальное накопление амилоидных бляшек в различных отделах головного мозга, являющееся триггером, запускающим повреждение синапсов и отростков нейронов, что ведет к дисфункции и последующей клеточной смерти (Evin and Weidemann, 2002). Согласно тау-гипотезе нейропатологически БА ассоциируется с

внутриклеточным нейрофибрилярным поражением, представляющим собой так называемые нейрофибрилярные клубки, состоящие из тау-белка (Trojanowski and Mattson, 2003; Forman et al., 2004).

Таким образом, БА классифицируется как протеинопатия, развивающаяся вследствие нарушения метаболизма белка-предшественника амилоида (Amyloid precursor protein, APP) и тау-белка (Nussbaum et al., 2013; Walker et al., 2013). Ключевыми патологическими событиями является потеря белковой молекулой ее нормальной конформации, вследствие чего олигомеры белков, относительно токсичные для нервных клеток, собираются в более сложные конечные структуры, которые уже являются инертными. Это характерно как для А β , так и для тау-белка (Khlistunova et al., 2006; Walsh et al., 2020). Нарушение когнитивных функций коррелирует именно с количеством олигомеров, а не с общим количеством патологического белка (Oddo et al., 2006; SantaCruz et al., 2005).

APP относится к трансмембранным белкам 1-го типа. Процессинг белка может проходить двумя способами: амилоидогенным и неамилоидогенным. А β является продуктом последовательного расщепления APP под действием ферментов β - и γ -секретаз (амилоидогенный путь) (Рис. 8). Сайт расщепления другого фермента находится в А β участке, что и препятствует его дальнейшему образованию и накоплению, за данный путь процессинга отвечает фермент α -секретаза.

Тау-протеин кодируется геном MAPT, расположенным на хромосоме 17 и состоит из шести изоформ (Lauretti & Praticò, 2020). Он участвует в связывании микротрубочек (MAP), аксональном транспорте и модуляции сигнальных путей. Посттрансляционные модификации, включая фосфорилирование, могут привести к его агрегации и нейротоксичности (рис. 9). Аномально фосфорилированный тау-белок может влиять на пресинаптические и постсинаптические компартменты путем нарушения сигнальных каскадов, митохондриальных функций и аксонального транспорта (Soria Lopez et al., 2019).

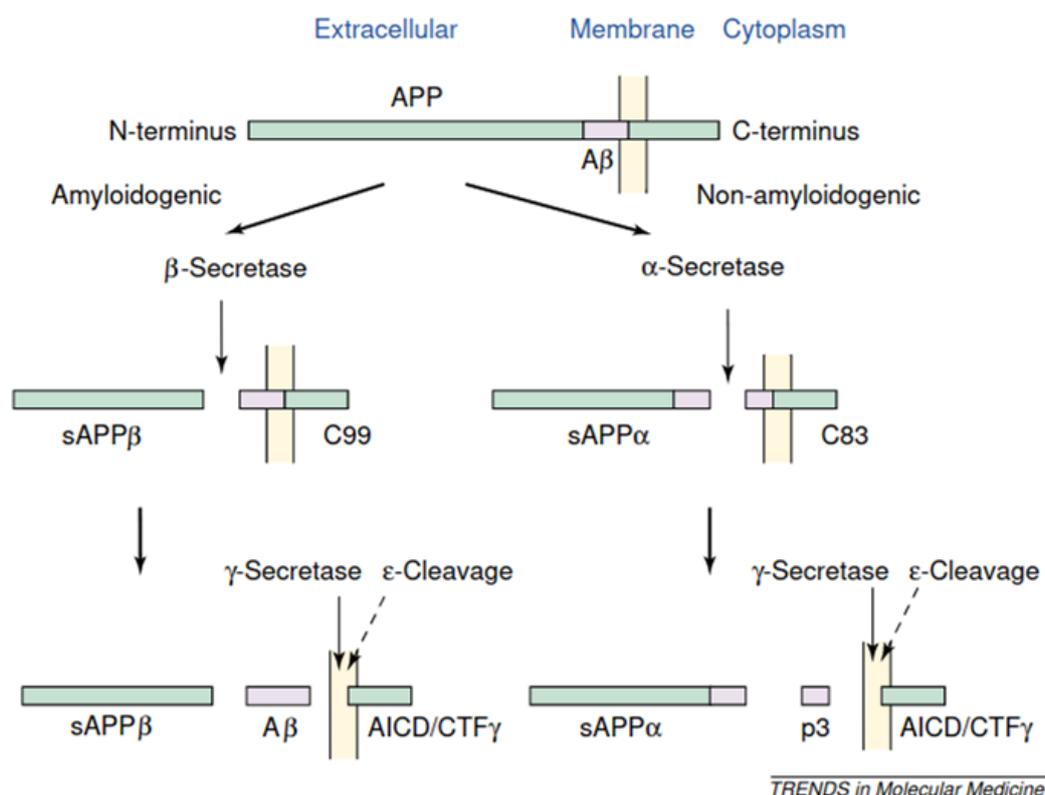


Рисунок 8. Амилоидный и неамилоидный путь созревания APP. APP представляет собой трансмембранный гликопротеин 1-го типа, состоящий из длинного N-концевого внеклеточного сегмента (эктодомена), трансмембранного домена и более короткой внутриклеточной C-концевой части (цитоплазматического домена). A β (фиолетовый прямоугольник) составляет часть трансмембранного домена и прилегающий короткий фрагмент внеклеточного домена. β -секретаза расщепляет APP на N-конце A β с образованием sAPP β и C-концевого фрагмента из 99 аминокислот (C99). C99 далее расщепляется γ -секретазой внутри трансмембранного домена с образованием A β и AICD. Альтернативный путь процессинга - APP обрабатывается α -секретазой с образованием sAPP α и C-концевого фрагмента из 83 аминокислот (C83), который, в свою очередь, расщепляется γ -секретазой с образованием пептида p3 и AICD. Имеются данные о том, что sAPP α обладает нейропротекторными свойствами и что AICD выполняет ядерные сигнальные функции (Vardy et al., 2005)

Доказано, что концентрация тау-белка увеличивается в спинномозговой жидкости при развитии болезни Альцгеймера, что связано с образованием нейрофибриллярных клубков и является индикатором повреждения нейронов. Хотя увеличение количества тау-белка в спинномозговой жидкости не является специфическим для болезни Альцгеймера, оно коррелирует с клинической тяжестью заболевания, повышая его уровень одновременно с увеличением когнитивной недостаточности. (Lloret et al., 2019)

Тау-протеин и А β действуют одновременно, параллельно запуская развитие БА и усиливают токсические эффекты друг друга. (N. M. E. Scheltens et al., 2016). Распространение гиперфосфорилированного тау-белка приводит к региональному распределению нейрофибриллярных клубков (NFT), известному как стадии Браака. Измененный белок тау (гиперфосфорилированный тау, но не нейрофибриллярные клубки) впервые обнаруживается в ядрах переднего мозга, в ядрах ствола мозга и голубого пятна, которые проецируются на область неокортекса. Первые нейрофибриллярные клубки формируются в поверхностном слое трансэнториальной коры (стадия Браака I) и энторинальной коры головного мозга (стадия Браака II). Впоследствии нейрофибриллярные клубки появляются в области гиппокампа (стадия Браака III), в середине височной извилины, верхней височной извилине (стадия Браака IV) и далее в остальной коре (стадия Браака VI). Когнитивные нарушения обычно появляются на стадии III и прогрессируют с каждой последующей стадией (Braak & del Tredici, 2015).

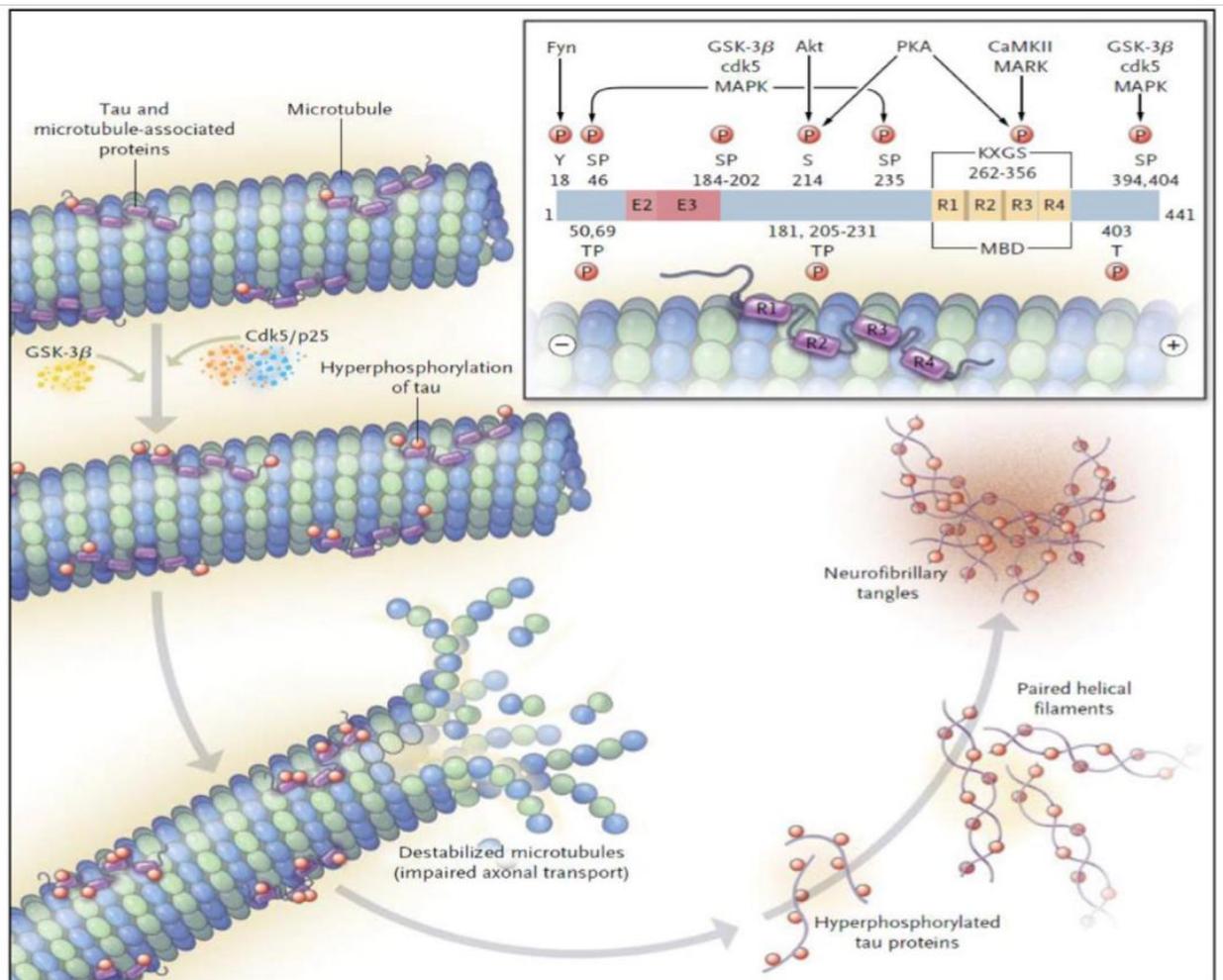


Рисунок 9. Механизм гиперфосфорилирования тау-белка. Показана структура связывающего микротрубочки домена тау-белка с сайтами фосфорилирования (вставка). Гиперфосфорилирование тау киназой гликогенсинтазы 3β (GSK- 3β), циклинзависимой киназой (cdk5) приводило к дестабилизации микротрубочек с последующим отсоединением тау и его самоагрегацией в парные спиральные филаменты (Barage and Sonawane, 2015)

В настоящее время предполагается, что около 70% риска развития болезни Альцгеймера связано с генетическими факторами (Lane et al., 2017). Аполипопротеин E, член семейства аполипопротеинов, один из перспективных молекулярных кандидатов, участвующих вовлечен в патогенезе БА. Ген аполипопротеина E (APOE) имеет три варианта, e2, e3 и e4. APOE4 был идентифицирован как самый вероятный генетический фактор риска БА. Было обнаружено, что он связан с ускоренным накоплением A β , как

в виде амилоида, так и в виде растворимых олигомерных форм $A\beta$ ($\alpha A\beta$), последний считается нейротоксином. (Valu et al., 2019) Вероятность развития болезни Альцгеймера для гомозигот $APOE4$ составляет более 50% и 20–30% - для гетерозигот $APOE3$ и $APOE4$. $APOE4$ препятствует клиренсу $A\beta$ из головного мозга, а также перерабатывается в нейротоксические фрагменты (Scheltens et al., 2016)

Поскольку ключевым признаком для клинической диагностики БА является наличие деменции, ранние, продромальные стадии заболевания зачастую не диагностируются. Безусловно важной проблемой является выявление надежных биомаркеров данного заболевания, которые позволят как можно раньше выявлять наличие патологии, до развития тяжелых выраженных нарушений. На сегодняшний день наиболее используемыми и общепринятыми являются ликворные маркеры: содержание общего тау-протеина, ряда изоформ β -амилоида (например, $A\beta_{42}$), а также различных эпитопов фосфорилированного тау-протеина.

Активно изучаются синаптические биомаркеры, такие как дендритный белок нейрогранин (N. M. E. Scheltens et al., 2016), уровень D-серина в гиппокампе и теменной доле коры больших полушарий (Mantzavinos & Alexiou, 2017). Отмечается, что белок p53 также участвует в развитии БА. Измененный белок p53 индуцирует фосфорилирование тау-белка человека, вызывающее гибель нейронов. В аналогичном исследовании скопления p53 были обнаружены в нейронах на ранних этапах развития болезни Альцгеймера. (Mantzavinos & Alexiou, 2017). Отмечено снижение экспрессии GS белков (белков, стимулирующих аденилатциклазу) при прогрессировании БА в гиппокампе и префронтальной коре (Rodríguez-Arellano et al., 2016). Снижение экспрессии мембранного белка LRP1 в микрососудах головного мозга и эндотелиальных клетках наблюдалось у пациентов с болезнью Альцгеймера и на моделях амилоидных мышей. (Yamazaki & Kanekiyo, 2017). Важным маркером БА может являться снижение рецептора апоЕ-липопротеинов LRP1. АпоЕ-липопротеины доставляют к нейронам

холестерин, и снижение экспрессии LRP1 в конечном итоге приводит к снижению нейронального холестерина и увеличению содержания бета-амилоида (Liu et al., 2007).

Также диагностическое значение могут иметь сосудистые маркеры, связанные с нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера. Было показано, что пациенты обладают повышенным соотношением альбумина в спинномозговой жидкости / сыворотке или спинномозговой жидкости / плазме, что часто используется как показатель нарушения ГЭБ. Показано, что концентрация транспортера глюкозы 1 (GLUT1), специфически экспрессируемого в эндотелиальных клетках головного мозга, значительно снижена в микрососудах головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера и у трансгенных животных с моделью БА. Дефицит GLUT1 в клетках эндотелия приводит к разрушению ГЭБ, что выражается в снижении количества белков плотных контактов (ТТ-белков) - окклюдина, клаудина-5 и ZO-1 в капиллярах с отложениями амилоида, и сопровождается увеличением утечки фибриногена в паренхиму мозга и внесосудистом накоплении фибриногена и IgG. Кроме того, дефицит GLUT1 также приводит к церебральной микрососудистой дегенерации (Yamazaki & Kanekiyo, 2017). Кроме того, при БА наблюдается утолщение базальных мембран микрокапилляров. Иммуногистохимический анализ показал, что концентрация компонентов базальной мембраны, включая коллаген IV, перлекан и фибронектин, были повышены во фронтальной и височной коре головного мозга у пациентов с БА (Yamazaki & Kanekiyo, 2017).

1.2.3. Астроциты и их роль в патогенезе БА

Глиопатология – это важный компонент большинства неврологических заболеваний. Общеизвестным является то, что глиальные клетки также участвуют в патогенезе болезни Альцгеймера. Патологические изменения нейроглии при болезни Альцгеймера наблюдал еще Алоис Альцгеймер, который обнаружил глиальные клетки в тесной связи с поврежденными

нейронами; он также впервые выявил связь глиальных клеток с сенильными бляшками. (Rodríguez-Arellano et al., 2016)

Астроциты выполняют множество различных функций, таких как поддержание ионного гомеостаза в тканях мозга, нейротрофическая поддержка нейронов, стимуляция образования синапсов, формирование гематоэнцефалического барьера, регуляция синаптической передачи, защита и регенерация центральной нервной системы и многие другие (Singh & Joshi, 2017). Отмечается, что астроглиальные изменения при болезни Альцгеймера очень гетерогенны и регионально-специфичны (Verkhatsky, 2019). У трансгенных животных с болезнью Альцгеймера астроциты подвергаются дегенерации и атрофии на ранних этапах развития патологии, что приводит к формированию раннего когнитивного дефицита (Rodríguez-Arellano et al., 2016).

Астроциты участвуют в деградации и удалении А β из межклеточного пространства, поскольку они экспрессируют различные типы протеаз, участвующих в ферментативном расщеплении А β . В работах Dorfman et al., 2010; Ries & Sastre, 2016 высказывается предположение, что патологические изменения металлоэндопептидаз, например, металлоэндопептидазы IDE, а также металлопептидаз (MMP-2 и MMP-9) могут быть важным патологическим механизмом при позднем начале болезни Альцгеймера.

В ходе развития нейродегенеративных процессов наблюдается гипертрофия и активация астроцитов. Этот процесс называется реактивным астроглиозом и приводит к запуску ряда молекулярных каскадов, в том числе сигнальных каскадов JAK/STAT3, MAPK, CN/NFAT и NF κ B (рис. 10). Известно, β -амилоид взаимодействует с многочисленными клеточными рецепторами на мембране астроцитов, включая TLR, рецепторы-мусорщики (SR - scavenger receptor), рецепторы гликопротеинов и липопротеинов, RAGE-рецептор, рецепторы ацетилхолина, рецепторы комплемента и хемокинов и др. Несмотря на то, что роль многих из этих рецепторов в патогенезе БА еще недостаточно изучена, известно, что активация RAGE вызывает

воспалительные изменения в астроцитах при воздействии Аβ. Основным внутриклеточным путем, активируемым через RAGE, является путь NF-κB (Tobon-Velasco et al., 2014), хотя он также может активировать другие нижестоящие пути, включая Cdc42-Rac, p21ras и MAPK, JNK и ERK (González-Reyes et al., 2017).

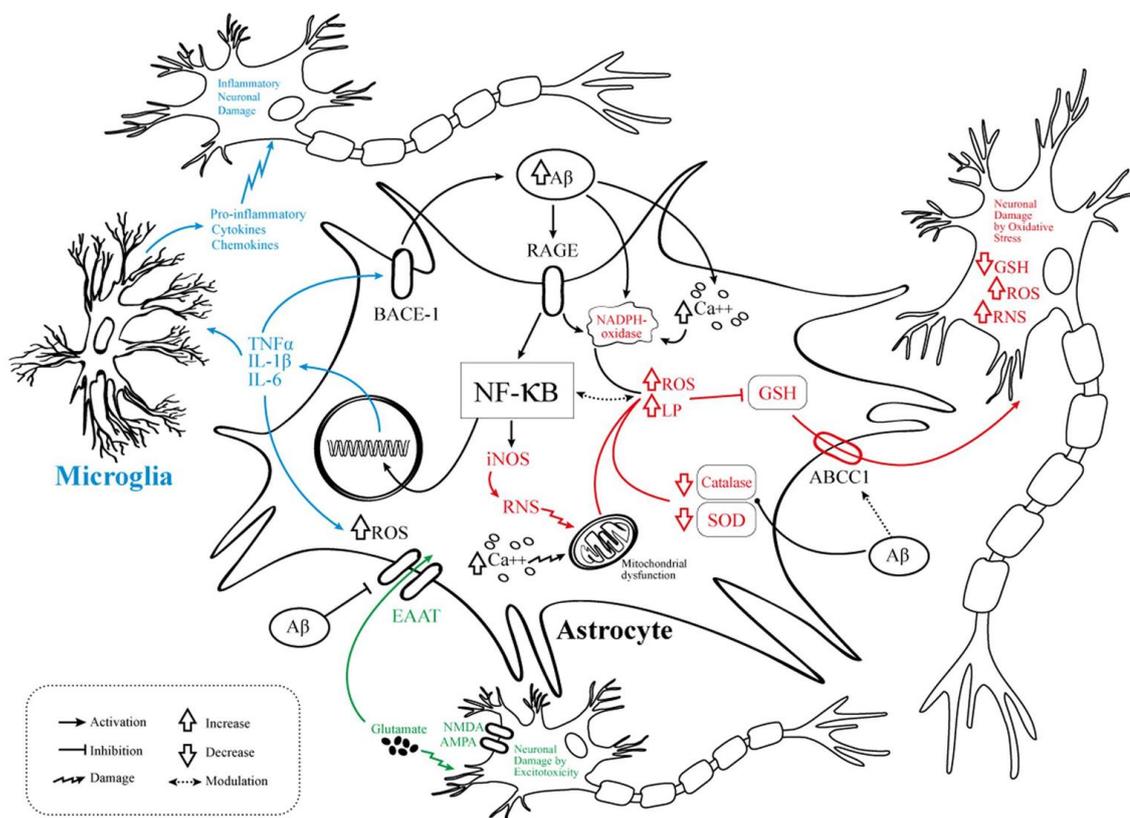


Рисунок 10. Патофизиологические события с участием астроцитов при БА. Схематическое изображение молекулярных механизмов, связывающих активацию пути NF-κB с патогенезом БА. Окислительный стресс, аномальный нейровоспалительный ответ и эксайтотоксическое повреждение нейронов связаны с несколькими путями дисфункции астроцитов. Черным цветом показаны элементы, общие для трех механизмов, а именно взаимодействие Аβ/RAGE/NF-κB. Синим цветом показаны элементы, связанные с нейровоспалением. Красным цветом отмечены элементы, относящиеся к окислительному стрессу. Зеленым цветом обозначены элементы, относящиеся к нейротоксичности/эксайтотоксичности. (Gonzalez–Reyes et al., 2017)

Предполагается, что активация транскрипционного фактора NF-κB является одним из ключевых молекулярных каскадов, связанным с нейровоспалением при БА (Shi et al., 2016). Канонический путь активации NF-κB включает активацию различных рецепторов, включая RAGE и рецепторы цитокинов (TNF, рецептор IL-1 и семейство TLR рецепторов), что ведет к активации нижележащих мишеней, киназ IKKα IKKβ и NEMO (отвечающих за деградацию цитоплазматического ингибитора IκBα), и дальнейшее формирование комплекса NF-κB (B. Marcu et al., 2010; Wan & Lenardo, 2010). Неканонический путь, также известный как NEMO-NF-κB-независимый путь, происходит, когда NF-κB активируется путем специфического рекрутирования TRAF2 и TRAF3 и включает p52 и RelB (Morgan & Liu, 2011). Оба типа активации NF-κB показаны в астроцитах при их стимуляции Aβ, но до сих пор неясно, какой тип преобладает при БА (González-Reyes et al., 2017). Однако, продемонстрировано, что активация NF-κB в астроцитах приводит к нарушениям строения синапсов и морфологии дендритов, а также стимулирует продукцию медиаторов воспаления астроцитами, тем самым способствуя нейродегенеративным изменениям (Fakhoury, 2018).

Важно отметить, что атрофия астроглии возникает в различных областях мозга до появления внеклеточного отложения β-амилоида. Морфологическая атрофия астроглиальных клеток проявляется в уменьшении числа их контактов с синаптическими окончаниями. Атрофия астроглии может быть напрямую связана со снижением астроглиальной гомеостатической и нейротрофической поддержки, что может иметь тяжелые последствия для выживаемости нейронов и функциональной активности синапсов. Кроме того, при атрофии астроглии уменьшается покрытие клетками сосудов головного мозга, что способствует сосудистому дефициту на ранних стадиях болезни Альцгеймера (Rodríguez-Arellano et al., 2016).

При анализе изменений экспрессии глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), классического маркера астроглиоза, на модели мышей 3xTG-AD, наблюдалось снижение экспрессии GFAP на ранних стадиях заболевания до

образования бляшек. Похожая астроглиальная атрофия была охарактеризована в других моделях, включая трансгенных мышей PDAPP-J20, 5xTG-AD и Swiss 3. Атрофия астроглии была обнаружена также в тканях головного мозга пациентов с БА и в астроцитах, полученных из плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациентов с семейной и спорадической формами болезни Альцгеймера (Verkhatsky, 2019). Астроциты у пациентов с болезнью Альцгеймера имеют упрощенную морфологию, уменьшенную гетерогенность и аномальную локализацию ключевых функциональных маркеров астроглии (рис. 11). Астроциты, полученные от пациентов с семейной формой болезни Альцгеймера, также продемонстрировали повышенную продукцию β -амилоида, нарушенный гомеостаз Ca^{2+} , измененный выброс цитокинов, повышение содержания активных форм кислорода (ROS), нарушение нейрозащиты и нейрональной поддержки (Verkhatsky, 2019)

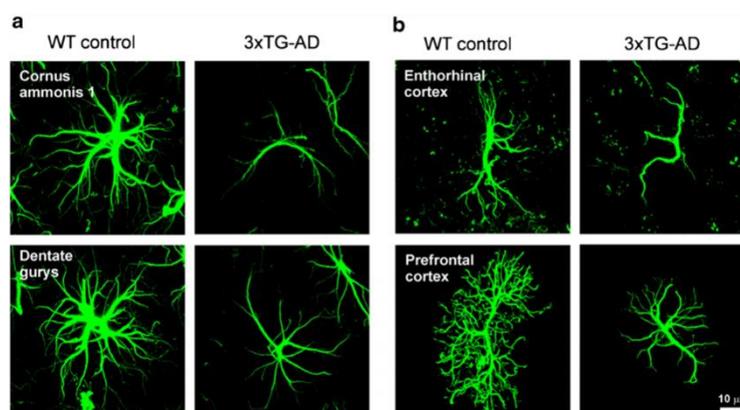


Рисунок 11. Атрофия астроглии в (а) гиппокампе и (б) коре больших полушарий мыши дикого типа (WT) и трансгенной мыши, являющейся моделью БА (3xTG-AD). На изображениях показаны GFAP-окрашенные глиальные клетки (Verkhatsky et al., 2019)

Помимо снижения экспрессии GFAP, в височной коре головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдалось снижение экспрессии мРНК астроцитарного водного канала аквапорина 4 (AQP4). Таким образом,

дисфункция отростков астроцитов во время прогрессирования болезни Альцгеймера может усугублять накопление Аβ, нарушая отток интерстициальной жидкости и как следствие цереброваскулярный клиренс Аβ (Yamazaki & Kanekiyo, 2017).

Однако роль астроцитов на Аβ при болезни Альцгеймера остается предметом дискуссий. С одной стороны, имеются многочисленные свидетельства негативного воздействия активированных астроцитов на ЦНС, связанного с продукцией провоспалительных цитокинов, включая IL-1, IL-6 и TNF-α, что вызывает гибель нейронов. С другой стороны, многочисленные исследования показали, что реактивные астроциты участвуют в клиренсе Аβ *in vitro*, что позволяет предположить роль этих глиальных клеток в ослаблении нейродегенеративных процессов. Более того, нейротрофические факторы, продуцируемые астроцитами, могут оказывать как полезное, так и вредное влияние при болезни Альцгеймера. Например, GDNF, секретируемый астроцитами, улучшает выживаемость нейронов, поддерживает синаптическую передачу и сохраняет когнитивные способности у животных, тогда как сверхэкспрессия фактора роста нервов (NGF) астроцитами приводит к нейротоксичности и дегенеративной потере нейронов (Fakhoury, 2018).

1.2.4. Кальциевая сигнализация нервных клеток при болезни Альцгеймера

Нарушение регуляции Ca²⁺ сигнализации в настоящее время рассматривается как важный компонент развития нейродегенеративных заболеваний в целом и болезни Альцгеймера в частности (Verkhratsky et al., 2017). Еще в 1994 г. С. Хачатурян сформулировал Ca²⁺-гипотезу патогенеза БА, основанную на сходстве процессов, протекающих в нейронах при старении и БА (Khachaturian, 2006). Многие физиологические процессы, опосредованные Ca²⁺, могут переходить в патологический каскад при старении и БА. Например, стареющие нейроны испытывают повышенный приток Ca²⁺ во время фазы деполяризации, что увеличивает концентрацию Ca²⁺ в состоянии покоя, приводя к развитию эксайтотоксичности.

Экспериментально подтверждено острое нарушение Ca^{2+} гомеостаза и передачи Ca^{2+} сигналов в присутствии β -амилоида. Обработка $\text{A}\beta$ (в концентрациях от 100 нМ до 5 мкМ) проводила к увеличению концентрации ионов Ca^{2+} в состоянии покоя в два-три раза по сравнению с исходными уровнями за несколько часов (Verkhatsky et al., 2019).

Известно, что при семейной форме БА развивается дисфункция ЭПР-опосредованной передачи Ca^{2+} сигналов. Группой И.Б. Беспрозванного было показано, что белки-пресенилины могут функционировать как пассивные каналы утечки Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума. Мутации в гене PSEN1 вызывают нарушение стационарного содержания Ca^{2+} в ЭПР в состоянии покоя и способствуют избыточному накоплению Ca^{2+} (Nelson et al., 2007).

Также было показано, что экспрессия рианодиновых рецепторов на нейронах повышена в различных мышечных моделях БА (Bussiere et al., 2017), а лечение дантроленом, ингибитором RyRs, нормализует нарушенную передачу Ca^{2+} сигналов и уменьшает отложение $\text{A}\beta$ (Chakroborty et al., 2012).

$\text{A}\beta$ вызывает как цитозольную, так и митохондриальную перегрузку Ca^{2+} как *in vitro*, так и *in vivo*. Неправильно свернутый и гиперфосфорилированный тау-белок также нарушает гомеостаз Ca^{2+} в митохондриях. Это ведет к дисфункции митохондрий, так они выступают в качестве кальциевого депо для снижения высокой концентрации цитозольного Ca^{2+} в нейронах (рис. 12). При чрезмерном повышении уровня Ca^{2+} в митохондриях происходит усиленная генерация активных форм кислорода и активация процессов апоптоза. Дисфункция митохондрий при БА является важным компонентом патогенеза заболевания и включает митохондриальный окислительный стресс, нарушение биоэнергетики клетки и индукцию апоптоза нейронов (Calvo-Rodriguez & Bacskai, 2021).

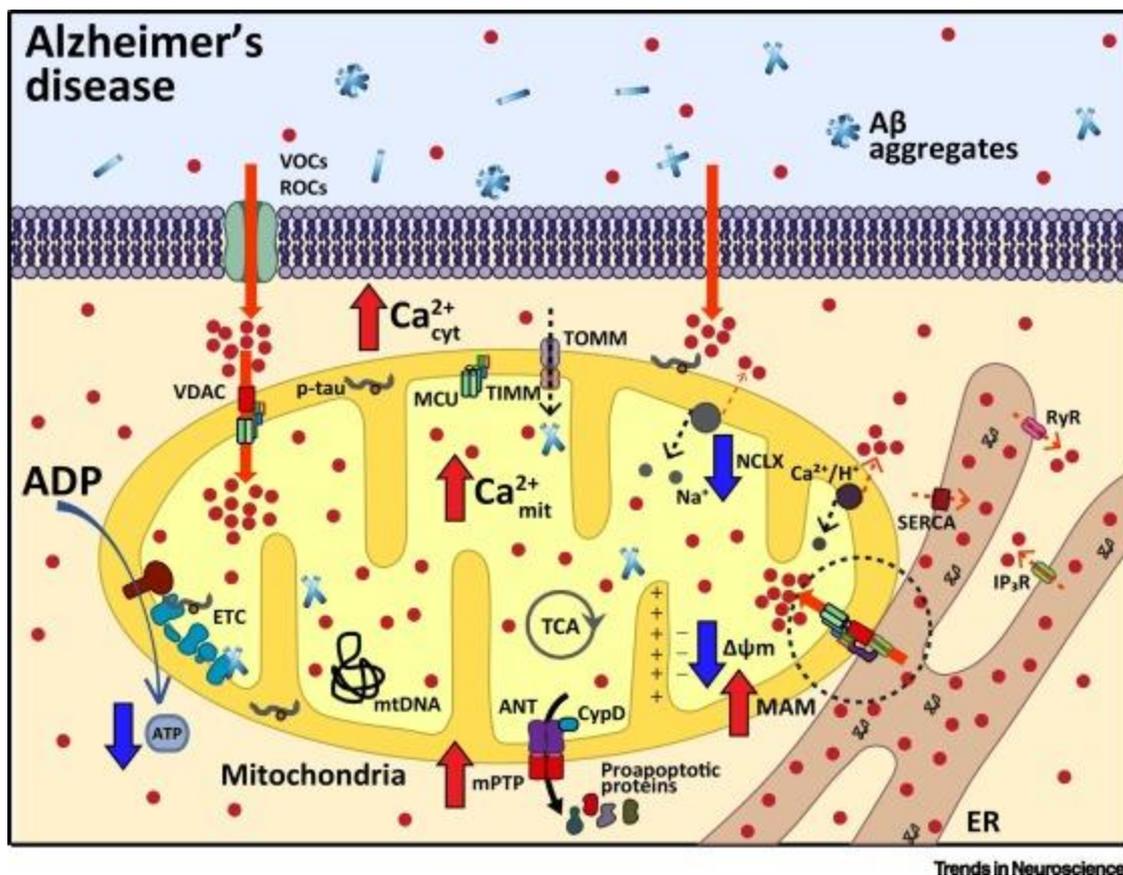


Рисунок 12. Нарушения митохондриального Ca^{2+} гомеостаза при болезни Альцгеймера (Calvo-Rodriguez & Bacskai, 2021).

Изменения кальциевой сигнализации наблюдались также в астроцитах при исследовании мышинных трансгенных моделей БА *in vivo*. Выраженное (двукратное) увеличение концентрации Ca^{2+} в состоянии покоя, а также aberrантная Ca^{2+} активность, связанная с генерацией аномально длительных Ca^{2+} волн, были обнаружены в астроцитах, ассоциированных со старческими бляшками у мышей линии APP / PS1. Контакт астроцитов с β -амилоидом запускает Ca^{2+} колебания, вызванные IP_3 -опосредованным выходом ионов Ca^{2+} из ЭПР. Фармакологическое подавление этих колебаний ингибировало как Ca^{2+} динамику, так и снижало реактивность астроцитов. В других экспериментах у астроцитов была зарегистрирована более высокая частота генерации спонтанных Ca^{2+} событий еще до появления амилоидных бляшек (Verkhatsky et al., 2017). Появление кальциевой гиперактивности, вероятно, связано с аномальной пуринергической передачей сигналов в реактивных

клетках астроглии. Предполагается, что реактивные астроциты выделяют чрезмерное количество АТФ через коннексиновые гемиканалы, который в свою очередь аутокринно действует на пуриноцепторы астроглии P2Y, вызывая чрезмерное усиление кальциевой активности (Verkhatsky et al., 2019).

Морфология и функции астроглии могут регулироваться с помощью различных фармакологических воздействий, поэтому предполагается, что астроциты можно рассматривать как мишень для лечения и профилактики нейродегенеративных расстройств (Habib et al., 2020; Rodríguez-Arellano et al., 2016)

1.2.5. Экспериментальные модели болезни Альцгеймера

В связи со сложным, полиэтиологическим характером болезни Альцгеймера, создание релевантной экспериментальной модели БА является особенно важным. Экспериментальные модели БА можно подразделить на две категории: модели *in vitro* на клеточных культурах и модели *in vivo* на животных. Адекватность любой биологической или математической модели зависит от конкретных задач, которые ставятся перед исследователем и возможных подходов к ее решению. Интересующая нас модель должна позволять изучать изменения нейросетевой активности при БА, оценивать особенности межклеточной сигнализации и влияние терапевтических субстанций на функциональную активность нервных клеток и реорганизацию нейронных сетей (Mitroshina et al., 2020).

Для моделирования семейной формы болезни Альцгеймера необходимо воспроизвести мутации в генах APP и PSEN1, поскольку именно эти мутации обнаруживаются у всех пациентов с данной патологией. Си Хон Чой с соавторами в 2014 году предложили полноценную модель БА с использованием нейрональных прогениторных клеток человека (hNPCs). Для реализации данной модели впервые были созданы поликистронные лентивирусные конструкторы, несущие в себе мутации генов APP человека

K670N / M671L (Шведский), V717I (Лондонский), а также мутации PSEN1 ΔE9 (Рис. 13).

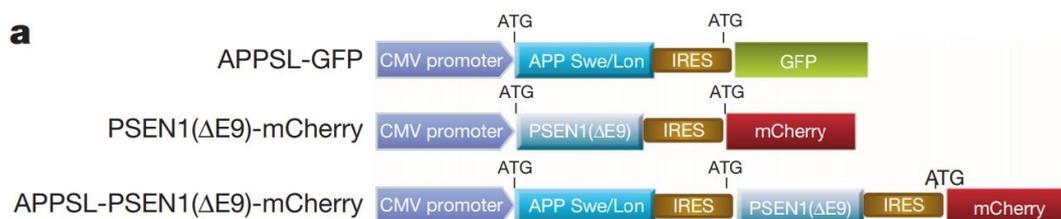


Рисунок 13. Схема лентивирусных конструкторов, несущих мутантные гены семейной формы БА (Choi et al., 2014)

Прогениторные клетки были трансфицированы данными вирусными векторами. Эти векторы содержат в своем составе флуоресцентные метки GFP и mCherry, что необходимо для дальнейшего отслеживания экспрессии генов. В последующие три недели клеточные культуры были про дифференцированы в нейрональные и глиальные клетки. Эта модель явилась первой полноценная 3D моделью БА *in vitro*. Данная модель отличается от большинства прочих тем, что с помощью нее можно изучать взаимосвязь продукции Аβ и образования нейрофибрилярных клубков из гиперфосфорилированного тау-белка (Choi et al., 2014). Однако методически данная модель является достаточно сложной и дорогой.

Другой, принципиально отличной моделью, является модель с использованием гранулярных клетках мозжечка (CGC модель). Для нормального культивирования данного типа клеток необходимо соблюдать повышенный уровень ионов калия в среде (25 mM), предполагается, что это необходимо для поддержания уровня свободного внутриклеточного калия, имитирующего условия постоянной стимуляции, связанной с развитием возбуждающих синапсов. При снижении уровня калия до физиологического 5 mM, происходит активация каспазы 3. Известно, что проапоптотический процесс с низким содержанием калия ведет к активации амилоидного синтеза. Происходит метаболический дисбаланс в сторону β-секретаза-опосредованного созревания APP. Таким образом клетки начинают активно

синтезировать A β (Calissano et al., 2009). Данная модель рассматривает возможный механизм сопряжения нейродегенерации и апоптотических процессов при БА.

Мышиные модели БА отличаются достаточно большим разнообразием. Первой трансгенной линией мышей, несущей трансген, содержащий Индийскую мутацию человеческого APP (V717F), является линия PDAPP, созданная в 1995 году Геймсом и его коллегами. В головном мозге животных данной линии уже в раннем возрасте нарабатывается значительное количество патологического A β 1-42. У мышей PDAPP наблюдались основные патологические проявления БА: накопление амилоидных бляшек, гиперфосфорилирование тау-белка, синаптическая дисфункция. Однако в данной модели не обнаруживались нейрофибриллярные клубки, не наблюдалась нейродегенерация и не было замечено накопление внутриклеточного амилоида. (Games et al., 1995)

Из-за недостатков линии PDAPP вскоре была выведена линия Tg2576, несущая трансген, содержащий Шведскую мутацию человеческого APP (K670N/M671L). У данной линии мышей четко выраженные амилоидные бляшки обнаруживались на 11-13 месяц жизни, однако не было выявлено нейродегенеративных процессов в гиппокампе. Первой относительно полноценной *in vivo* моделью БА стала линия 3xTg-AD, выведенная в 2003 году в лаборатории Оддо. 3xTg-AD является первой линией мышей, несущей помимо мутаций APP и PSEN еще и мутацию тау-белка. У данной линии имеются мутации APP (K670N/M671L), PS1 (M146V) и Tau (P301L), фенотипически 3xTg-AD имеет все признаки БА (Oddo et al., 2003).

Также широкое применение в исследованиях БА получила линия мышей, несущая два трансгена, содержащие все мутации генов семейной формы БА. Линия 5xFAD имеет мутации APP (K670N/M671L, I716V, V717I), PS1 (M146L/L286V), это именно те мутации, которые регистрируются в большинстве случаев проявления семейной БА. Эта модель подходит для изучения теории амилоидного каскада, как причины развития БА, т.к.

фенотипически проявляются все признаки, как накопление вне- и внутриклеточного Аβ, нарушение синаптической передачи и нейродегенерация (Bilkei-Gorzo, 2014).

Сведения о различных линиях трансгенных мышей, используемых в качестве экспериментальных моделей болезни Альцгейера, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Линии трансгенных мышей и фенотипические проявления, характерные для БА (по (Bilkei-Gorzo, 2014)

Название линии	Мутантные гены	Внутриточечный амилоид	Амилоид	Гиперфоринированные таубелок	Нейрофибрилярные клубки	Нейродегенерация	Синаптическая дисфункция
PDAPP	APP (V717F)	-	Да	Да	Нет	Нет	Да
Tg2576	APP (K670N/M671L)	Да	Да	-	-	Нет	Нет
TgCRND8	APP (K670N/M671L, V717F)	-	Да	-	Нет	Нет	-
APP/PS1	APP (K670N/M671L), PS1 (M146L)	-	Да	-	-	-	-
APP23	APP (K670N/M671L)	-	Да	Да	Нет	Да	-
Tg-SwDI	APP (E693Q, D694N)	-	Да	-	-	-	Да
APPDutch	APP (E693Q)	-	Да	-	-	-	-
APPDutch/PS1	APP (E693Q), PS1 (G384A)	-	Да	-	-	-	-
hAPP-Arc	APP (E693G,	-	Да	-	-	-	-

	K670N/M671L, V717F)							
Tg-ArcSwe	APP (E693G, K670N/M671L)	-	Да	-	-	-	-	-
APPArc	APP (E693G)	Да	Да	-	-	-	-	-
TAPP	APP (K670N/M671L), Tau (P301L)	-	Да	-	Да	-	-	-
3xTg-AD	APP (K670N/M671L), Tau (P301L), PS1 (M146V)	Да	Да	Да	Да	-	-	Нет
APPSL/PS1	APP (K670N/M671L, V717I), PS1 (M146L)	Да	Да	-	-	Да	Да	Да
APP/PS1KI	APP (K670N/M671L, V717I), PS1 (M233T/L235P)	Да	Да	-	-	Да	Да	Да
5xFAD	APP (K670N/M671, I716V, V717I), PS1 (M146L/L286V)	Да	Да	-	-	Да	Да	Да

Однако необходимо отметить, что модели с использованием трансгенных животных являются моделью семейной формы БА, которая составляет не более 10% от всех случаев данной патологии. Данным моделям часто не хватает наличия комплекса патологических признаков, которые определяют БА, у большинства мышей с моделью БА показано формирование амилоидных бляшек, нарушения памяти и синаптической передачи, однако не всегда присутствует потеря нейронов и, что наиболее важно, формирование нейрофибриллярных клубков. Возможно, именно с этим связана плохая корреляция результатов исследований новых терапевтических средств, полученных в доклинических исследованиях с клиническими испытаниями.

В этой связи крайне желательно применять в экспериментальных исследованиях несколько моделей БА, а также разрабатывать новые

экспериментальные модели, которые позволят получить более полное представление о патогенетических процессах, протекающих при БА.

1.3. Эндогенные регуляторные системы мозга

1.3.1. Система нейротрофических факторов

Исследование особенностей развития повреждения нервных клеток при гипоксии, ишемическом повреждении и нейродегенерации ставит вопрос о возможности использования эндогенных регуляторных молекул для повышения адаптационных возможностей нервных клеток и коррекции нейродегенерации на разных стадиях развития патологии.

Одними из наиболее перспективных биологических агентов, способных поддерживать жизнеспособность и функциональную активность нейронов в различных условиях, являются нейротрофические факторы. Эти соединения могут предотвращать гибель нейронов при воздействии самых разных стресс-факторов и в настоящее время, рассматривается как один из перспективных агентов для терапии различных патологий ЦНС.

Нейротрофические факторы представляют собой сложные белковые соединения, синтезирующиеся нейронами и глиальными клетками головного мозга и принимающие участие в процессах роста и развития клеток. Все они участвуют в поддержании жизнеспособности, регуляции пролиферации, дифференцировки и миграции нейронов, регуляции синаптической пластичности и иных аспектов деятельности нервной системы, а также адаптации организма к стрессорным воздействиям (Martin and Finsterwald, 2011; Park and Poo, 2013).

Нейротрофические факторы могут быть разделены на несколько семейств:

1) нейротрофины, куда входят фактор роста нервов, нейротрофический фактор головного мозга BDNF, нейротрофин 3 (NT-3) и нейротрофин 4 (NT-4);

2) Семейство глиального нейротрофического фактора GDNF, которое состоит из четырех членов: глиальный нейротрофический фактор, нейротурин, артемин и перзефин

3) нейропоэтические цитокины.

Первым в начале 50х годов был описан фактор роста нервов (NGF), спустя три десятилетия был обнаружен нейротрофический фактор мозга BDNF. Его открытие вызвало большой резонанс и привлекло внимание ко всем нейротрофическим факторам. Показано, что BDNF может стимулировать рост аксонов и дендритов, активирует синаптогенез и участвует в процессах синаптической пластичности не только в раннем онтогенезе, но и во взрослом мозге (Skaper et al., 2018).

Для большинства нейротрофинов характерен синтез в клетке в виде предшественников - препронейротрофинов, в состав которых входит N-концевой сигнальный пептид, необходимый для внутриклеточного транспорта и дальнейшей секреции нейротрофического фактора во внеклеточное пространство. Секретироваться нейротрофины могут как в зрелой форме, так и в форме пре-нейротрофина, которые могут значительно отличаться по своей биологической активности (Huang & Reichardt, 2003; (Yang et al., 2014) .

1.3.1.1. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF)

Более подробно остановимся на строении и функциях наиболее исследованного нейротрофина – BDNF. BDNF синтезируется астроцитами, фибробластами, нейронами различного фенотипа и локализации, мегакариоцитами/тромбоцитами, шванновскими клетками (в очагах повреждения) (Martinowich et al., 2007). По сравнению с другими представителями нейротрофинов BDNF представлен в головном мозге наиболее широко. Известно, что экспрессия BDNF в мозге грызунов значительно превышает уровень экспрессии GDNF и NGF. Важно отметить, что структура гена BDNF является схожей у человека и грызунов, однако

присутствуют различия в числе экзонов (человек – 12, мышь – 9, крыса – 10) (Pchibaeva et al., 2015, 2016).

Несмотря на то, что BDNF не способен проходить через гематоэнцефалический барьер, он присутствует в плазме крови в пикограммовых количествах, а в сыворотке его содержание измеряется в нг/мл. Это объясняется высвобождением BDNF при дегрануляции тромбоцитов при свертывании крови. Тромбоциты - основной источник BDNF в сыворотке крови, они высвобождают нейротрофический фактор в ответ на внешние стимулы (Гудашева и др., 2017).

По современным представлениям, эффекты молекул семейства нейротрофинов реализуются через связывание с тремя типами клеточных рецепторов. К первому типу относятся высокоспецифичные тирозинкиназные рецепторы Trk (типы A, B, C), ко второму – рецептор p75 и к третьему – рецептор сортилин. Аффинность зрелых форм нейротрофинов и их предшественников к различным типам рецепторов значительно отличается. При этом активация различных типов рецепторов может оказывать прямо противоположные эффекты. Таким образом, процессинг является своего рода механизмом регуляции функциональной активности нейротрофических факторов (Huang & Reichardt, 2003, H. Zhao et al., 2017).

BDNF вырабатывается клетками головного мозга по требованию в ответ на нейрональную активность из молекулы-предшественника – pre-proBDNF, который в аппарате Гольджи расщепляется до proBDNF. Далее белок proBDNF либо продолжает функционировать в виде proBDNF, либо может подлежать протеолитическому расщеплению с образованием зрелой молекулы BDNF, также возможно высвобождение предшественника из клетки в виде proBDNF и «дозревание» до BDNF в синаптическом пространстве (рис 14) (H. Zhao et al., 2017).

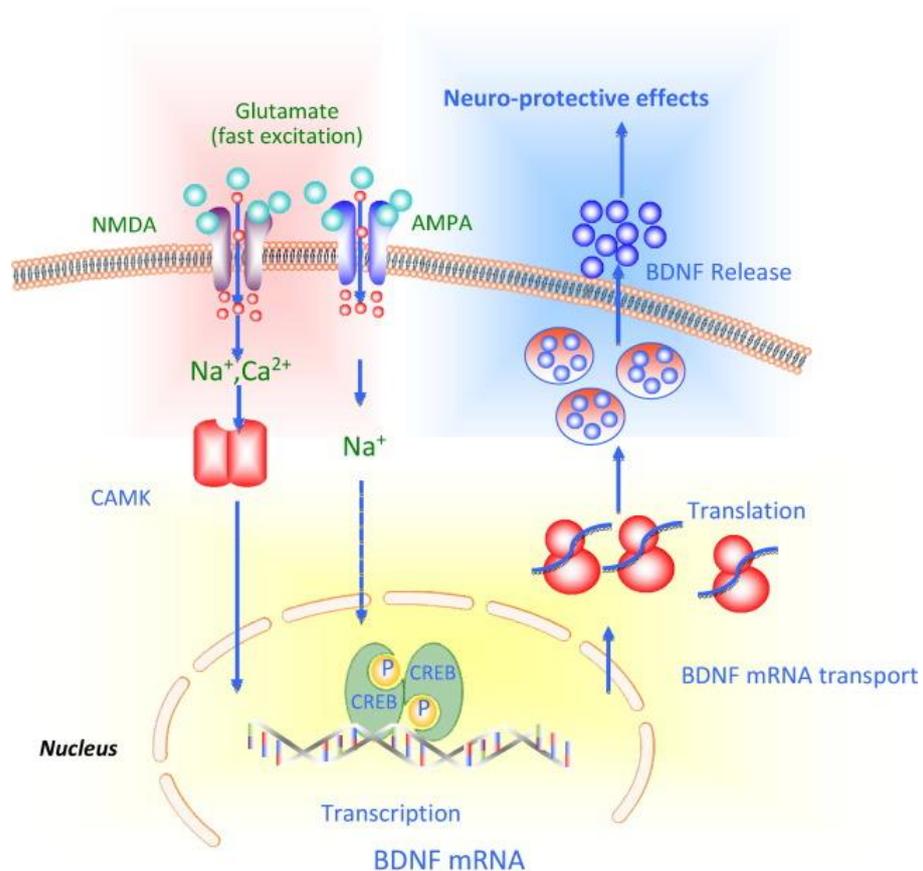


Рисунок 14. Сигнальные пути, приводящие к высвобождению BDNF. Глутамат вызывает быстрое возбуждение нейронов за счет стимуляции ионотропных рецепторов, таких как AMPA и NMDA. Это вызывает приток натрия и кальция и последующую клеточную деполяризацию и быструю внутриклеточную передачу сигналов, включая индукцию CAMK. Транскрипция BDNF регулируется передачей сигналов транскрипционного фактора CREB. мРНК BDNF может оставаться в соме или транспортироваться в дендриты для последующего зависящего от активности высвобождения BDNF (по H. Zhao et al., 2017)

Белок proBDNF опосредует свои функции путём активации высокоафинного тирозинкиназного рецептора В (TrkB), связанного с тропомиозином, и низкоафинного рецептора p75. Этот рецептор также является одним из рецепторов фактора некроза опухоли. С рецептором p75 взаимодействует только незрелая форма proBDNF (Benarroch, 2015). Активация p75 ингибирует рост аксонов и дендритов и может приводить к

запуску апоптоза. Функционирование данного рецептора осуществляется через два основными метаболических пути. Во-первых, он является ко-рецептором Trk и способен стимулировать или подавлять их активность, опосредованную нейротрофинами. p75 обладает способностью влиять на конформацию рецептора TrkB, тем самым изменяя его специфичность и аффинность к нейротрофинам в нормальных и патологических условиях, повышая аффинность TrkA к NGF, снижая аффинность TrkB к BDNF и нейротрофина 4/5 (NT-4/5) и при этом существенно не влияя на связывание нейротрофина-3 (NT-3) с TrkC (Bathina & Das, 2015; Naumenko et al., 2015). Во-вторых, взаимодействие нейротрофина с рецептором влечёт за собой запуск внутриклеточных биохимических каскадов, приводящих в свою очередь к активации транскрипционного фактора NF-κB, участвующего в регуляции апоптоза (Naumenko et al., 2015).

Функции зрелой формы молекулы BDNF реализуются в основном путём активации рецепторов из группы тирозинкиназ (Trk) – TrkB и гораздо в меньшей степени - рецепторов p75. Trk-рецепторы представляют собой семейство тирозинкиназных рецепторов, которые регулируют синаптическую пластичность в нервной системе. Наиболее распространёнными лигандами этих рецепторов являются нейротрофины. Существует три типа рецепторов — TrkA, TrkB и TrkC. Каждый из них имеет разную аффинность к определённым нейротрофинам. В 1991 году было показано, что фактор роста нейронов NGF активирует рецепторы TrkA, а TrkB и TrkC являются рецепторами для других членов семейства нейротрофинов: TrkB для BDNF и NT-4/5 и TrkC для NT-3 (Pataroutian and Reichardt, 2001; Huang and Reichardt, 2003).

Известно, что в головном мозге экспрессия TrkB превосходит экспрессию рецептора p75 в 8-10 раз, что говорит о его превалирующей роли. Кроме BDNF, TrkB-рецептор может взаимодействовать с нейротрофином NT-4, но с меньшей степенью аффинности. Описаны три изоформы TrkB – основная TrkB-FL или TrkB-TK+ который обладает наиболее полной

последовательностью, содержащей в своей структуре внутриклеточный тирозинкиназный домен. Две другие формы (TrkB-T1 и TrkB-T2) являются укороченными, имеют такие же внеклеточные и трансмембранные участки, что и TrkB-FL, но не обладают тирозинкиназной активностью. Укороченные формы рецептора — важные компоненты регуляции сигнализации TrkB-FL и избирательно влияют на рост и ветвление дендритного дерева некоторых нейрональных популяций (Du et al., 2000; Skaper, 2018)

TrkB экспрессируется как в центральной, так и в периферической нервной системе. В ЦНС высокая экспрессия TrkB наблюдается в коре головного мозга, гиппокампе, таламусе, сосудистом сплетении и гранулированном слое мозжечка, ствола мозга, сетчатки и спинного мозга. Активация рецепторов TrkB, преимущественно локализованных в аксональных терминалях и дендритных шипиках, приводит к их димеризации и автофосфорилированию, что активирует основные внутриклеточные сигнальные пути - фосфатидилинозитол-3-киназный (PI3K/ Akt), митоген-активируемый протеинкиназный (Ras/MAPK) и PLC-сигнальный механизм (рис. 15). Посредством запуска PI3K/Akt сигнального пути Akt-киназа фосфорилирует транскрипционный фактор SRF, принадлежащий к суперсемейству транскрипционных факторов MADS, регулирующий экспрессию генов и выживаемость клеток

Активация Ras/MAPK сигнального каскада вызывает фосфорилирование серин-треонинкиназы (RAF-1), митоген-активируемой протеинкиназы (MEK) и внеклеточной регуляторной киназы (ERK), которые имеют важное значение для нейрогенеза и способствует выживанию клеток несколькими способами: путём индукции генов, способствующих выживанию и ингибированием проапоптических белков (Du et al., 2000; Patapoutian and Reichardt, 2001).

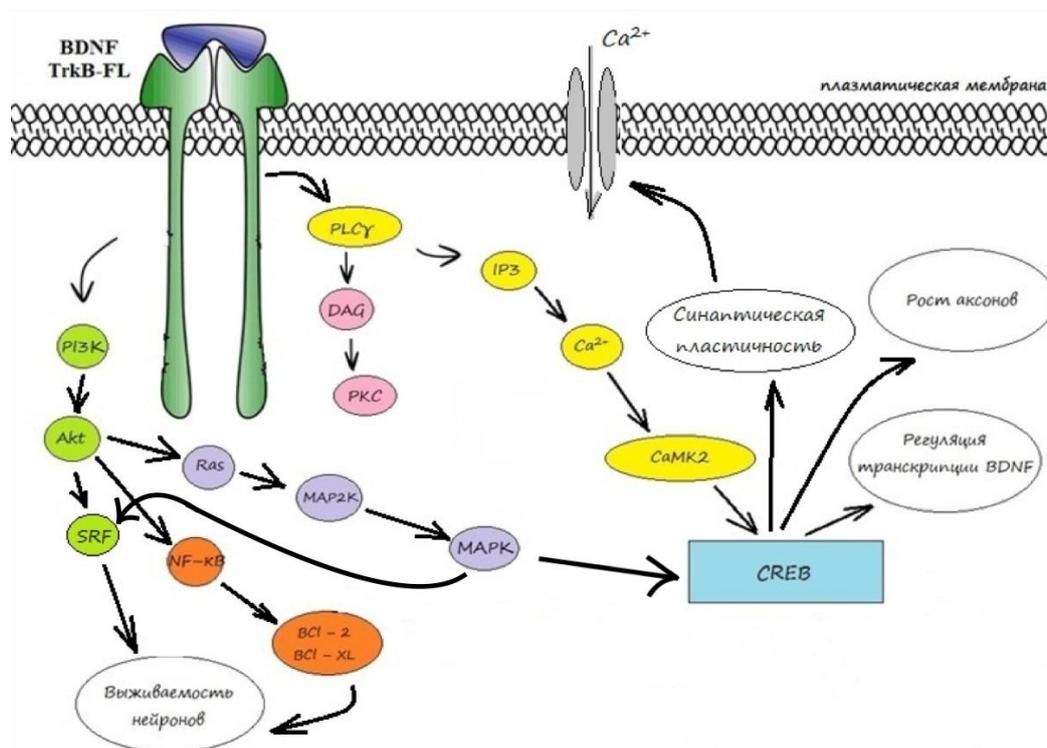


Рисунок 15. Молекулярный механизм действия BDNF (модифицировано по Cunha, 2010)

BDNF играет важную роль в регуляции синаптической пластичности. Известно, что он способен индуцировать формирование некоторых форм долговременной потенциации (long-term potentiation, LTP) и депрессии (long-term depression, LTD). Таким образом, данный нейротрофический фактор играет важную роль в обучении и формировании памяти. Известно, что ключевым отделом мозга, в котором реализуется превращение кратковременной памяти в долговременную, является гиппокамп. Экспериментально доказано, что при обучении в гиппокампе быстро и селективно повышается экспрессия BDNF. В экспериментах на обезьянах было обнаружено, что при формировании инструментального рефлекса содержание BDNF возрастает в париетальной коре больших полушарий (Mitre et al., 2017).

У трансгенных мышей с повышенной экспрессией укороченных форм рецептора TrkB снижена способность к пространственному обучению, как и у

животных с нокаутом гена BDNF. Снижается способность к пространственному обучению и при использовании антител, ингибирующих BDNF. У людей с однонуклеотидным полиморфизмом гена BDNF Val66Met (замена аминокислоты валина на метионин в 66-ом кодоне) снижена кратковременная память. Нарушения памяти у людей-носителей аллели Met66 приводят к большей восприимчивости к нейропсихиатрическим расстройствам. Частота полиморфизма варьируется между этническими группами и колеблется от 20 до 50% между популяциями. В нейронах proBDNF с Met66 нарушается внутриклеточное распределение и секреция нейротрофина (Cheeran et al., 2008; Lee et al., 2021).

Считается установленным, что BDNF секретируется во время индукции LTP и функционально важен для сигнальных каскадов, ведущих к LTP, хотя и не для всех ее форм. Ингибирование TrkB или удаление BDNF из внеклеточной среды во время и после индукции LTP подтвердило что существуют критические временные периоды, во время которых BDNF необходим для развития ранних и поздних фаз долговременной потенцией, эти временные окна начинаются с момента индукции LTP и заканчиваются в диапазоне от 10 до 60 минут. Более того, есть убедительные доказательства того, что для консолидации памяти необходимо постоянное действие BDNF в течение более длительных периодов времени до 24 часов (Lu et al., 2014; Kuipers et al., 2016).

Эффекты, оказываемые BDNF на формирование LTP, лучше всего изучены именно в гиппокампе, при этом действие BDNF довольнозаметно отличается в синапсах различных типов. Поэтому пока еще вполне понятно, какие именно сигнальные каскады BDNF вносят вклад в формирование памяти.

Аппликация BDNF быстро активирует специфические ионные натриевые каналы Nav1.9 (Рис. 16). Этот эффект реализуется через TrkB рецепторы и игибруется их блокатором. Вероятно, TrkBFL рецепторы непосредственно взаимодействуют с Nav1.9, либо связаны с ней через

молекулу-посредник. Увеличение натриевого тока в клетку ведет к деполяризации плазматической мембраны и открытию потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов (voltage-gated calcium channels, VGCCs). Поступление ионов кальция в клетку активирует Ca^{2+} /кальмодулин киназные пути, и далее транскрипционный фактор CREB (Sasi et al., 2017)..

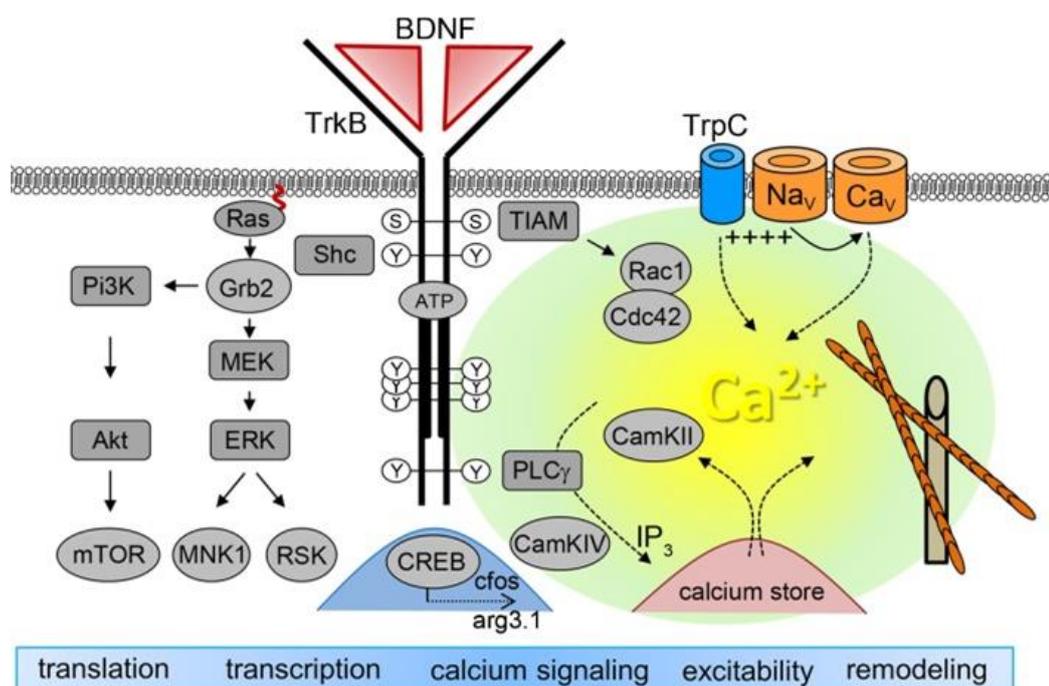


Рисунок 16. Роль передачи сигналов BDNF/TrkB в дифференцировке нейронов и синаптической пластичности (Sasi et al., 2017)

Кроме того, BDNF регулирует работу постсинаптических глутаматных рецепторов. Это играет важную роль в регуляции синаптической пластичности. BDNF повышает уровень фосфорилирования NR1- и NR2B-субъединиц NMDA-рецепторов в гиппокампе. BDNF может регулировать субъединичный состав NMDA рецепторов, увеличивая долю рецепторов, содержащих NR2B-субъединицу (Carreño et al., 2011; Klug et al., 2012).

Активация TrkB-рецепторов приводит к активации молекулярных каскадов, включая каскад митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и фосфолипазы C- γ (PLC- γ), как упоминалось выше. Эти сигналы передаются в ядро и воздействуют на факторы

транскрипции, изменяя экспрессию генов. Например, активация регулируемой внеклеточным сигналом киназы 1/2 (ERK1/2), одного из эффекторов MAPK, может воздействовать на факторы транскрипции, такие как гены раннего ответа c-Jun, c-Fos и Egr-1, а также белок, связывающий элемент ответа на циклический AMP (CREB), который впоследствии регулирует экспрессию ряда целевых генов. Однако некоторые из этих внутриклеточных сигналов могут также оказывать быстро реализуемые негеномные эффекты. Так, ERK регулирует транспортировку глутаматных рецепторов AMPA (AMPA), что также вносит вклад в реализацию синаптической пластичности (Mitre et al., 2017).

Помимо регуляции возбуждающей синаптической передачи, BDNF играет важную роль в поддержании баланса возбуждения и торможения. Основным тормозным нейромедиатором в головном мозге является γ -аминомасляная кислота (ГАМК). ГАМКергическая система играет ключевую роль в поддержании адекватного уровня нейротрансмиссии в ЦНС. Она опосредуется двумя различными классами рецепторов: ионотропными рецепторами ГАМК_A (GABA_ARs) и метаботропными рецепторами ГАМК_B (GABA_BRs). При этом физиологические эффекты ГАМК изменяются в ходе постнатального развития. В первые дни после рождения (до 6–7 суток) ГАМК играет роль возбуждающего нейромедиатора, действуя через ГАМК_A-рецепторы, являющиеся представителями семейства ГАМК-зависимых Cl⁻/HCO₃⁻-ионных каналов. ГАМК-опосредованная деполяризация ведет к активации VGCCs, развивается деполяризация, устраняется магниевый блок на NMDA-рецепторов, что в результате приводит к генерации постсинаптического потенциала действия. Это является механизмом, регулирующим формирование нейронных сетей, включая миграцию и дифференцировку нейронов, рост их отростков (Porcher et al., 2018).

После 14 дня постнатального развития происходит инверсия эффекта активации ГАМК_A-рецепторов, они начинают участвовать в синаптическом торможении. BDNF понижает эффективность тормозящей передачи в

ГАМКергических синапсах посредством регуляции фосфорилирования (Mizoguchi et al., 2006; Lu et al., 2014).

Участие BDNF в регуляции ГАМК-ергической крайне важно, поскольку баланс между возбуждением и торможением нейронов в нейронных сетях имеет определяющее значение для нормальной работы мозга. При многих нейродегенеративных заболеваниях уровень продукции BDNF снижается, что может приводить к дисбалансу возбуждающей / тормозной нейротрансмиссии, включая нарушение регуляции ГАМКергической передачи (Shulga and Rivera, 2013; Porcher et al., 2018).

Таким образом, имеется достаточный массив экспериментальных данных, чтобы утверждать, что BDNF влияет как на передачу нервного импульса через пре- и постсинаптические механизмы, участвует в модуляции синаптической пластичности и играет важную роль в процессах обучения и формирования памяти. Взаимодействие BDNF с TrkB-рецептором активирует потенциал-зависимые натриевые и калиевые каналы, что ведет к открытию НМДА-рецепторов и изменению экспрессии ГАМКа-рецепторов через PI3 и PKC сигнальные пути.

Кроме того, есть данные о том, что BDNF регулирует дендритный транспорт мРНК и их трансляцию в синапсе, модулируя фазы инициации и элонгации синтеза белка и воздействуя на специфические miRNAs. Более того, влияние BDNF на регуляцию транскрипции может вносить дополнительный вклад в долгосрочные изменения синаптического протеома.

1.3.1.2. Глиальный нейротрофический фактор головного мозга (GDNF)

Семейство лигандов GDNF (GFL) состоит из четырёх нейротрофических факторов: нейротурина, персефина, артемина, и глиального нейротрофического фактора головного мозга (GDNF) которые играют роль в множестве процессов: от роста нейритов до контроля выживаемости нервных клеток.

GDNF был выделен в 1993 году из глиальных клеток. Представляет собой белок, состоящий из 134 аминокислот и обладающий молекулярной массой 35 кДа. В процессе формирования зрелой молекулы GDNF происходит присоединение углеводных остатков и процесс гомодимеризации молекулы. Именно в форме гомодимера GDNF реализует основные биологические функции, включая регуляцию пролиферации и миграции нервных клеток, поддержание функционирования и жизнеспособности нейронов, регуляцию активности факторов транскрипции, антиапоптотические эффекты (Duarte et al., 2012).

Незрелая молекула-предшественник GDNF состоит из 211 аминокислот, специфических участков расщепления сигнальной последовательности и про-домена. Зрелый GDNF имеет молекулярную массу 35 кДа и состоит из 134 аминокислот. При созревании белок гликозилируется и гомодимеризуется за счет формирования ковалентных дисульфидных связей. Аналогично нейрорфическому фактору BDNF, GDNF в головном мозге синтезируется в виде пептидов-предшественников - (a)pro-GDNF и (b)pro-GDNF. Два этих предшественника белка кодируются двумя мРНК, полученными в результате альтернативного сплайсинга. Роль этих двух изоформ сплайсинга pro-GDNF в настоящее время еще не поняты. В тканях мозга человека обнаружено несколько специфических дополнительных изоформ GDNF, одна из которых встречается у пациентов с болезнью Альцгеймера (Shishkina et al., 2015; Conway et al., 2020).

Плейотропные эффекты GDNF в развивающейся и взрослой нервной системе опосредуются активацией универсальной многокомпонентной рецепторной системы с множеством внутриклеточных механизмов сигнализации. GDNF связывается с гликозилфосфатидинозитолным рецептором (GPI), также известным как GFRa1. Он расположен на поверхности плазматической мембраны, у него отсутствуют трансмембранные и внутриклеточные домены, поэтому GFRa1 действует только как связывающий GDNF элемент. Для передачи сигнала в клетку ему

необходим посредник. Таким посредником является трансмембранный Ret - рецептор или молекула адгезии нервной клетки, его активация способствует выживанию, росту нейронов и синаптогенезу (Wang, 2013; Ibáñez and Andressoo, 2017).

Ret-киназный рецептор - сигнальный рецептор для всех белков семейства GDNF, который может активировать несколько внутриклеточных сигнальных каскадов: RAS (MAPK) и PI3-К/Akt (рис. 17).

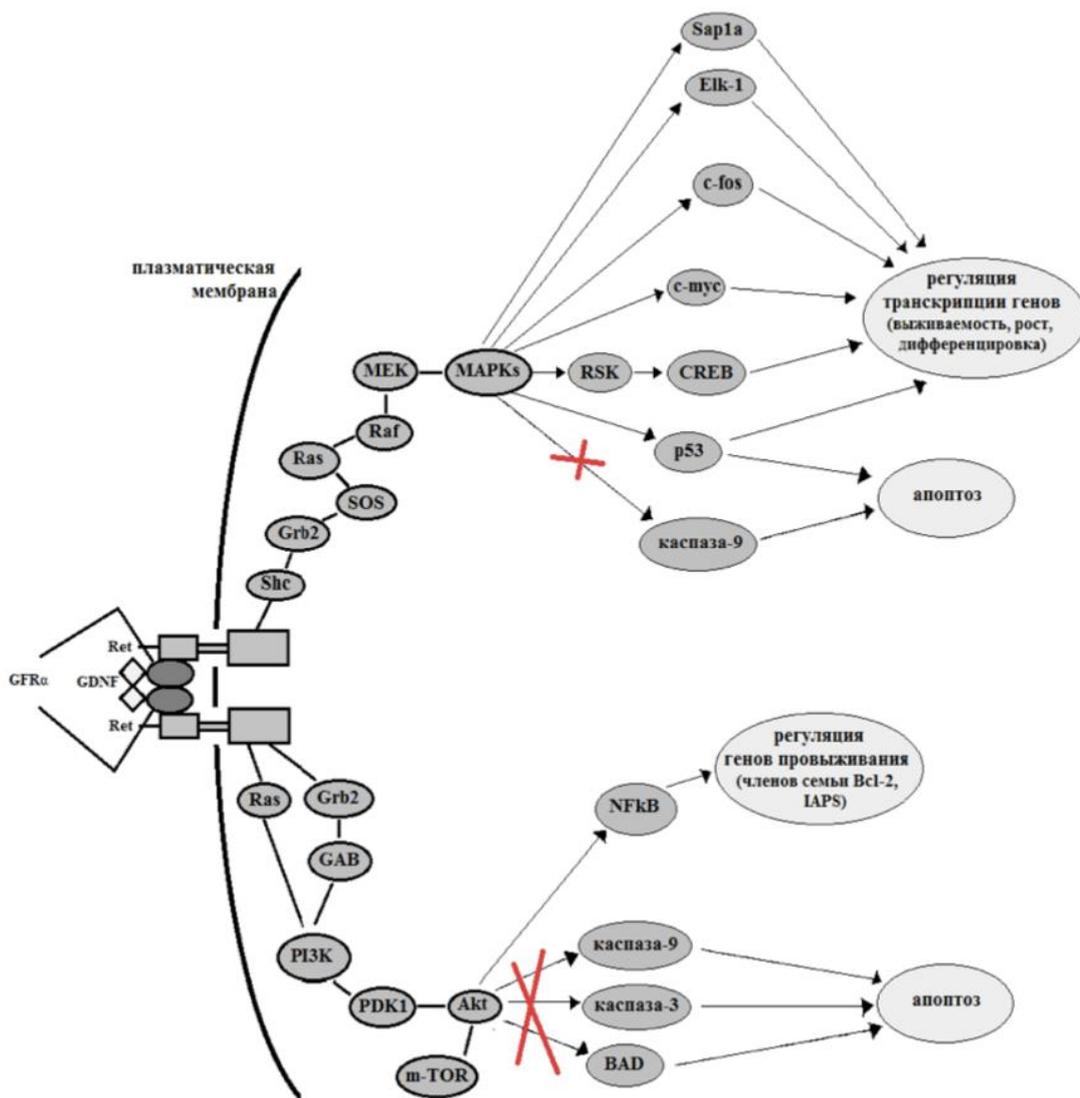


Рисунок 17. Молекулярные механизмы действия GDNF (Shishkina et al., 2015)

RAS (MAPK) сигнальный каскад регулирует выживаемость и дифференциацию нейронов. Связывание GDNF/GFR α с трансмембранным белком Ret приводит к фосфорилированию Shc адапторного белка, формирующего комплекс с белком Grb2, за счет связывания с SH2/SH3-доменом. SH3-домен в свою очередь связывается с фактором обмена нуклеотидов GEF, в свою очередь активирующий мембран-связанный белок Ras. Данный белок обладает высоким уровнем сродства к некоторым субстратам, в числе которых есть киназа Raf. Их связывание позволяет Raf фосфорилировать MEK киназу, далее активирующую киназу MAPK. В результате работы этого внутриклеточного сигнального каскада происходит активация множества транскрипционных факторов (CREB и пр.), регулирующих подвижность, выживаемость, дифференциацию и пролиферацию нервных клеток (Wang, 2013).

Эффекты PI3-K/Akt сигнального пути опосредуются посредством активации Akt-киназы фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа (PDK-1), которая, в свою очередь фосфорилируется с помощью PI3-K. Результатом работы этого сигнального пути является подавление Akt-киназой действия проапоптотического белка BAD и каспаз 3 и 9 и активация белков семейства Bcl-2, способствующих регуляции генов выживания (Zhang et al., 2021).

Другим сигнальным рецептором для GFR α 1 является молекула адгезии нейронных клеток (Paratcha et al., 2003). В отсутствие GDNF GFR α 1 может связываться с NCAM, тем самым ингибируя клеточную адгезию, опосредованную гомофильным взаимодействием NCAM, в присутствии же GDNF комплекс GFR α 1/GDNF/NCAM опосредует клеточную адгезию с помощью механизма, включающего Fyn киназы и киназы фокусной адгезии (FAK) Хотя GDNF может напрямую связываться с NCAM, эффекты GDNF на адгезию клеток требуют наличия GFR α 1 (Sjöstrand and Ibáñez, 2008). Сигнальный путь GDNF/NCAM стимулирует рост аксонов в гиппокампе и миграцию шванновских клеток (Iwase et al., 2005; Irala et al., 2016).

Как уже упоминалось, нейротрофические факторы принимают участие в процессах нейрогенеза как в раннем онтогенезе, так и во взрослом, сформировавшемся мозге, что открывает перспективы лечения таких повреждений головного мозга, как ишемия (Fon et al., 2014). Эти пептиды стимулируют синаптогенез и о рост нейротомов, регулируют реконструкцию и стабильность дендритов и аксонов в нейронах коры и гиппокампа. Оба эти нейротрофических фактора обладают цитопротекторными свойствами, повышают выживаемость нервных клеток при ишемии/гипоксии и различных травмах (Jeziński et al., 2014; Cook et al., 2017; Huang et al., 2017). С открытием нейропротекторной роли BDNF и GDNF широко исследуется возможность их использования для лечения патологий, связанных с повреждением нервной системы.

1.3.1.3. Применение нейротрофических факторов в нейропротекции

Нейропротекторные эффекты нейтрофических факторов изучаются уже на протяжении 20 лет. Ещё в 1980 году стало известно, что в развивающемся мозге нейротрофические факторы имеют решающее значение для выживания нервных клеток, поскольку они ингибируют апоптоз развивающихся нейронов. Нейротрофические факторы рассматриваются как потенциальные терапевтические мишени при самых различных патологиях ЦНС.

Защитные эффекты нейротрофических факторов при ишемическом повреждении головного мозга

BDNF является одним из важнейших нейропротекторных агентов в гиппокампе, особенно при ишемическом повреждении головного мозга. Множество исследований, проведенных как на моделях окклюзии средней мозговой артерии (МСАо), так и на моделях глобальной ишемии, показали, что BDNF уменьшает гибель клеток, сокращает объем очага инсульта, ускоряет восстановление неврологического статуса и когнитивных способностей экспериментальных животных (Harris et al., 2016; Zhang et al., 2018; Weissmiller & Wu, 2012; Astrakhanova et al., 2018, Idrisova et al, 2022).

Применение BDNF при моделировании ишемии стимулировало нейрогенез и миграцию нейрональных прогениторов из субвентрикулярной зоны в область инсульта (Ramos-Sejudo et al., 2015; Zhao et al., 2017).

Как известно, нейрональный апоптоз характеризуется активацией эффекторных каспаз, в частности каспаз 3 и 9. BDNF снижает индуцированную глутаматом клеточную смерть и увеличивает экспрессию антиапоптотических белков семейства Bcl-2 (Almeida et al., 2005; Chiu et al., 2019).

Также известно, что BDNF участвует в защите головного мозга от окислительного стресса. BDNF предотвращает накопление пероксидов и увеличение антиоксидантных ферментов в нейронах гиппокампа (Chen et al., 2017). 4-Гидроксиноненал (HNE) является маркером окислительного стресса и образуется при перекисидации омега-6-полиненасыщенных жирных кислот. Кроме того, HNE может сильно диффундировать и способствовать развитию окислительного стресса вдали от места повреждения. Локальное применение BDNF на продольно-рассечённом спинном мозге крыс приводило к уменьшению перекисного окисления липидов, что было показано уменьшившимся HNE-иммунореактивным окрашиванием (Joosten and Houweling, 2004).

Показано, что гиперэкспрессия BDNF с помощью аденоассоциированного вирусного вектора оказывает антиапоптотический эффект при моделировании глюкозно-кислородной депривации, а также нормализует кальциевую активности нейронов. Данный эффект опосредован активацией пути фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и повышением экспрессии PI3K, HIF-1, Src и противовоспалительного цитокина IL-10. Кроме того, наблюдалось снижение экспрессии проапоптотических белков, таких как Jun, Mark8, каспаза-3 и провоспалительного цитокина IL-1 β (Gaidin et al., 2020). Также показано, что аденоассоциированные векторы, несущие гены BDNF и GDNF повышают резистентность животных к гипобарической гипоксии (Gavriš et al., 2022).

Таким образом, BDNF играет важную роль в выживании нервных клеток при гипоксическом и ишемическом повреждении (рис. 18).

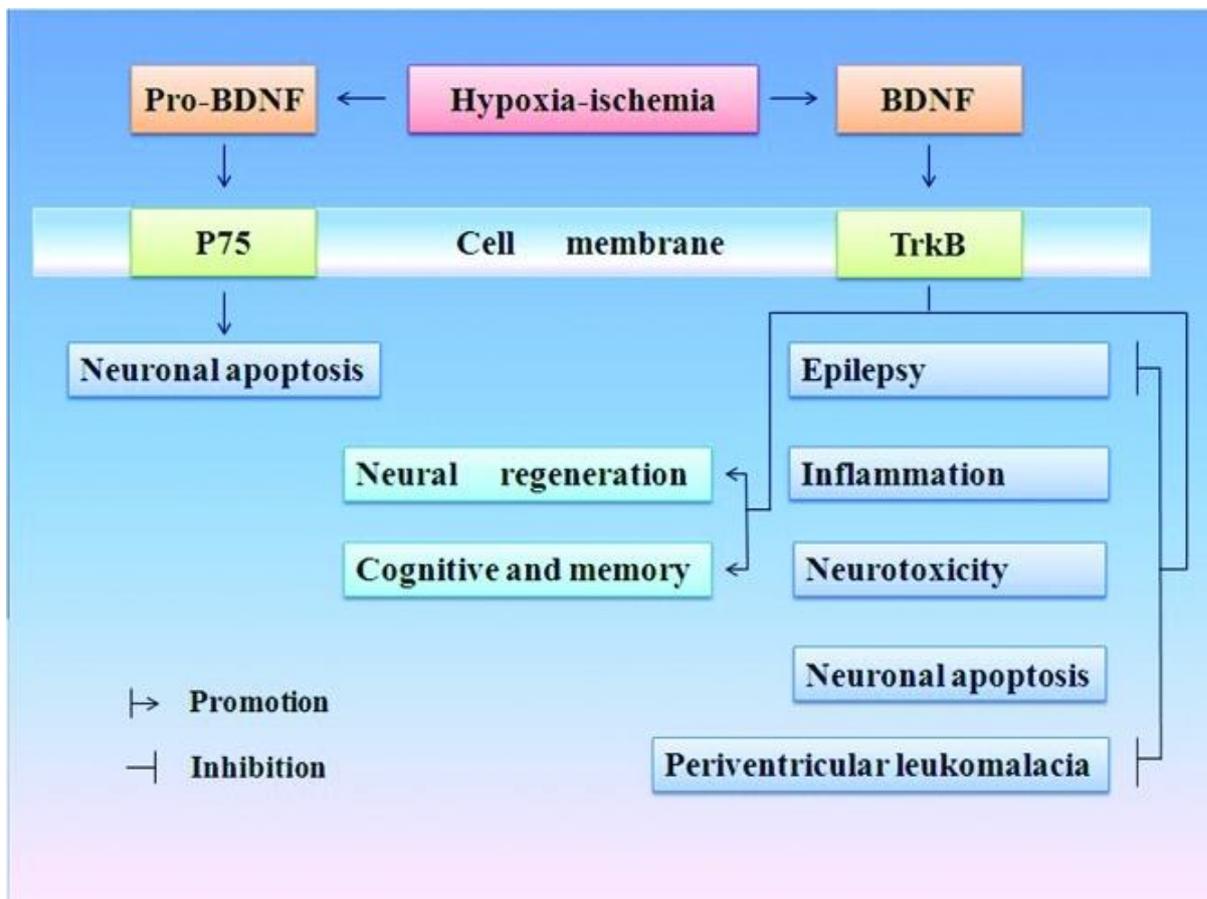


Рисунок 18. Роль BDNF в выживании нейронов после гипоксически-ишемического повреждения. Pro-BDNF активирует рецептор p75, тем самым индуцируя проапоптотические сигнальные пути. Зрелый BDNF связывается с рецептором TrkB, что приводит к проявлению комплекса защитных эффектов: с одной стороны, это способствует регенерации нервов и восстановлению когнитивных функций и памяти, а с другой стороны препятствует развитию патологического воспаления, нейротоксичности, перивентрикулярной лейкомаляции и апоптоза (Chen et al., 2013)

Ряд работ показывают, что содержание BDNF в тканях мозга в постгипоксическом периоде повышается, что рассматривается как адаптивная реакция организма. Например, при очаговой ишемии через 4 и 24 часа после повреждения отмечено увеличение экспрессии BDNF в

нейронах и эпендимальных клетках мягкой мозговой оболочки контрлатерального полушария, а также в нейронах, эпендимоцитах, микроглии и эндотелиальных клетках травмированного полушария. На 8 сутки постинсультного периода повышение уровня BDNF наблюдалось в астроцитах (Véjot et al., 2011).

Показано усиление продукции BDNF микроглиальными клетками через 8 суток после моделирования окклюзии средней мозговой артерии у крыс (Choi et al., 2015). Однако имеются и противоположные свидетельства, отмечающие снижение продукции BDNF после ишемического эпизода. Например, окклюзия средней мозговой артерии вела к снижению уровня BDNF в коре, мозжечке (Stavchansky et al., 2011 и гиппокампе (поле CA1) (Stavchansky et al., 2011; Mokhtari et al., 2017).

Кроме того, несмотря на то, что имеется большой объем экспериментальных данных о влиянии BDNF на выживаемость нервных клеток, сведений о его влиянии на функциональную активность нейронных сетей имеется крайне мало.

Также следует отметить, что имеющиеся экспериментальные данные о роли высокоаффинного рецептора Trkb в реализации нейропротекторного действия BDNF, полностью его эффекты они объяснить не могут, что говорит о том, что конкретные молекулярные механизмы действия BDNF изучены не полностью. Интересным представляется возможное наличие взаимосвязи BDNF с индуцируемым гипоксией белковым фактором-1 (HIF1), который контролирует экспрессию большого количества различных генов-мишеней, опосредующих как адаптивные, так и патологические процессы (Barteczek et al., 2017; Salhanick et al., 2006; Semenza, 2004). Детальнее система регуляции ответа клетки на гипоксию с помощью HIF1 будет описана в следующем разделе. Насколько сегодня известно, в генах BDNF и GDNF нет чувствительных к HIF-1 элементов. Однако, ген TrkB имеет элементы, связывающие HIF-1 и HIF-1 может влиять на его экспрессию (Martens et al.,

2020), и поэтому HIF-1 может быть важен, по крайней мере, для модулирования эффектов гипоксии на передачу сигналов BDNF/TrkB. При этом на сегодняшний день неизвестно, модулирует ли HIF-1 также и BDNF. Кроме того, возможны общие точки пересечения молекулярных каскадов, связывающие между собой пути, активируемые HIF-1 и нейротрофическими факторами.

Данных о связи и взаимном влиянии нейротрофических факторов HIF-1 на сегодняшний день немного. Например, для клеток эндотелия легочной артерии показано, что гипоксия и индуцируемое ей повышение экспрессии BDNF также индуцировали экспрессию индуцируемого гипоксией фактора 1 альфа субъединицы фактора транскрипции HIF-1 (HIF-1 α), а фармакологическое ингибирование HIF-1 уменьшало влияние гипоксии на экспрессию и секрецию BDNF и продукцию NO эндотелиоцитами. Эти результаты указывают на то, что клетки эндотелия легочной артерии экспрессируют и секретируют BDNF в ответ на гипоксию посредством пути, регулируемого HIF-1 (Helan et al., 2014).

На клетках нейробластомы продемонстрировано, что BDNF индуцировал увеличение продукции VEGF посредством увеличения экспрессии белка HIF-1 α , в то время как уровни HIF-1 β не изменялись. Трансфекция малой интерферирующей РНК HIF-1 α блокировала повышение активности промотора VEGF и экспрессии белка VEGF, опосредованное аппликацией BDNF. Стимулированное BDNF увеличение экспрессии HIF-1 α и VEGF требовало активности тирозинкиназы TrkB и было полностью заблокировано ингибиторами путей фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и mTOR (Nakamura et al., 2006). Аналогичные результаты получены на клетках хондросаркомы (Lin et al., 2014). Однако данные исследования были посвящены изучению механизмов ангиогенеза в онкотрансформированных клетках и не могут быть в полной мере экстраполированы на здоровые нейроны. Поэтому исследование взаимного влияния BDNF и HIF-1 α в нервных клетках головного мозга безусловно заслуживают дальнейшего изучения.

Высокую терапевтическую эффективность в экспериментальных исследованиях показал и глиальный нейротрофический фактор. Известно, что уровень GDNF в тканях мозга после ишемического инсульта повышается. Многие исследователи интерпретировали индукцию этот факт как адаптивную реакцию организма, направленную на регенерацию (Duarte et al., 2012)

В работах, где применялось локальное введение очищенного белка, либо генноинженерные вирусные векторы, либо проводилась трансплантация GDNF-экспрессирующих клеток, задокументировано нейропротективное действие экзогенного GDNF в самых различных экспериментальных моделях фокальной и глобальной ишемии головного мозга (Mitroshina et al., 2017; Urazov et al., 2018). Применение GDNF оказывало защитный эффект, включая уменьшение размера инфаркта и отека мозга, а также снижение апоптоза нейронов в области пенумбры, окружающей ядро инсульта (Liu et al., 2016; Lee et al., 2017; Wang et al., 2018).

Это может быть результатом комбинации как прямых антиапоптотических эффектов, а именно стимулирования выживания нейронов, так и косвенных эффектов, например усиления пролиферации, миграции или выживания нейрональных прогениторов.

Несмотря на то, что в большинстве работ были исследованы нейропротекторные свойства GDNF путем его введения до инициации ишемического инсульта, некоторые исследования смогли продемонстрировать выраженный, хоть и более умеренный, нейропротекторный эффект при введении GDNF после ишемического повреждения, как правило, в относительно узком терапевтическом окне до 4-6 часов после инсульта, а также с поддерживающим введением вещества в течении нескольких дней после моделирования ишемии (Beker et al., 2020).

Возможно предположить, что в реализации защитного действия GDNF также играет значимую роль система фактора HIF-1 α . Несмотря на то, что данных, свидетельствующих об этой взаимосвязи для нервных клеток

головного мозга на сегодняшний день не представлено, имеются сведения о периферических нервных клетках, а также о других типах клеток. Весьма интересные результаты показало исследование защитного действия GDNF на модели совместного культивирования первичных энтеральных нейронов из нервно-мышечных слоев кишечника и клеток гладкой мускулатуры кишечника крысы. Показано, что гипоксия и воспаление вызывает гибель кишечных нейронов, в то время как GDNF оказывает нейропротекторное действие, активируя RET и HIF-1 α , ограничивая запрограммированную гибель клеток. Пути GDNF и HIF-1 не являлись независимыми, поскольку ингибитор сборки комплекса HIF chetomin блокировал защитное действие GDNF. Возможно, HIF-1 α -зависимая активация транскрипции может также включать компенсаторную повышающую регуляцию RET или его нижележащих мишеней (Keaton et al., 2021). Кроме того, показано, что сверхэкспрессирующие GDNF стволовые клетки, полученные из амниотической жидкости, положительно регулируют перитубулярные капилляры, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), HIF-1 α и уровень белка трансформирующего фактора роста- β 1 (TGF- β 1) при трансплантации мышам с обструкцией мочеточника, что также подтверждает взаимосвязь GDNF и HIF-1 (Li et al., 2019). Однако, для понимания адаптационных механизмов, связывающих нейропротекторные эффекты нейротрофических факторов и фактора HIF-1 безусловно необходимо проведение дальнейших комплексных исследований.

Защитные эффекты нейротрофических факторов при нейродегенеративных заболеваниях на примере болезни Альцгеймера

Способность нейротрофических факторов регулировать нейрогенез и синаптическую пластичность подразумевает, что нейротрофины могут играть определенную роль в развитии многих нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона и др. Исследования по определению концентрации церебрального BDNF у пациентов, страдающих БА, выполненные различными научными группами,

демонстрируют противоречивые результаты. Однако наиболее убедительно выглядят результаты многочисленных исследований посмертных образцов головного мозга людей с болезнью Альцгеймера, которые показывают, что уровень мРНК и самого BDNF значительно снижаются (Phillips et al., 1991; Garzon et al., 2004). Важно отметить, что снижение уровня BDNF в тканях мозга у пациентов наблюдается уже на ранних стадиях заболевания. Известно, что когнитивный дефицит при БА связан со снижением уровня BDNF в крови, а также с нарушением содержания других нейротрофических факторов, таких как фактор роста нервов и GDNF (Josiane Budni et al., 2015). В своей работе Yasutake et al., 2006 показали, что BDNF в крови снижается на поздних стадиях заболевания (Yasutake et al., 2006).

Заметное снижение как зрелого, так и proBDNF предшествует снижению активности холинацетилтрансферазы, наблюдаемому на более поздних стадиях при БА. Снижение обоих типов BDNF происходит на начальной стадии прогрессирования БА и соответствует нарушению когнитивной функции, что говорит о том, что как proBDNF, так и BDNF играют определенную роль в синаптической потере и клеточной дисфункции, лежащей в основе когнитивных нарушений при БА (Peng et al., 2005)

Также известно, что амилоид β способен напрямую ингибировать протеолиз BDNF из pro-BDNF, тем самым снижая его уровень (Zheng et al., 2010) и ингибировать ретроградный аксональный транспорт комплекса BDNF/TrkB через механизм, включающий убиквитинирующий фермент, убиквитин-С-концевую гидролазу L1 (Poon et al., 2013). Таким образом, снижение уровня BDNF вероятно является одним из важных молекулярных механизмов патогенеза БА.

Помимо снижения уровня лиганда, также было обнаружено изменение количества и репертуара TrkB рецепторов - при БА количество усеченного TrkB_{T1} рецептора возрастает. Рецепторы TrkB_{T1}, оказывают доминирующее негативное действие как на передачу сигналов TrkB, так и рецепторов p75 (Jerónimo-Santos et al., 2015). Согласно исследованиям, во

время прогрессирования БА отдельные холинергические нейроны в базальном ядре (NB) обнаруживают существенное подавление экспрессии всех типов тирозинкиназных рецепторов - TrkA, TrkB и TrkC (Savaskan et al., 2000). Нейроны, несущие нейрофибрилярный клубок, демонстрируют более выраженное снижение TrkB-FL, однако для p75NTR изменений не наблюдается (Jerónimo-Santos et al., 2015).

Также известно, что β -амилоид способен напрямую ингибировать протеолиз BDNF из pro-BDNF, тем самым снижая его уровень и ингибировать ретроградный аксональный транспорт комплекса BDNF/TrkB через механизм, включающий убиквитинирующий фермент, убиквитин-С-концевую гидролазу L1 (Angelucci et al., 2019). Таким образом β -амилоид может нарушать TrkB-опосредованную передачу сигналов на нескольких уровнях, а снижение уровня BDNF вероятно является одним из важных молекулярных механизмов патогенеза БА.

Дополнительными механизмами, значительно нарушающими передачу сигналов BDNF / TrkB при болезни Альцгеймера, являются устранение путей MAPK / ERK и PI3K / Akt сублетальными уровнями $A\beta$ без препятствования инициации TrkB-FL и PLC- γ и нарушение BDNF-индуцированного эндоцитоза TrkB (рис. 19) (Girotra et al., 2022).

В случае применения рекомбинантного BDNF при болезни Альцгеймера наблюдалось значительное торможение нейродегенеративных процессов в нервных клетках. Например, в культурах нейронов BDNF оказывал специфическое и дозозависимое TrkB-опосредованное защитное действие против нейротоксичности, индуцированной $A\beta(1-42)$ и $A\beta(25-35)$ (Arancibia et al., 2008). BDNF в дозе 1 нг/мл восстанавливал долговременную потенциацию в переживающих срезах мозга мышей, обработанных $A\beta(1-42)$ (Criscuolo et al., 2015).

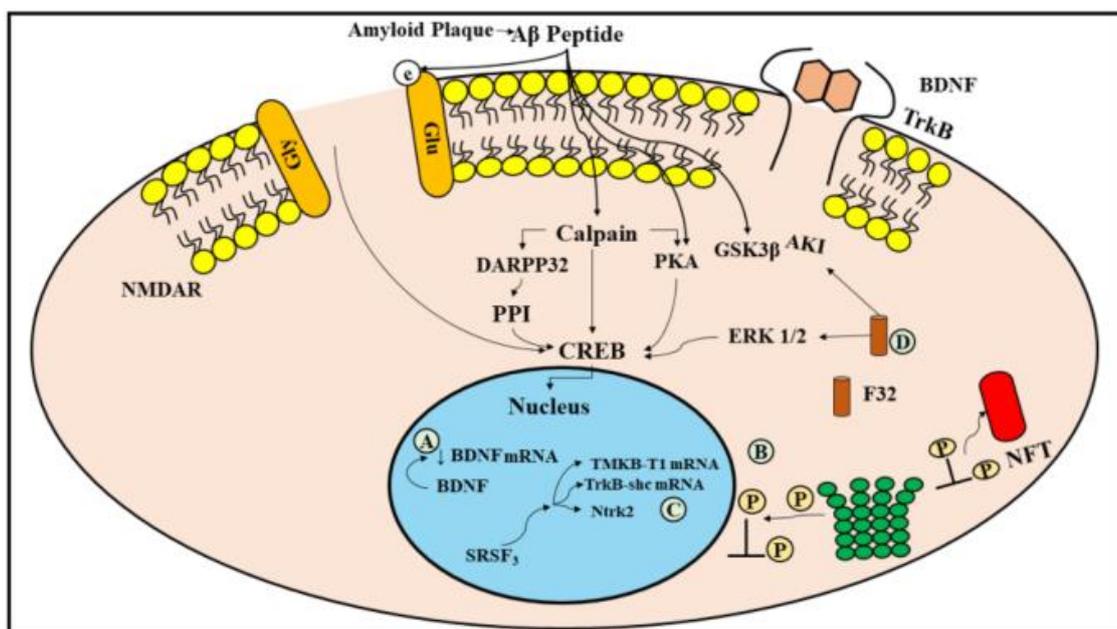


Рисунок 19. Нарушение передачи сигналов BDNF / TrkB при болезни Альцгеймера. У пациентов с БА наблюдается снижение уровня BDNF во многих областях мозга из-за снижения экспрессии генов (а). Активация GSK3 β , которая приводит к гиперфосфорилированию тау-белка, возникает как следствие последующего снижения нейротрофической передачи сигналов (b). Благодаря процессу транскрипции фактора SRSF3 в головном мозге при БА предпочтительна экспрессия усеченных изоформ TrkB (c). Активность GSK3 β и кальпаина, который расщепляет полноразмерный рецептор TrkB (TrkB-FL) рядом с сайтом стыковки рецептора Shc, стимулируется пептидом A β . (г). Активность CREB подавляется различными механизмами, включая снижение уровней рецептора NMDAR и (e) усиление действия PP1. f32, кальпаиновый фрагмент TrkB-FL размером 32 кДа (Girotra et al., 2022)

Несмотря на безусловно важную роль нейротрофинов в патогенезе нейродегенерации и связанные с этим перспективы терапевтического использования, исследования выявили несколько проблем, связанных с клиническим применением нейротрофических факторов. Самые важные из них – это побочные эффекты и их низкая клиническая польза. Основной причиной этого предполагается сложность подбора дозы и затрудненная доставка в мозг (Josiane et al., 2015). Большинство нейротрофических факторов

имеют короткий период полураспада *in vivo*, плохие фармакокинетические свойства и практически не способны проникать через гематоэнцефалический барьер. Таким образом, их доступ к нервным клеткам ограничен их протеолитической деградацией, различными механизмами клиренса (такими как быстрое выведение почками) и связыванием с различными компонентами периферических тканей. В связи с этим идет активная разработка эффективных способов доставки нейротрофических факторов в головной мозг.

В доклинических исследованиях предложены различные возможные фармакологические подходы для повышения уровня BDNF с целью терапии болезни Альцгеймера. Одним из них является использование препаратов, которые повышают продукцию BDNF. Например, уровни BDNF повышались при введении кофеина трансгенным мышам с БА. Хроническое лечение кофеином уменьшало когнитивные нарушения (HAN et al., 2013). Доклиническое исследование (фаза 2) препарата пиоглитазон, обладающего гипогликемическим действием и применяемым при диабете, показало, что он восстанавливает концентрацию BDNF и снижает содержание воспалительных маркеров при введении A β *in vivo* (Galimberti and Scarpini, 2017; Liao et al., 2017). Финголимод также показал значительное повышение уровня BDNF и уменьшение когнитивных нарушений у животных (Angelopoulou and Piperi, 2019; Kartalou et al., 2020)

Также на повышение уровня BDNF направлено применение ингибиторов ацетилхолинэстеразы (AChE) и антидепрессантов. Ингибиторы AChE, такие как донепезил и галантамин, оказались успешными в лечении ранней БА (Leyhe et al., 2008; Alvarez et al., 2016; Shang et al., 2016; Zheng et al., 2018). Принимая во внимание, что одним из основных факторов риска развития БА является депрессия, считается, что антидепрессивное лечение способствует замедлению ее прогрессирования за счет увеличения концентрации BDNF (Colucci-D'Amato et al., 2020; Tiwari et al., 2021).

Поскольку нейродегенерация при БА носит хронический необратимый характер, перспективными представляются методы генной терапии с применением аденоассоциированных вирусных векторов, несущих гены нейротрофических факторов с целью усиления постоянной гиперэкспрессии нейротрофина. На сегодняшний день ряд исследовательских групп работают над разработкой и тестированием вирусных векторных конструкций для долгосрочной экспрессии BDNF в клетках нервной системы. Это является многообещающим методом лечения, поскольку он может помочь избежать длительного употребления препаратов и может действовать целенаправленно на определенный тип клеток.

Подобные исследования начаты сравнительно недавно. Например, было показано, что внутрижелудочковое введение аденоассоциированного вируса (AAB), несущего ген BDNF, уменьшает очаг ишемического инсульта у мышей (Zhang et al., 2011). В работе (Yu et al., 2013) продемонстрировано, что применение AAV-BDNF ускоряет восстановление двигательной функции и стимулирует миграцию нейронов из субвентрикулярной зоны в пораженное полушарие на модели инсульта у крыс. При моделировании травмы спинного мозга применение AAV-BDNF значительно увеличивало количество регенерирующих аксонов (Ziemlińska et al., 2014; Liu et al., 2017)

Также показано нейропротекторное действие AAV-BDNF при одностороннем частичном дорсальном пересечении зрительного нерва (Chiha et al., 2020). Генноинженерный конструкт, несущий ген BDNF, предотвращал апоптоз при моделировании атаксии Фридриха *in vitro*. Этот нейропротекторный эффект BDNF также наблюдался *in vivo* в модели мозжечковой атаксии мыши (Katsu-Jiménez et al., 2016)

Исследований влияния индуцированной генноинженерными векторами гиперэкспрессии BDNF в настоящее время еще крайне мало. Показано, что интравентрикулярная инъекция аденоассоциированного вируса, несущего ген, кодирующий BDNF человека (AAV-BDNF), обеспечивала стабильную экспрессию гена BDNF и восстанавливала уровень BDNF в мозге мышей

линии P301L. У животных наблюдалось уменьшение неврологического дефицита, уменьшалась потеря нейронов, а также наблюдалось облегчение синаптической дегенерации, однако при этом уровень гиперфосфорилирования тау-белка в мозге не изменялся (Jiao et al., 2016)

В работе (Aroga et al., 2022) были предложены функционализированные липосомы, несущие плазмиду, кодирующую ген BDNF. Экспрессия BDNF в тканях мозга мышей линии APP/PS1 AD. Усиливалась в два раза. Отмечалось значительно (на 40%) снижение количества токсичных амилоидных бета-пептидов в мозге мышей, а также увеличение экспрессии синаптических белков, синаптофизина и PSD-95.

Широко известно, что уровень GDNF значительно снижается в тканях мозга, прежде всего черной субстанции, при болезни Паркинсона (Espadas-Alvarez et al., 2017; Aly et al., 2019). Однако, его роль при болезни Альцгеймера крайне мало исследована. Имеются данные, что экспрессия гена GDNF снижена в коре головного мозга старых мышей (Lee et al., 2000) и в гиппокампе мышей в модели ускоренного старения SAMP8 (Miyazaki et al., 2003). Также обнаружено, что снижение уровня GDNF в плазме у пациентов с легкими когнитивными нарушениями является предшественником прогрессирования БА (Siegel and Chauhan, 2000). Кроме того, было обнаружено, что при БА нарушается соотношение изоформ GDNF в ткани мозга (Airavaara et al., 2011). Интерес представляет работа (Revilla et al., 2014). Авторы показали, что применение лентивирусных векторов для сверхэкспрессии гена GDNF в астроцитах гиппокампа мышей 3xTg-AD *in vivo* позволили сохранить обучаемость и память мышей линии 3xTg-AD в возрасте 10 месяцев. Трансплантация стволовых мезенхимальных клеток, сверхэкспрессирующих GDNF было связано с улучшением пространственной памяти у животных при моделировании БА. Отмечалось увеличение уровня белка постсинаптической плотности 95 (PSD-95) и синаптофизина в гиппокампе (Petukhova et al., 2019; Ebrahim et al., 2020).

Таким образом, применение генноинженерных конструкторов, позволяющих индуцировать хроническую сверхэкспрессию нейротрофических факторов является перспективным, однако на сегодняшний день мало изученным направлением поиска способов коррекции функциональной активности и поддержания жизнеспособности нервных клеток при развитии нейродегенеративных процессов и действии повреждающих факторов.

1.3.2. Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF) в физиологии нервной системы

Чувствительность к содержанию кислорода и способность адаптироваться к изменениям его концентрации необходимы для поддержания структурной и функциональной целостности мозга. При низком парциальном давлении кислорода здоровый мозг обладает способностью до определенного предела справляться с гипоксией, запуская гомеостатический ответ, регулируемый высококонсервативным семейством транскрипционных факторов, индуцируемых гипоксией (HIF) (Abe et al., 2017). Это делает HIF чрезвычайно перспективной мишенью для повышения адаптационных возможностей организма при гипоксически-ишемическом повреждении. Более того, в настоящее время признано, что церебральная гипоперфузия и, следовательно, гипоксия являются постоянным признаком развития болезни Альцгеймера. Следует отметить, что снижение мозгового кровотока и оксигенации тканей, обнаруженное в продромальные фазы БА, резко усугубляется по мере прогрессирования заболевания (Correia and Moreira, 2022). В рамках этой парадигмы возникает фундаментальный вопрос: как взаимосвязаны опосредованный HIF гомеостатический ответ мозга на гипоксию при ишемическом повреждении и нейродегенерации и система нейротрофических факторов?

1.3.2.1. Строение и основные функции индуцируемого гипоксией фактора

В настоящее время функции HIF активно исследуются. Как известно, Уильям Келин (William G. Kaelin) и Грегг Семенца (Gregg L. Semenza) из США и сэр Питер Рэтклифф (Peter J. Ratcliffe) из Великобритании в 2019 г. получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за исследование механизмов адаптации организма к гипоксии на клеточном уровне и открытие роли фактора HIF в регуляции уровня гормона эритропоэтина, а также исследования реакции опухолевых клеток на гипоксию как механизм неоваскуляризации и роста опухоли.

Крайне важно, чтобы нейроны в ЦНС могли быстро и адекватно реагировать на изменение концентрации кислорода и гипоксическое повреждение мозга (Abe et al., 2017). Нарушение кислородного обмена и функционирования митохондрий в результате гипоксии вызывают деструктивные структурные и функциональные изменения нервных клеток, что приводит к их гибели (Azevedo et al., 2020; Kumari et al., 2020; Zhuravin et al., 2019).

Одним из основных регуляторов ответа клетки на гипоксию является индуцируемый гипоксией белковый фактор-1 (HIF1), который контролирует экспрессию большого количества (более 700) различных генов-мишеней, опосредующих как адаптивные, так и патологические процессы (Barteczek et al., 2017; Dengler et al., 2014; H. Liu et al., 2018; Lukyanova & Kirova, 2015; Salhanick et al., 2006; Semenza, 2004; Sheldon et al., 2014; Z. Wu et al., 2019). Ключевыми группами генов являются гены-мишени, связанные с ангиогенезом и энергетическим метаболизмом, к которым относится прежде всего ген эритропоэтина (EPO), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и гены, которые участвуют в транспорте или гликолизе глюкозы, например переносчика глюкозы-1 (GLUT1), пируватдегидрогеназы киназы 1 (PDK1) и лактатдегидрогеназы А (LDHA) (“When the Brain Yearns for Oxygen,” 2019).

HIF1 является дигетеродимером и состоит из конститутивно экспрессируемых α и β субъединиц. Однако, если β -субъединица присутствует в клетке конститутивно, то α -субъединица в нормоксических условиях подвергается быстрой убиквитин-зависимой протеасомной деградации под действием кислород-зависимой HIF-пролилгидроксилазы (PHD) (Semenza, 2004, 2009). В гипоксических условиях происходит инактивация PHD, что приводит к стабилизации HIF-1 α и дальнейшей ее транслокации в ядро, где формируется гетеродимерный комплекс с HIF-1 β . Данный комплекс взаимодействует с ДНК и активирует экспрессию ряда генов, продукты которых способствуют увеличению снабжения кислородом тканей благодаря усилению эритропоэза и ангиогенеза (рис.20). Таким образом, активация комплекса HIF инициирует нейропротекцию, а, как следствие, восстановление функционирования клеток, поврежденных при гипоксии (Bergeron et al., 2000; Cho et al., 2015; Ivan et al., 2001; Salceda & Caro, 1997; Semenza, 2017; Sheldon et al., 2009). При инактивации HIF-1 α , например, при мутации в соответствующем гене, в постишемическом периоде наблюдаются более выраженные нарушения способности к обучению и снижение нейрогенеза (Carrica et al., 2019). Кроме того, инактивация HIF-1 α увеличивает объем повреждения головного мозга и снижает выживаемость животных при моделировании ишемии (Baranova et al., 2007; Milosevic et al., 2007; Sheldon et al., 2009).

Сигнальный путь HIF-1 является основным молекулярным каскадом для передачи сигналов от многих факторов, которые связаны с гипоксически-ишемическим повреждением головного мозга. HIF-1, по-видимому, является главным универсальным переключателем активности молекул, контролирующей выживание клеток, метаболизм и транспорт глюкозы, а также метаболическую адаптацию. Интересно отметить, что HIF-1 α оказывает комплексное воздействие на мозг в зависимости от времени развития гипоксического повреждения. Было показано, что накопление HIF-1 α непосредственно после ишемии способствует гибели клеток на самой ранней

стадии (<24 ч, эффект смерти) (Barteczek et al., 2017; Cheng et al., 2014; X.-S. Yang et al., 2017). Напротив, HIF-1 α ограничивает размер инфаркта на более поздней стадии ишемического повреждения (> 4 дня, эффект выживания) (Baranova et al., 2007; Sheldon et al., 2014). Таким образом, роль HIF1 в выживании нервных клеток является многофакторной и противоречивой.

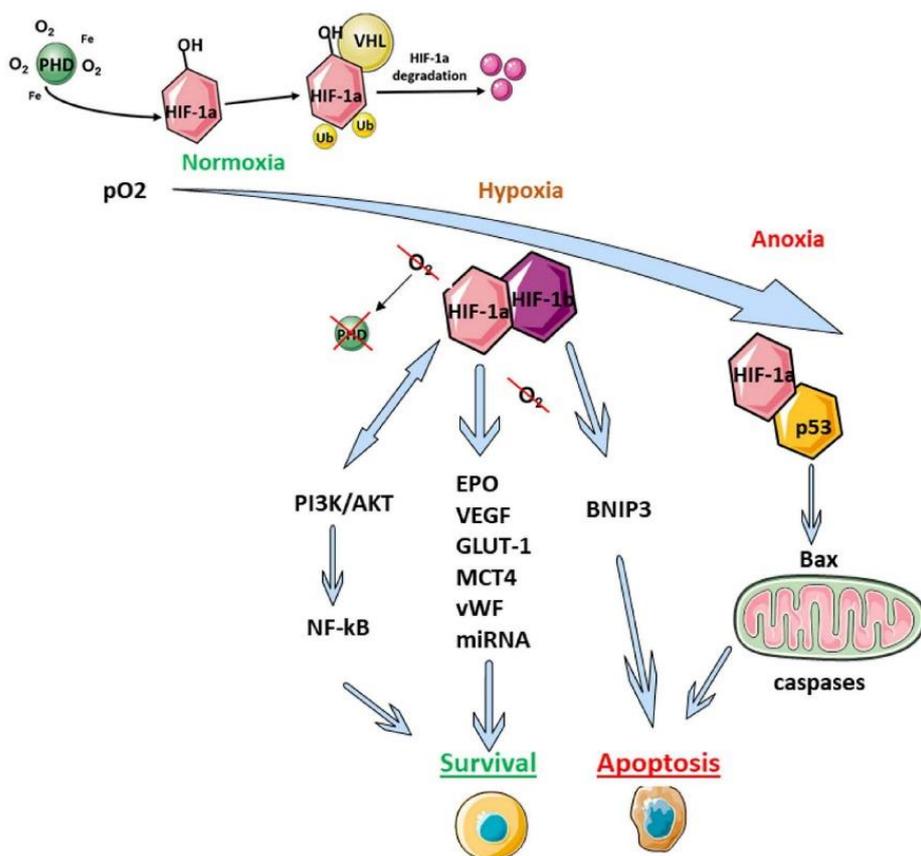


Рисунок 20. Схема HIF-опосредованной регуляции адапционных реакций клетки. АКТ1 - серин-треониновая протеинкиназа АКТ1; Вах - регулятор апоптоза, также известный как bcl-2-подобный протеин 4; BNIP3 - член семейства апоптотических белков Bcl-2; ЕРО - эритропоэтин; GLUT-1 - односторонний белок-переносчик глюкозы - 1; HIF - фактор, индуцируемый гипоксией; МСТ4 - монокарбоксилатный транспортер 4; р53 - проапоптотический транскрипционный фактор; PI3K - фосфоинозитол-3-киназа; PHD - HIF-пролилгидроксилаза; Ub - убиквитин; VEGF - фактор роста эндотелия сосудов; VHL - опухолевый супрессор VHL, белок Гиппеля-Ландау; vWF - фактор фон Виллебранда (Mitroshina et al., 2021)

Помимо этого, по-видимому, HIF участвует регуляции гипоксического ответа и иными способами. Например, этот фактор индуцирует чувствительные к гипоксии микроРНК, которые играют большую роль в модуляции клеточного ответа на гипоксический стресс (Z. Chen et al., 2013; G. Zhang et al., 2020). MiRNA представляют собой класс небольших некодирующих РНК, которые регулируют стабильность и трансляцию мРНК путем связывания с 3'UTR мРНК, что приводит к снижению уровней белка. Показано, что HIF-1 α может регулировать miRNAs на уровне транскрипции (W. Yang et al., 2019) и наоборот, экспрессия HIF регулируется miRNA. Однако большинство исследований HIF-связанных miRNA сосредоточено на линиях раковых клеток, а роль miRNA в остальных типах клеток часто игнорируется (Serocki et al., 2018). В настоящее время идентифицировано около 40 miРНК, которые модулируют экспрессию HIF (Serocki et al., 2018).

Также важно отметить, что HIF-1 α широко участвует в регуляции активности пути PI3K / Akt, одной из нижележащих мишеней которого является транскрипционный фактор NF- κ B (Bao et al., 2018; Lee et al., 2017; Lyu et al., 2018; Walmsley et al., 2005).

Например, пролилгидроксилазы PHD1 и PHD3 ингибируют киназу I κ B (IKK) в сигнальном пути NF κ B, тем блокируя его активацию при нормальной концентрации кислорода (рис. 21). PHD2 также может действовать как негативный регулятор передачи сигналов NF κ B во время ангиогенеза. Точный молекулярный механизм этого процесса пока еще неизвестен. Возможно, PHD1, PHD2 и PHD3 негативно регулируют формирование комплекса IKK, возможно, посредством гидроксилирования IKK β . PHD3 напрямую взаимодействует с IKK β независимым от гидроксилазы способом и блокирует образование комплекса между IKK β и белком теплового шока (Hsp)90, что предотвращает активацию пути NF- κ B (Wong et al., 2013)

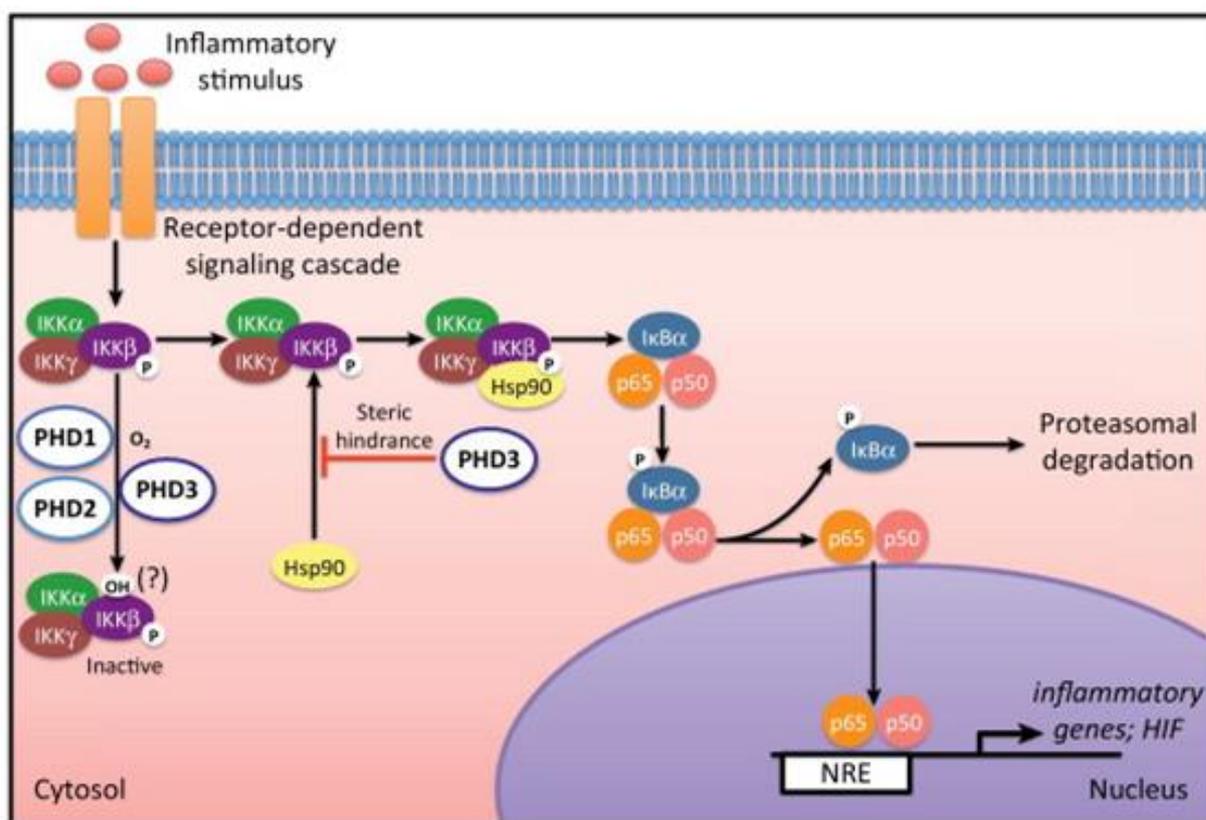


Рисунок 21. Активность ядерного фактора (NF)κВ отрицательно регулируется пролилгидроксилазами фактора, индуцируемого гипоксией (HIF) (Wong et al., 2013)

1.3.2.2. Нейропротекторная роль HIF-1 при ишемическом повреждении

Фактор, индуцируемый гипоксией – новая потенциальная мишень для терапии огромного количества заболеваний, ассоциированных с гипоксией. Несмотря на то, что большая часть экспериментальных работ посвящена роли фактора HIF в тканях печени и почек, на сегодняшний день понятно, что фактор, индуцируемый гипоксией, является универсальным адаптационным механизмом для всех тканей организма, в том числе и для нервной системы. Важно отметить, что HIF также имеет решающее значение для регуляции нейрогенеза, дифференцировки нервных клеток, а также апоптоза нейронов.

Различные методы регуляции экспрессии и активности комплекса HIF1 могут являться способом предотвращения развития гипоксического

повреждения головного мозга. На данный момент применяется несколько подходов к модуляции активности комплекса HIF-1. Во-первых, широко используемым способом индукции HIF-1 является применение блокаторов ферментов, участвующих в деградации субъединицы HIF-1 α в нормоксических условиях, либо нокаут их генов. Чаще всего применяются блокаторы PHD (Barteczek et al., 2017; Jeon et al., 2019; L. Li et al., 2016; Ramamoorthy et al., 2019; Siddiq et al., 2005). Во-вторых, разработаны белки и различные агенты, контролирующие экспрессию субъединицы HIF-1 α и ее стабилизацию (Neuregulin-1 (NRG1) (Davis et al., 2018; Davis & G.K., 2020; R. Wang et al., 2012; Yoo et al., 2019). И в-третьих, возможна физиологическая индукция накопления HIF-1 α до возникновения острой гипоксии с помощью гипоксического preconditionирования (Gu et al., 2008; Y. Li et al., 2018; C.-S. Wu et al., 2020). Сообщалось, что гипоксическое preconditionирование повышает резистентность к ишемическому повреждению головного мозга и снижает апоптоз нейронов за счет усиления экспрессии HIF-1 α (Snigdha et al., 2012).

Установлено, что при увеличении содержания HIF-1 α при делеции супрессора HIF пролил-4-гидроксилазы 2 (PHD2) в клетке происходит усиление экспрессии EPO и VEGF, а также усиление нейрогенеза в гиппокампе и улучшение когнитивных функций у мышей, страдающих хронической гипоперфузией мозга. При этом локальная плотность микрососудов, морфология дендритных шипиков и экспрессия генов, связанных с синаптической пластичностью в гиппокампе не изменялась (Gruneberg et al., 2016; L. Li et al., 2016).

Применение блокаторов PHD, большинство из которых является хелаторами железа, также приводит к ингибированию клеточной смерти путем ферроптоза, что может опосредовать их нейропротекторные свойства (Speer et al., 2013).

Было установлено, что активация сигнального пути HIF-1 α тесно связана с ингибированием апоптоза нейронов (Gao et al., 2019). Однако,

влияние стабилизации комплекса HIF- α на апоптоз неоднозначно, о чем свидетельствуют большое количество противоположных данных. Вероятно, что HIF-1 α может как индуцировать, так и ингибировать апоптоз. Сверхэкспрессия HIF-1 α приводит к увеличению экспрессии многих защитных генов, что делает клетки устойчивыми к апоптозу, вызванному гипоксией или недостатком питательных веществ (Akakura et al., 2001; S. Yang et al., 2017). Субъединицы HIF α участвуют в регуляции активности множества членов семейства Bcl-2 как с проапоптотическими, так и с антиапоптотическими свойствами (Y. Fang et al., 2020). Антиапоптотические изменения включают повышение уровней Bcl-2 (Sasabe et al., 2005) и Mcl-1 (X.-H. Liu et al., 2006; Palladino et al., 2012; Sharma et al., 2011), индукцию Bcl-xL (N. Chen et al., 2009; Menrad et al., 2010) (через связывание HIF-1 α с элементом ответа на гипоксию в Bcl-xL) и снижение уровней проапоптотических факторов Bid, Bax и Bak (Sasabe et al., 2005). HIF-1 α также был связан с регуляцией функции митохондрий через гексокиназы. Сообщалось, что гексокиназа II не только катализирует первый этап гликолиза, но и сдвигает апоптотический баланс, связываясь с потенциал-зависимым анионным каналом (VDAC) на митохондриальной мембране (Pastorino & Hoek, 2008). Как и многие другие гликолитические ферменты, гексокиназа II может быть индуцирована HIF-1 α , и недавнее исследование показало, что гексокиназа II имеет решающее значение для эффекта Варбурга при мультиформной глиобластоме. Это прямое взаимодействие, наиболее вероятно независимое от Bax и Bak (Lambert et al., 2010; Wolf et al., 2011), могло, таким образом, объединить предпочтительное использование аэробного гликолиза (эффект Варбурга) с ингибированием апоптоза.

Однако, HIF1 α способен запускать p53-индуцированный апоптоз. Было предложено по крайней мере три различных типа взаимодействия между HIF-1 α и p53. Во-первых, прямое межбелковое взаимодействие было предложено в качестве основного механизма стабилизации p53, вызванной гипоксией. Два разных исследования предоставили данные *in vitro*, предполагающие прямое

связывание домена ODD (кислород-зависимая деградация) HIF-1 α с p53. Более того, сообщалось о прямых взаимодействиях *in vitro* и *in vivo* между HIF-1 α и Mdm2 для модуляции функции p53 и ассоциации VHL и p53 для стабилизации p53 (Roe et al., 2006). Более подробно этот аспект будет рассмотрен позднее.

Одним из важных путей нейропротекторного действия HIF-1 α является усиление экспрессии эритропоэтина (EPO), играющего важную роль в процессах адаптации к гипоксии (L. Li et al., 2014, 2020; L. Zhang et al., 2009). Известно, что продукция EPO активируется гипоксией в мозге, матке и почках мышцей (Chikuma et al., 2000). Введение EPO защищало эмбриональные и постнатальные нейроны гиппокампа от гибели, вызванной гипоксией, стимулировало олигодендрогенез и уменьшало повреждение белого вещества при моделировании гипоксического повреждения головного мозга (Iwai et al., 2010). Кроме того, EPO ослаблял воспалительный ответ за счет снижения продукции циклооксигеназы 2 и индуцибельной NO-синтазы, подавляя активацию микроглии и ингибируя активацию аутофагии при вызванной ожоговой травмой нервно-мышечной дисфункции (Wu et al., 2018). Показано, что усиление экспрессии HIF-1 α в нейронах и астроцитах ведет к усилению экспрессии EPO, что, в свою очередь, приводило к ускорению восстановления неврологических функций за счет уменьшения апоптоза нейронов (Li et al., 2020; Rey et al., 2019).

Кроме ишемического инсульта, к ишемически-гипоксическому повреждению головного мозга может приводить черепно-мозговая травма (ЧМТ). В работах *in vivo* продемонстрировано, что церебральная гипоксия-ишемия, вызванная черепно-мозговой травмой (ЧМТ), играет решающую роль в возникновении различных тяжелых вторичных повреждений головного мозга (Shu et al., 2016; Xu et al., 2012). После ЧМТ снижается доставка кислорода к нервным клеткам, что приводит к нарушению метаболизма глюкозы (Yamaki et al., 2018). Это является одной из основных причин апоптоза нейронов и неврологических нарушений после ЧМТ (DeVience et al., 2017). Транспортёр глюкозы (GLUT) является наиболее важным белком для

транспорта глюкозы (Wood & Trayhurn, 2003) и играет незаменимую роль для продукции энергии в головном мозге после повреждения (Zhou et al., 2017). В результате увеличения экспрессии HIF-1 α при гипоксии происходит повышение уровней GLUT1 и GLUT3, что позволяет увеличить поступление глюкозы в гипоксические нейроны для гликолиза (Sadlecki et al., 2014). Улучшение энергоснабжения способствует снижению гибели нейронов.

Показано, что соединения, влияющие на сигнальный путь HIF-1 α , например, Нейротропин, Эмпаглифлозин, Дексмедетомидин (Abdel-latif et al., 2020; W.-L. Fang et al., 2017; Luo et al., 2017) могут защитить нервные клетки от гибели при ишемии. Так же активация сигнального пути HIF-1 α / p53 может играть роль в лечении гипоксической энцефалопатии новорожденных. Это является теоретической основой для эффективного лечения дексмедетомидином (DEX) при гипоксической энцефалопатии новорожденных (Gao et al., 2019).

Еще одним важным аспектом нейропротекторного эффекта при гипоксическом повреждении является его участие в нейрогенезе. Ингибирование нейрогенеза способно вызвать нарушения памяти (Hollands et al., 2017; Pereira-Caixeta et al., 2018), а усиление нейрогенеза можно использовать в качестве подхода для компенсации когнитивных потерь, связанных с возрастом или различными заболеваниями (Berdugo-Vega et al., 2020; Kempermann, 2008). Продемонстрировано, что HIF-1 α является одним из регуляторов нейрогенеза нейронов гиппокампа у постнатальных организмов (Carrica et al., 2019), поэтому, HIF-1 α является потенциальной терапевтической мишенью для поддержания когнитивных функций и коррекции нарушений поведения при различных патологиях головного мозга в том числе и посредством модуляции нейрогенеза (Braun & Jessberger, 2014).

Возможно, что стимуляция нейрогенеза осуществляется HIF-1 α путем регуляции продукции нейротрофических факторов. Показано, что индукция гипоксии приводит к усилению экспрессии мРНК и генов BDNF и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (Nouri et al., 2016).

Генетическая инактивация HIF-1 α в нестин+ клетках-предшественниках нейронов гиппокампа у мышей и их потомства вызывает выраженное, почти двукратное, снижение нейрогенеза. Это приводит к ухудшению пространственного и контекстного распознавания объектов и способности к обучению. Таким образом, экспрессия HIF-1 α является критической для поддержания нейрогенеза во взрослом мозге и поддержанию гиппокампальных функций (Carrica et al., 2019; Dillen et al., 2020)

Интересно отметить, что HIF-1 α не подвергается деградации в стволовых клетках, включая нервные стволовые клетки субвентрикулярной зоны (SVZ) гиппокампа, даже в нормоксических условиях, в отличие от прочих видов клеток (Kim et al., 2019; Palomäki et al., 2013). Продемонстрировано, что самообновление стволовых клеток регулируется комплексом транскрипционных факторов HIF-1 α , действующих вместе с эпигенетическими регуляторами CBX7. Вероятно, гипоксия регулирует экспрессию CBX7 посредством активации HIF-1 α . Повышенная регуляция CBX7 после ишемического повреждения головного мозга может играть важную роль в усилении пролиферации нейрональных предшественников в постишемическом периоде (Chiu et al., 2020).

1.3.2.3. Негативные эффекты, оказываемые HIF-1 при ишемии

Поскольку большинство генов-мишеней HIF опосредуют как адаптационные, так и патологические процессы, роль HIF-1 α в выживании нейронов является дискуссионной (Barteczek et al., 2017; Sheldon et al., 2009).

Было показано, что активация HIF1 в ранней острой фазе гипоксического ответа запускает каскад негативных церебральных событий, связанных с подавлением пентозофосфатного пути (Vetrovoy et al., 2020). Пентозофосфатный путь окисления глюкозы ограничивает развитие окислительного стресса, вызванного кислородно-глюкозной депривацией, поскольку воздействует на окислительно-восстановительный клеточный

гомеостаз и антиоксидантную систему клетки (Fernandez-Fernandez et al., 2012; Sun et al., 2017; Vetrovoy et al., 2020).

Кроме того, одним из генов, находящихся под контролем HIF является ген белков-котранспортеров Na-K-Cl 1 (NKCC1) (Yang et al., 2019), экспрессия которых резко увеличивается при гипоксии. Их активация усугубляет отек и повреждение головного мозга (Chao et al., 2020)

Имеются экспериментальные свидетельства того, что ограничение экспрессии HIF-1 α на ранних стадиях гипоксического повреждения может способствовать увеличению жизнеспособности нейронов при моделировании гипоксии как *in vitro*, так и *in vivo*. Например, продемонстрирован положительный эффект подавления индуцированного гипоксией накопления HIF-1 α с применением кофеина в клинически значимых дозах (Li et al., 2019).

В работе Barteczek, 2017 описано, что у мышей с двойным нокаутом Hif1a / Hif2a снижена экспрессия проапоптотических генов Bnip3, Bnip3L и Pmaip1, что приводило к уменьшению клеточной гибели и сокращению отека мозга через 24 часа после окклюзии средней мозговой артерии, однако данный эффект не наблюдался через 72 часа реперфузии. Неврологический статус и сенсомоторные функции у животных с дефицитом Hif1a / Hif2a имели более высокие показатели на первые сутки после моделирования ишемии/реперфузии, однако через 72 часа они значительно снизились по сравнению с показателями животных дикого типа. Ухудшение состояния животных сопровождалось усилением апоптоза и снижением ангиогенеза. Аналогичный положительный эффект при фармакологическом ингибировании HIF1 блокатором 2ME2 (Sigma-Aldrich (M6383)) сразу после операции продемонстрирован (Cheng et al., 2014). Улучшение показателей у животных наблюдалось через 24 часа после ишемии/реперфузии. Выявлено снижение уровней расщепленной (cleaved) каспазы-3, транскрипционного фактора NF- κ B phospho-p65, фосфорилированной киназы JNK1, 2/3 и общего содержания киназы JNK1, 2/3 (Cheng et al., 2014).

Таким образом, когда нервные клетки подвергаются хронической или острой выраженной гипоксии, защитный адаптивный механизм, инициированный HIF-1, очевидно недостаточен, что приводит к гибели клеток. Кроме того, HIF-1 участвует в инициации апоптоза. Показано, что одним из генов, находящихся под контролем HIF-1 альфа является ген, кодирующий белок Nip3 - проапоптотический член семейства Bcl-2 (Brück, 2000; Sowter et al., 2001). Также при гипоксии наблюдается стабилизация проапоптотического белка p53, которая происходит одновременно с накоплением HIF-1 α и зависит от его присутствия (An et al., 1998; Krick et al., 2005). Прямое взаимодействие между p53 и HIF-1 α приводит не только к стабилизации p53, но также к ингибированию HIF-1-зависимой транскрипции многих генов, которые способны предотвратить гипоксическое повреждение (Madan et al., 2019; Wang et al., 2018; Wang et al., 2019).

Таким образом, большая группа экспериментальных данных указывает на негативный эффект ингибирования пути HIF в нервных клетках в наиболее острой фазе после ишемического инсульта.

Важно отметить, что роль фактора HIF в индукции апоптоза также зависит от тяжести гипоксии: при легкой гипоксии его влияние является скорее защитным благодаря индукции экспрессии различных антиапоптотических белков. С другой стороны, тяжелая гипоксия (аноксия) приводит к гибели клеток, по крайней мере частично вызванной HIF-1 α -опосредованной стабилизацией p53 (Levine, 1997; Suzuki et al., 2001).

Таким образом, активаторы HIF1 могут быть использованы в нейропротекции, однако с особой осторожностью.

1.3.2.4. Нейропротекторная роль фактора HIF-1 при нейродегенеративных заболеваниях

В последние годы появляются экспериментальные данные, свидетельствующие о значимой роли HIF-1 α в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, в том числе при болезни Альцгеймера

(рис. 22). Все больше экспериментальных подтверждений получает парадигма о связи гипоксии головного мозга с БА. Например, факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний сильно коррелируют со спорадической формой БА (LOsAD) (Leszek et al., 2020). К другим значительным факторам риска LOsAD относится черепно-мозговая травма, особенно хроническая травматическая энцефалопатия (Stein & Crary, 2020; van den Heuvel et al., 2007). При БА отмечается снижение кровотока в мозге и дисфункция нейроваскулярной единицы, что вероятно вызывает нарушение оксигенации (Ahmad et al., 2020; Xing et al., 2020). Интересно, что последние исследования показывают, что аэробные упражнения могут снизить риск БА за счет улучшения снабжения мозга кислородом (de la Rosa et al., 2020).

Фармакологическая активация HIF-1 способна оказывать нейропротекторный эффект при БА и может использоваться в терапии (Ashok et al., 2017; Guo et al., 2015, 2017; Merelli et al., 2018). Повышенная активность HIF-1 и / или экспрессия генов-мишеней HIF-1, участвующих в гликолизе или регуляции капиллярного кровоснабжения, являются компонентом ранней адаптации к окислительному стрессу и могут замедлить снижение когнитивных функций и переход к более тяжелым стадиям БА (Iyalomhe et al., 2017). Трансдукция первичных культур гиппокампа вирусным вектором rAAV-HIF-1 α значительно снизила уровень апоптоза в культурах, индуцированного бета-амилоидным пептидом (Chai et al., 2014). Клиническое применение индукторов HIF-1 также продемонстрировало нейропротекторное действие HIF-1 при БА (Ashok et al., 2017). Дефероксамин (DFO), широко используемый индуктор HIF-1, использовался в клинических испытаниях у пациентов с БА и замедлял снижение когнитивных функций (Zhang et al., 2015).

Кроме того, с помощью процедуры генной терапии с помощью аденоассоциированного вируса rAAV-HIF-1 α , который индуцировал экспрессию человеческого гена HIF-1 α было продемонстрировано, что HIF-1 α может значительно снижать апоптоз, индуцированный A β -белком, как в

культурах нейронов гиппокампа, так и при введении животным (Chai et al., 2014).

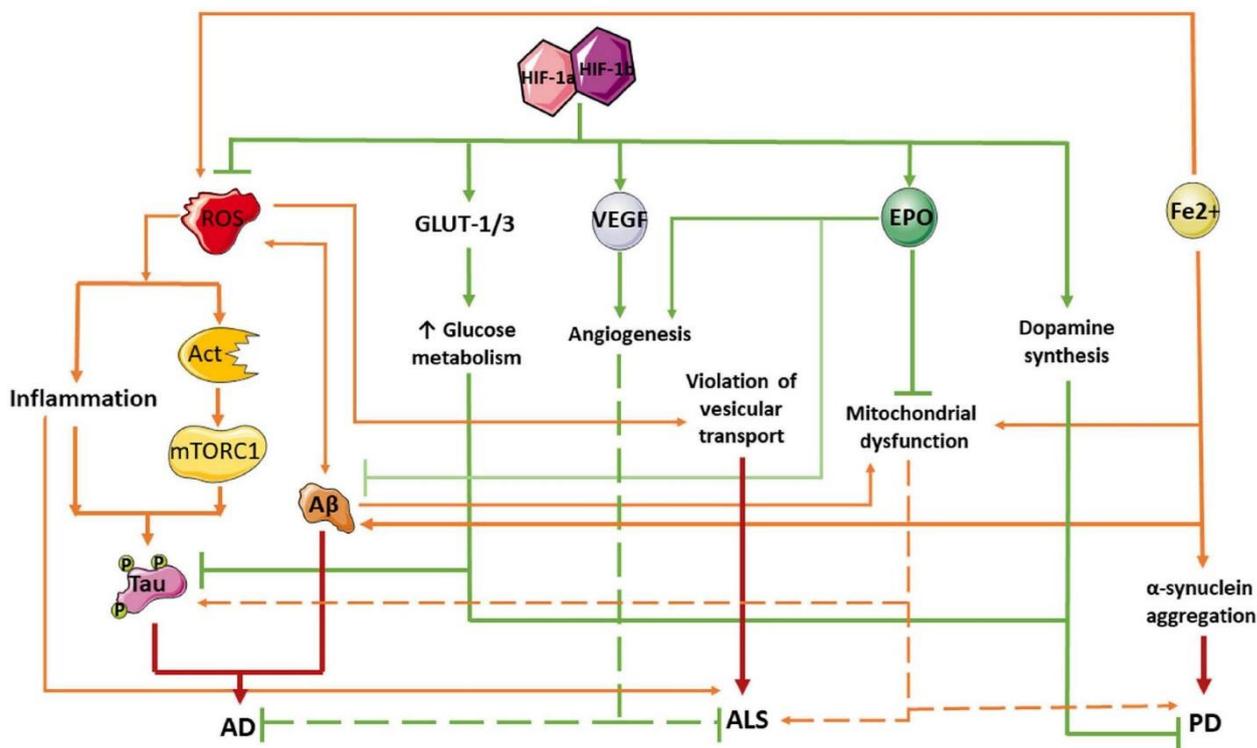


Рисунок 22. Защитная роль пути HIF-1 при нейродегенерации. Красные стрелки указывают на отрицательные эффекты, а зеленые линии и стрелки означают положительные эффекты. Aβ – бета-амилоид; AD – болезнь Альцгеймера; АКТ - серин-треониновая протеинкиназа АКТ1; ALS – боковой амиотрофический склероз; EPO, эритропоэтин; GLUT-1/3 – односторонний белок-переносчик глюкозы 1 или 3; HIF, фактор, индуцируемый гипоксией; mTORC1 - мишень рапамицина млекопитающих, протеинкиназа серин-треониновой специфичности; PD – болезнь Паркинсона; ROS, активные формы кислорода; Tau – тау протеин; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (Mitroshina et al., 2021)

Однако выявлено, что HIF-1 играет большую роль и в модуляции амилоидогенного процессинга белка-предшественника β-амилоида, а у людей, страдающих ишемией риск возникновения БА увеличен. HIF-1α индуцирует увеличение экспрессии BACE1, основной протеазы, катализирующей β-

расщепление APP, что указывает на прямую связь между HIF-1 α и БА. Более того, у мышей с дефицитом HIF-1 α наблюдается сниженная экспрессия BACE1 в некоторых областях мозга, таких как гиппокамп и кора головного мозга. Эти результаты указывают на важную роль гипоксии/HIF-1 α в модуляции амилоидогенного процессинга APP. Кроме того, было продемонстрировано, что церебральная ишемия и инсульт индуцируют сверхэкспрессию HIF-1 α , который по своему проапоптотическому пути посредством p53 увеличивает экспрессию BACE1, связанной с амилоидогенным процессом (Zhang et al., 2007).

В настоящее время появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что гипометаболизм глюкозы может играть ключевую роль в развитии болезни Альцгеймера (Kuehn, 2020). Также показано, что снижение экспрессии транспортеров глюкозы GLUT1 и GLUT3 может быть результатом снижения уровней HIF-1 α в мозге при БА, что тесно связано с аномальным гиперфосфорилированием тау (Liu et al., 2008). HIF-1 α также регулирует экспрессию GLUT4, и его снижение нарушает транслокацию GLUT4 и поглощение глюкозы (Sakagami et al., 2014). Zhang с соавт. продемонстрировали, что применение α -липоевой кислоты, мощного хелатора железа, может восстанавливать поглощение глюкозы и гликолиз у мышей с моделью таупатии и болезни Альцгеймера за счет активации пути BDNF/TrkB/HIF-1 α (Zhang et al., 2020). Авторы предполагают, что хроническая обработка α -липоевой кислотой индуцирует повышенный уровень экспрессии BDNF в нейронах и астроцитах мозга мышей линии P301S, затем происходит связывание BDNF с рецептором TrkB-FL и далее комплекс p-TrkB-FL транслоцируется в цитоплазму клетки за счет образования эндосом. Предполагается, что комплекс BDNF-TrkB-FL повышает уровень белка HIF-1 α и способствует транслокации ядра HIF-1 α , индуцируя экспрессию следующих генов-мишеней, таких как GLUT3, GLUT4 и HO-1, VEGF. Однако молекулярные каскады, отвечающие за взаимодействие BDNF/TrkB и HIF-1 α при моделировании болезни

Альцгеймера остались нераскрытыми, как и при гипоксическом повреждении (рис.23).

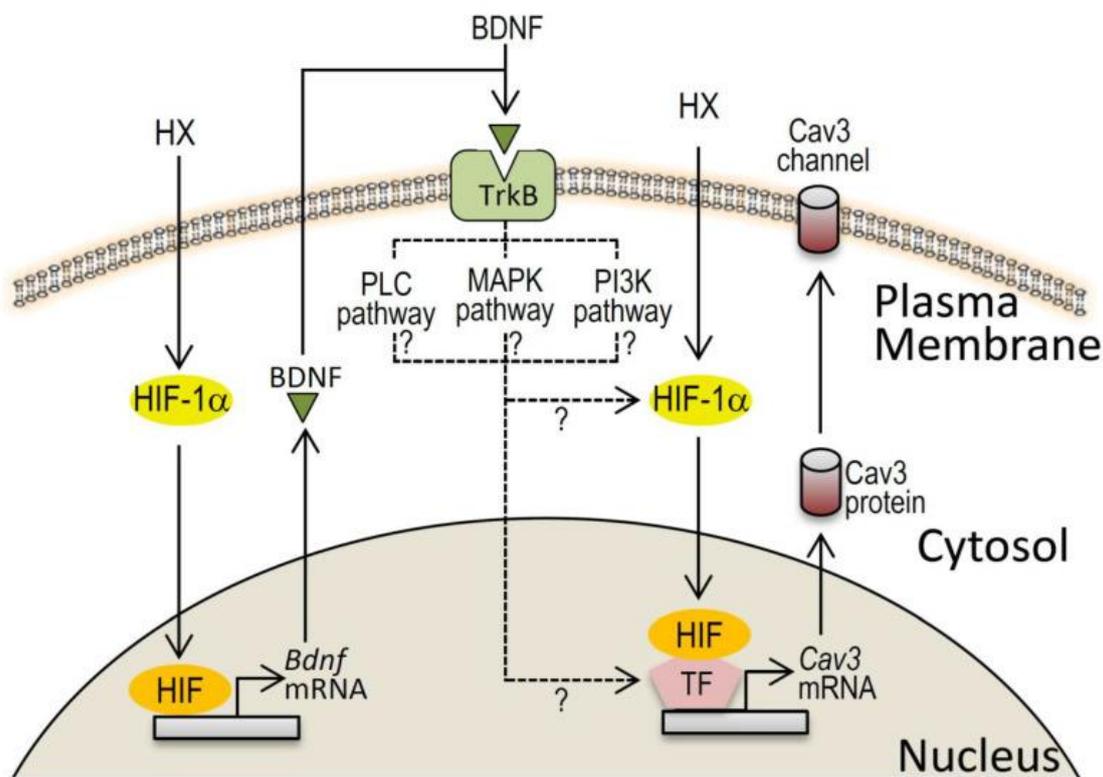


Рисунок 23. Схема гипотетического взаимодействия BDNF-гипоксии в регуляции каналов Cav3 в кардиомиоцитах. Воздействие гипоксии на BDNF может работать как позитивный регулятор для экспрессии каналов Ca²⁺ Cav3-Т-типа посредством активации HIF-1α в кардиомиоцитах, хотя нижележащие сигналы BDNF/TrkB и целевого фактора(ов) транскрипции (TF) неизвестны (Morishima et al., 2021)

На основании изученной научной литературы можно предположить, что система нейротрофических факторов и система фактора, индуцируемого гипоксией - две ведущие эндогенные системы, регулирующие устойчивость головного мозга к повреждающим воздействиям, работающие на разных временных интервалах. Система HIF является системой оперативного реагирования на изменение концентрации кислорода. Нейротрофические факторы требуют для реализации своего защитного действия больше времени.

Вероятно, между данными системами существуют точки взаимодействия и общие молекулярные механизмы, выявление которых позволит глубже понять функционирование адаптационных процессов в головном мозге.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Материалом для исследований *in vitro* явились первичные культуры клеток гиппокампа, полученные от 18 дневных (E18) мышинных эмбрионов линии C57BL/6 и первичные культура клеток гиппокампа, полученные от мышей линии 5xFAD. Содержание животных осуществлялось в сертифицированном SPF-виварии Национального исследовательского Нижегородского государственного университета и исследовательская работа проводилась в соответствии с требованиями приказа №267МЗ 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 биоэтической комиссией Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Эвтаназия беременных самок проводилась методом дислокации цервикальных позвонков.

2.2. Схема и объем экспериментов

Работа выполнялась в несколько этапов. Иллюстрированные схемы экспериментов каждого этапа представлены в соответствующих разделах Главы 3. На первом этапе были разработаны и адаптированы методы экспериментального моделирования компонентов ишемического повреждения и комплекса ишемия-подобных условий. Исследована роль нейротрофических в адаптации нейронных сетей к воздействию повреждающих факторов ишемии. Выполнена оценка реорганизации функциональной архитектуры нейрон-глиальных сетей. Проведено исследование возможных киназ-опосредованных молекулярных механизмов нейропротекторного действия BDNF и GDNF, а также взаимосвязь с фактором, индуцируемым гипоксией HIF1. На втором этапе исследования

были разработаны и адаптированы подходы к моделированию бета-амилоидоза как ключевого патогенетического компонента болезни Альцгеймера и изучены особенности функционирования нейрон-глиальных сетей при развитии нейродегенеративных процессов. Оценен нейропротекторный потенциал нейротрофического фактора BDNF в коррекции нейродегенеративных процессах и поддержании функциональной нейросетевой активности при хроническом применении рекомбинантного белка и при индукции гиперэкспрессии BDNF с помощью аденоассоциированного генноинженерного вирусного вектора. На третьем этапе исследована роль комплекса HIF-1 в адаптации нейронных сетей к гипоксическому повреждению и моделированию болезни Альцгеймера.

Количество использованных культур и экспериментальные группы описаны в таблице 2.

Таблица 2

**Распределение используемых тест-систем *in vitro* – *дополнить*
*заполнить***

Этап	Используемый метод	Количество культур диссоциированных клеток гиппокампа:
Молекулярно-клеточные механизмы, лежащие в основе эффектов, оказываемых нейротрофическими факторами BDNF и GDNF на адаптацию нервных клеток к действию повреждающих факторов	Исследование жизнеспособности	Культур гиппокампа мышей C57BL - 373
	Электронная микроскопия	Культур гиппокампа мышей C57BL - 24
	ПЦР в реальном времени	Культур гиппокампа мышей C57BL - 48
	Исследования спонтанной биоэлектрической активности	Культур гиппокампа мышей C57BL - 30
	Исследование кальциевой активности	Культур гиппокампа мышей C57BL - 55
Исследование влияния хронического увеличения уровня экспрессии BDNF на функциональное состояние	Исследование жизнеспособности	Культур гиппокампа мышей C57BL - - 180 Культур гиппокампа мышей 5xFAD -18

нейрон-глиальных сетей при моделировании повреждающих факторов <i>in vitro</i>	Иммуноцитохимические исследования	Культур гиппокампа мышей C57BL - - 45 Культур гиппокампа мышей 5xFAD -15
	Исследования спонтанной биоэлектрической активности	Культур гиппокампа мышей C57BL - 45
	Исследование кальциевой активности	Культур гиппокампа мышей C57BL - 150 Культур гиппокампа мышей 5xFAD -15
Влияние модуляции системы фактора, индуцируемого гипоксией на адаптацию нервных клеток к действию повреждающих факторов	Исследование жизнеспособности	Культур гиппокампа мышей C57BL - 150
	Исследование кальциевой активности	Культур гиппокампа мышей C57BL - 54

2.3. Методы культивирования клеточных культур

2.3.1. Культивирование первичных культур клеток гиппокампа

После извлечения головного мозга у эмбрионов хирургически выделены гиппокампы. Диссоциирование нервных клеток достигалось путем обработки механически измельченной ткани гиппокампа 0,25% раствором трипсина (ThermoFisher, США). В качестве питательной среды использовалась нейробазальная среда Neurobasalmedium (ThermoFisher, США) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина и питательной добавки B27 (ThermoFisher, США). Культивирование осуществлялось по ранее разработанному протоколу в течение 28 дней *in vitro* (DIV). Для исследования спонтанной биоэлектрической активности клетки высаживали на мультиэлектродные матрицы систем MEA60 (Multichannel Systems, Германия), для исследования кальциевой активности, оценки жизнеспособности и ПЦР-анализа посадка культур проводилась на 6-луночные и 24-луночные планшеты (TPP, Швейцария), для иммуноцитохимических исследований посадка культур проводилась на

покровные стекла размером 18x18 мм (Vedunova et al., 2015; Ведунова с соавт., 2016).

Исходная плотность клеток гиппокампа в культуре составляла 7000-9000 кл./см². Жизнеспособность культур поддерживалась в условиях CO₂-инкубатора Shellab (Sheldon Manufacturing, США). Основные этапы формирования культур и клеточная морфология оценивались с помощью широкопольной световой микроскопии с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа DMIL HC (Leica, Германия).

2.3.2. Культивирование первичных культур клеток гиппокампа, полученных от мышей 5xFAD

Использование трансгенных животных играет важную роль в исследованиях, направленных на разработку новых терапевтических стратегий в лечении болезни Альцгеймера. Для линии 5xFAD характерно наличие 5ти мутаций в трансгенах APP и PSEN1: APP KM670/671NL (шведский), APP I716V (Флорида), APP V717I (Лондон), PSEN1 M146L, PSEN1 L286V; для таких животных характерно быстрое развитие амилоидоза. Однако при получении культур от животных линии 5xFAD необходимо учитывать, что их разведении используются схемы обратного скрещивания с нетрансгенными животными (линий C57Bl/6 либо гибридов C57BL/6 и SJL), поскольку гомозиготные по трансгенам особи нежизнеспособны (<https://www.jax.org/strain/006554>). В связи с этим в потомстве наблюдается расщепление и присутствуют мышата дикого типа. Поэтому протокол посадки первичных культур был модифицирован с целью верификации генотипа эмбрионов. Для идентификации мутантных эмбрионов и эмбрионов дикого типа проводилось генотипирование с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-PCR), занимающее значительное количество времени (3 часа). Важной задачей являлось поддержание жизнеспособности образца до завершения всех манипуляций. Выделенные гиппокампы помещались в теплую нейробазальную среду (Neurobasal Medium, ThermoFisher) и далее в

термошейкер на необходимое время при температуре 37 °С и скорости перемешивания 750 г/м. Данная процедура позволяет обеспечить объект всеми условиями для поддержания жизнеспособности на время выполнения генотипирования (рис. 24).

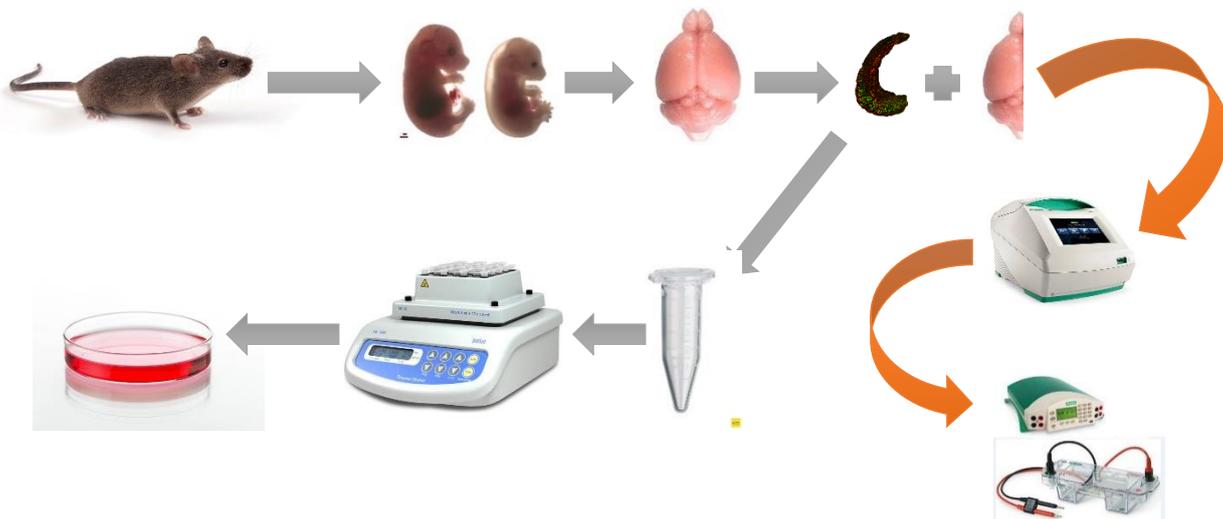


Рисунок 24. Схема посадки диссоциированных культур клеток гиппокама мыши линии 5xFAD

При проведении генотипирования определялось наличие трансгенов, несущих мутации в генах PSEN1 и APP. Для проведения ПЦР в реальном времени готовится реакционная смесь, в состав которой входят: вода, буферный раствор, праймеры, смесь 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (dATP, aTTP, dGTP, dCTP), называемая dNTP, термостабильная ДНК-полимераза и образец ДНК-матрицы.

Были использованы следующие праймеры:

PSEN1-1644 – AATAGAGAACGGCAGGAGCA

PSEN1-1645 – GCCATGAGGGCACTAATCAT

PSEN1/APP/control-7338 – CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT

PSEN1/APP/control-7339 – GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC

APP-3610 – AGGACTGACCACTCGACCAG

APP-3611 – CGGGGGTCTAGTTCTGCAT

Условия ПЦР: 95°C в течение 3 мин, 35 циклов 95°C в течение 30 с, 64°C в течение 1 мин, 72°C в течение 1 мин и 72°C в течение 2 мин на термоциклере C1000 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California).

Результат ПЦР определяли по электрофореграмме после электрофореза в агарозном геле. Культуры, входящие в группу «5xFAD», получали из коры головного мозга эмбрионов, в тканях которых было подтверждено наличие трансгенов. Культуры дикого типа, входящие в группу «Контроль», получали из коры головного мозга эмбрионов, в тканях которых ПЦР не подтвердила наличие трансгенов (Mitroshina et al., 2020).

2.4. Оценка жизнеспособности клеток в диссоциированных культурах

С целью идентификации ядер мертвых клеток и общего количества клеточных ядер в культурах клеток использовались флуоресцентные красители пропидий йодид (Sigma, Germany), который окрашивает ядра только мертвых клеток и бис-бензимида (Sigma, Germany), окрашивающий ядра как живых, так и погибших клеток. Пропидий йодид и бисбензимида в концентрациях 5 мкг / мл и 1 мкг / мл, соответственно, добавляли в культуральную среду за 30 мин до регистрации жизнеспособности. Визуализация окрашенных клеточных ядер проводилась с помощью инвертированного микроскопа Leica DMIL HC (Leica, Германия). Доля мертвых клеток была рассчитана как соотношение ядер, окрашенных пропидий йодидом к общему количеству ядер, маркированных бис-бензимида (Vedunova et al., 2015; Shishkina et al., 2018)

2.5. Исследование спонтанной биоэлектрической активности первичных культур клеток гиппокампа

2.5.1. Регистрация спонтанной биоэлектрической активности первичных культур клеток гиппокампа

Спонтанную биоэлектрическую активность нейронов регистрировали с помощью мультиэлектродной системы MEA60 (Multichannel Systems,

Германия) для регистрации внеклеточных потенциалов. Матрицы, на которых культивировались нервные клетки, состоят из 60 планарных круглых электродов диаметром 30 мкм, расстояние между электродами - 200 мкм. Электроды выполнены из нитрида титана, изолирующее покрытие состоит из нитрида кремния (рис. 25).

Регистрация и анализ сигналов осуществлялись в соответствии с методикой, описанной в (Mishchenko et al., 2019) Данные записывались одновременно с 59 каналов с частотой дискретизации 20 кГц/канал. Для получения и анализа данных использовался набор программного MC Rack™, а также оригинальный пакет алгоритмов Meaman (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2012611190), реализованный в программной среде Matlab™.

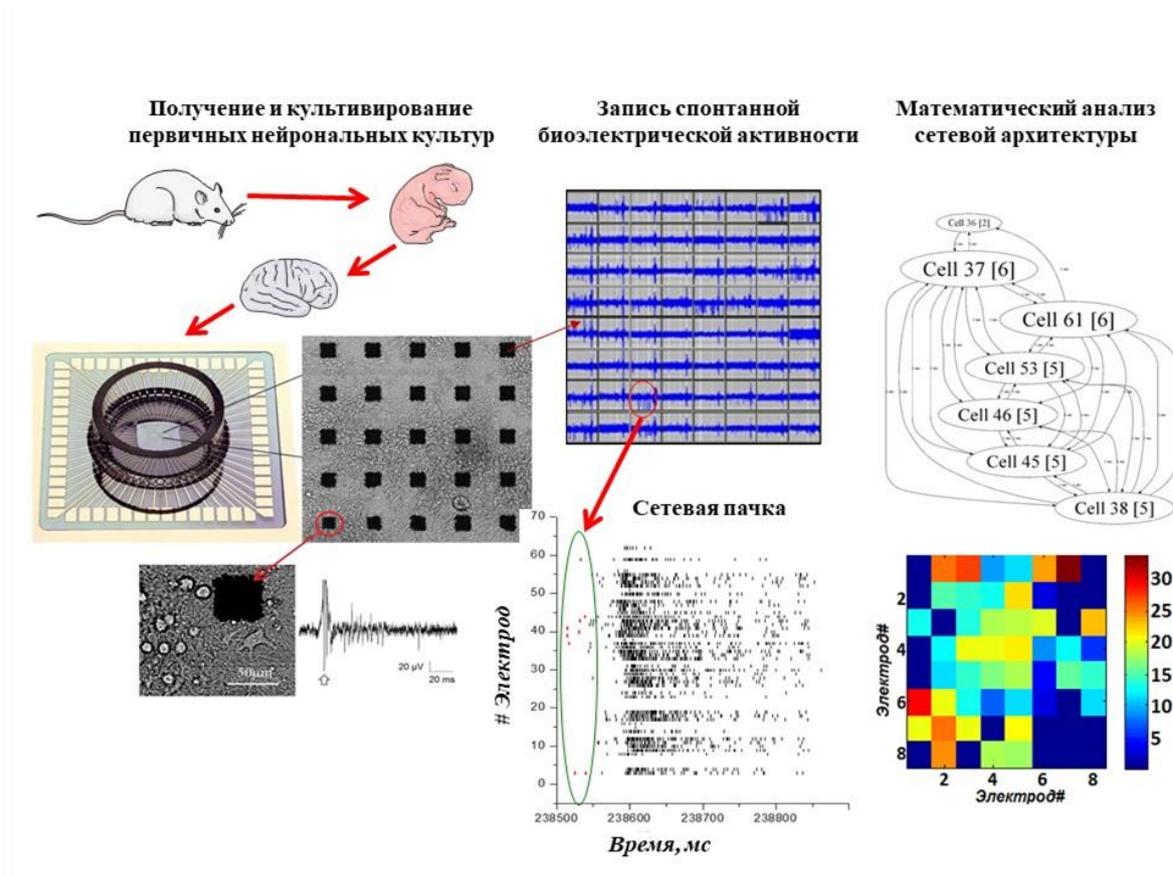


Рисунок 25. Схема регистрации спонтанной биоэлектрической активности первичных культур клеток головного мозга с помощью мультиэлектродных матриц

2.5.2. Детекция спайков и малых сетевых пачек

Зарегистрированные внеклеточные потенциалы действия (спайки) определялись пороговым методом путем вычисления медианы сигнала по следующей формуле:

$$T = N_s \sigma, \sigma = \text{median} \quad (1)$$

где x - сигнал данных, пропущенный через полосовой фильтр (0,3–8 кГц), σ - оценка стандартного отклонения сигнала без спайков, N_s - коэффициент обнаружения спайка, определяющий порог детектирования. Оценка порога на основе медианы сигнала по формуле (1) менее зависима от частоты спайков, чем оценка порога на основе стандартного отклонения. Коэффициент 0,6475 в формуле (1) введен для нормализации медианы абсолютного сигнала к стандартному отклонению. $N_s=4$ использовался для всех данных, позволяя детектировать спайки с амплитудой свыше 20 мкВ. Минимальный межспайковый интервал был установлен на уровне 1 мс. Обнаруженные спайки отображались при помощи растровой диаграммы (Quiroga et al., 2004; Pimashkin et al., 2011).

Малые сетевые пачки детектировались путем расчета общей численности спайков (TSR), которая учитывала общее количество спайков со всех электродов в пределах 50-мс временных окон. Критерием малой сетевой пачки служило наличие спайков на четырех и более электродах с межспайковым интервалом не более 50 мс (Vedunova et al., 2013; Gladkov et al., 2018). Были оценены следующие параметры: количество малых сетевых пачек; количество спайков в малой сетевой пачке, количество больших сетевых пачек

2.5.3. Метод кросс-корреляционного анализа и сетевых графов

Для анализа и визуализации функциональной архитектуры нейронных сетей применялся метод построения сетевого графа. Степень синхронизации всех возможных пар электродов с учётом синаптических задержек

оценивалась с помощью 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 δ , центры которых удалены на время задержки τ , пропорциональное расстоянию между электродами. Использовалась нормировка на число принятых импульсов постсинаптическим нейроном – n_j . Таким образом, формула для вычисления матрицы кросс-корреляции выглядит так:

$$C_{ij} = \frac{n_{\text{synchron}}}{n_j} \quad (2)$$

C_{ij} – коэффициент синхронизации сети, n_{synchron} – число синхронных импульсов, попавших на каналы, n_j – 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 передается на другой за индивидуальное для каждой пары время синаптической задержки $\tau \pm \delta/2$ (Shishkina et al., 2018; Mishchenko et al., 2019).

2.6. Исследование спонтанной кальциевой активности первичных культур нервных клеток

2.6.1. Функциональный кальциевый имиджинг

Для имиджинговых исследований функциональной кальциевой активности нервных клеток использовались LSM 800 (Zeiss, Германия), объектив W Plan-Apochromat 20×/1.0. Методика позволяла визуализировать функциональную архитектуру нейрональной сети культуры на клеточном уровне. В качестве кальциевого сенсора был использован Oregon Green 488

ВАРТА-1 АМ (ОГВ-1) 0.4 μM , (Invitrogen, США). Проводили регистрацию временной серии изображений для оценки динамики измерения концентрации внутриклеточного кальция. Разрешение полученного изображения составляло 512x512 пикселей, размер поля зрения 420x420 мкм, частота регистрации изображений 2 Hz (Vedunova et al., 2016; Мищенко et al., 2018).

2.6.2. Анализ сетевых характеристик кальциевой динамики в культурах клеток

Для детального анализа паттерна кальциевой активности был использован оригинальный алгоритм анализа данных кальциевой активности клеточных культур. Для выделения кальциевых событий был использован алгоритм, описанный в (Kustikova et al., 2018) и дополненный и реализованный в оригинальной программе Astrolab (Mitroshina et al., 2020a., свидетельство о регистрации программы ЭВМ № 2021612870 от 25.02.2021). Общая схема алгоритма состоит из нескольких 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 события, как пространственно-временные связные области с значимой активностью. Для анализа кальциевых событий в отдельных клетках сети используется сегментация изображения с помощью алгоритма watershed. Исходные найденные события разделяются по областям отдельных клеток. Учитывались следующие параметры 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-астроцитарной сети

Простая динамическая нейрон-астроцитарная сеть представляется в виде неориентированного графа $G = (V, E)$, множество вершин V которого соответствует множеству клеток, множество ребер E – наличию корреляций между клетками:

$$V = \overline{1, n}, E = \{(i, j): i, j \in V, \rho_{ij} > \rho_{thr}\}, \quad (3)$$

где ρ_{ij} – коэффициент корреляции Пирсона между парами клеток $i, j \in V$:

$$\rho_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^n \tilde{x}_k^i \cdot \tilde{x}_k^j}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (\tilde{x}_k^i)^2 \cdot \sum_{i=1}^n (\tilde{x}_k^j)^2}}, \quad (4)$$

$$\tilde{x}_k^i = x_k^i - \langle x_s^i \rangle_{k-w, k} \quad (5)$$

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

\tilde{x}_k^i – характеристика за вычетом скользящего среднего с окном w .

Отдельная клетка характеризуется динамическими изменениями концентрации внутриклеточного кальция C_k^i , а также динамикой размера события в клетке A_k^i – количество активных пикселей. На основе этих двух характеристик вычисляется коэффициент корреляции. Для каждой пары клеток вычисляется корреляционная функция между двумя характеристиками клеток, из которых вычитается скользящее среднее.

Такой подход не учитывает возможную задержку кальциевых событий между клетками. Принимая во внимание эту особенность, определим в качестве динамической нейрон-астроцитарной сети ориентированный граф с тем же множеством вершин и рёбер, построенном на максимальном значении уровня корреляции при различных возможных сдвигах сигналов в диапазоне 10 кадров (w). Направленность связи определяется как направление временного сдвига в точке максимума.

$$V = \overline{1, n}, E = \{(i, j): i, j \in V, \check{\rho}_{ij} > \rho_{thr}, \tau_{ij} > 1\} \quad (6)$$

$$\rho_{ij}(\tau) = \frac{\sum_{k=\max(-s, 1)}^{n-\max(s, 0)} \tilde{x}_k^i \cdot \tilde{x}_{k+\tau}^j}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (\tilde{x}_k^i)^2 \cdot \sum_{i=1}^n (\tilde{x}_k^j)^2}}, \quad (7)$$

$$\check{\rho}_{ij} = \max_{-W \leq \tau \leq W} \rho_{ij}(\tau), \quad (8)$$

$$\tau_{ij} = \operatorname{argmax}_{-W \leq \tau \leq W} \rho_{ij}(\tau). \quad (9)$$

где $\rho_{ij}(\tau)$ – коэффициент корреляции между сигналами со сдвигом τ ,

$\check{\rho}_{ij}$ – максимальный коэффициент корреляции при различных сдвигах в диапазоне $[-W; W]$,

τ_{ij} – сдвиг сигналов при максимальном уровне корреляции.

Поскольку непосредственное взаимодействие между клетками локально, взаимное влияние должно спадать с расстоянием. Исходя из этого, можно определить уровень значимых динамических корреляций, взяв в качестве порога ρ_{thr} верхнюю границу корреляций между далекими клетками, то есть теми, расстояние между которыми существенно больше характерных размеров клетки (до 40 мкм). В качестве верхней оценки для этого расстояния мы используем 100 мкм. Корреляционная сеть строится следующим образом: клеткам ставятся в соответствие вершины графа, а наличие значимого уровня корреляции между парами клеток (корреляция больше 0.3) обозначается ребром, соединяющим соответствующие вершины.

Для проведения сетевого анализа рассмотрены несколько характеристик получаемых сетей:

1. количество функциональных связей между парами клеток

$$N_c = |E|; \quad (10)$$

2. среднее количество связей одной клетки

$$N_n = \langle |\{j: j \in V, (i, j) \in E\}| \rangle_i; \quad (11)$$

3. средняя скорость распространения задержки между сигналами

$$S = \left\langle \frac{d_{ij}}{\tau_{ij}} \right\rangle_{ij} \quad (12)$$

где d_{ij} – расстояние между центрами i -ой и j -ой клеток, τ_{ij} – задержка сигнала;

4. средний уровень корреляции сети

$$P = \langle \rho_{ij} \rangle_{ij}; \quad (13)$$

5. средний уровень корреляции соседних клеток

$$P_a = \langle \rho_{ij} \rangle_{ij}, (i, j) \in E_p, \quad (14)$$

где E_p – множество пар соседних по пространству клеток;

6. нижняя средняя частота сигнала клеток $\langle \omega_l^i \rangle_i$:

$$\frac{\int_{\omega_l}^{\omega_h} |F[\tilde{x}(t)]_\omega| d\omega}{\int_{-\infty}^{+\infty} |F[\tilde{x}(t)]_\omega| d\omega} > 0.85, \quad (15)$$

где F – символ преобразования Фурье.

Частоты диапазона, вносящего основной вклад, выбираются из условия превышения значения интеграла мощности спектральной плотности величины в 85% и принципа симметрии диапазона.

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. 26В) и связь расстояния между клетками с уровнем корреляции (рис. 26Г).

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., 2020a).

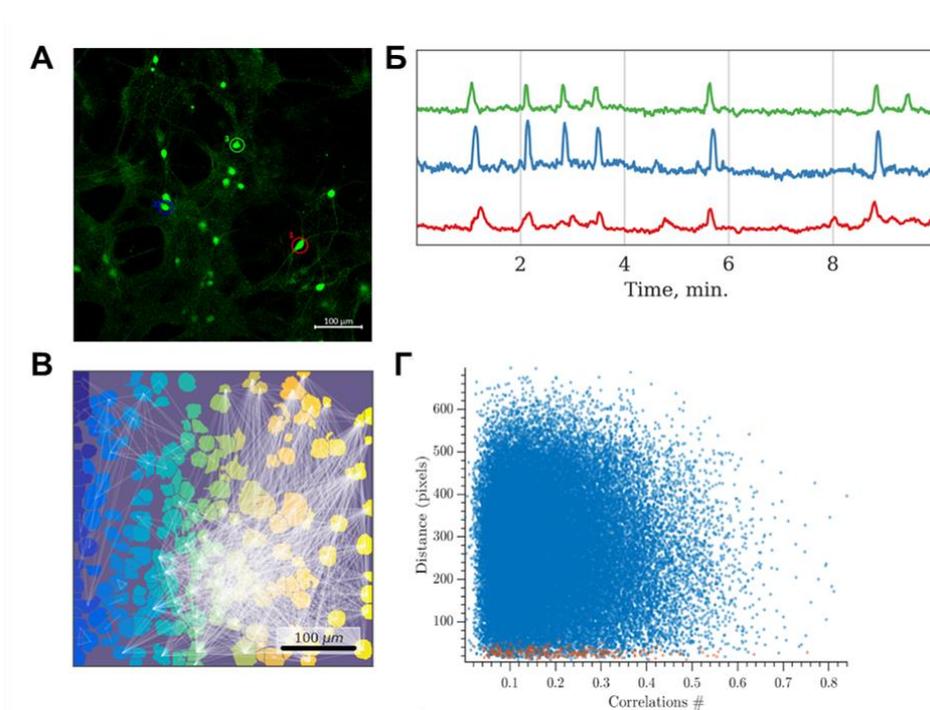


Рисунок 26. Пример визуализации результатов обработки кальциевой активности нейрон-астроцитарной сети: А – изображение первичной культуры гиппокампа, окрашенной кальциевым сенсором Oregon Green; Б - интенсивности кальциевой активности для трех выбранных клеток; В – ориентированный граф (цвет клеток выбран 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

2.7. 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 β -амилоида применялись первичные куриные антитела к β -амилоиду (Abcam,

Великобритания) и вторичные антитела к антителам курицы, конъюгированные с желтой флуоресцентной меткой (anti-chicken-Alexa 555) (Invitrogen, USA). Для маркирования нейронов использовались антитела морской свинки к β III-тубулину (Abcam, Великобритания) и вторичные антитела к антителам морской свинки с конъюгированные с красной флуоресцентной меткой Alexa 647 (Invitrogen, США). Для маркирования астроцитов применялись мышьиные либо куриные антитела к глияльному фибриллярному кисломому белку GFAP (Abcam, Великобритания). Для маркирования микроглии использовались куриные антитела к Iba1 (SySy, США). Для маркирования нейротрофического фактора головного мозга BDNF использовались первичные поликлональные куриные антитела к BDNF (Abcam, США) и вторичные поликлональные антитела, конъюгированные с красной флуоресцентной меткой Alexa Fluor 647 (Invitrogen, США). Полный список антител представлен в приложении 1. Визуализация препаратов проводилась с использованием флуоресцентного конфокального микроскопа Zeiss 800 (Carl Zeiss, Германия). Полученные изображения были проанализированы с использованием пользовательского плагина ImageJ (Митрошина с соавт., 2018; Mitroshina et al., 2018b, 2020c).

2.8. 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 (pH=7,4) и 1% раствором четырехокси осмия. Материал обезвоживали в спиртах восходящей концентрации. Обработанную ткань заключали в смесь ЭПОН-АРАЛДИТ (Саркисов, 1996). Ультратонкие срезы, приготовленные с использованием ультрамикротомы 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 (компания FEI, США) (Shishkina et al., 2018; Mitroshina et al., 2019).

2.9. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для анализа уровней экспрессии нейротрофических факторов BDNF и GDNF, их рецепторов TrkB и GFR α (ген Gfra1), а также экспрессии HIF-1 α (Hif1) и киназы IkkB использовали количественную ПЦР 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 мышиноного 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'-CCCAACGAAGAAAACCATTAAGGA-3'
BDNF_rv 5'-CCAGCAGAAAGAGTAGAGGAGGCT-3'
TrkB_fw 5'-TTTCCGCCACCTTGACTTGTCT-3'
TrkB_rv 5'-GTCGGGGCTGGATTTAGTCTCC-3'
GDNF_fw 5'-CCTTCGCGCTGACCAGTGACT-3',
GDNF_rv 5'-GCCGCTTGTTTATCTGGTGACC-3'
GFR α 1_fw 5'-TGTCTTTCTGATAATGATTACGGA-3'
GFR α 1_rv 5'-CTACGATGTTTCTGCCAATGATA-3'
Hif1 α _fw 5'-GCAATTCTCCAAGCCCTCCAAG-3'
Hif1 α _rv 5'-TTCATCAGTGGTGGCAGTTGTG-3'
Ikkb_fw 5'-AACCAGAATCCAGGAAGACACG-3'
Ikkb_rv 5'-TCGTTTGTCTTGCTGTCTGAGATG-3'

Протокол амплификации: 50°C - 2 мин, 95°C - 10 мин, циклическая часть (40 циклов) 95°C - 15 сек, 60°C - 60 сек на амплификаторе QuantStudio 5

thermocycler (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) с использованием реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген).

Обработка данных проводилась с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ и контрольного образца, в котором уровень целевого гена был принят за единицу. Нормализация была выполнена относительно контрольного гена (*Oaz1*) (Mishchenko et al., 2019; Mitroshina et al., 2019).

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

Для получения генноинженерного вирусного конструктора, кодирующего ген BDNF, были использованы плаزمиды AAV-Syn-EGFP и хелперные плазмиды pDP5, DJvector и pHelper. Вирусный вектор 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) -повторами из AAV серотипа 2, а также несущая последовательность ампицилиновой кассеты, необходимой для положительного отбора колоний, несущих данную плазмиду (*AmpR* промотор и *AmpR* ген) и (7) последовательность, соответствующую нуклеотидной последовательности, кодирующей функциональный белок BDNF (Митрошина с соавт., 2018).

Были использованы разработанные нами праймеры mBDNF-EcoRI-fw и (5'-ATTGAATTCATGGGCCACATGCTGTCC-3') и mBDNF-BamHI-rv (5'-AATGGATCCAATCTTCCCCTTTTAATGGTCAGTG-3') (Mitroshina et al., 2018).

Инфицирование культур осуществлялось на 7 DIV. 3 мкл вирусного препарата смешивалось с 50 мкл культуральной среды. Из культуральных чашек временно убиралась кондиционированная среда и аккуратно добавлялся рабочий раствор вирусного препарата. Культуры инкубировались 20 минут

при 35.5 °C и 5% CO₂. После этого в культуры возвращалась кондиционированная среда (Mitroshina et al., 2018b, 2018a).

2.11. Моделирование повреждающих факторов in vitro

2.11.1 Моделирование нормобарической гипоксии in vitro

Моделирование изолированных повреждающих факторов ишемии и комплекса ишемия-подобных условий выполнялось на 14 DIV. Моделирование острой нормобарической гипоксии in vitro проводилось с помощью замены нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода на 10 минут. Для вытеснения кислорода культуральная среда насыщалась аргоном в течение 20 минут. Это приводило к десятикратному снижению концентрации растворенного кислорода с 4,66 мг/л (3,26 мл/л) до 0,53 мг/л (0,37 мл/л), что определялось методом йодометрического титрования. Эксперимент выполнялся в герметичной камере, в которой воздух также был замещен на аргон (Vedunova et al., 2015).

2.11.2. Моделирование глюкозной депривации 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 по запросу компанией ПанЭко, Россия) на 1 час. Затем проводилась обратная замена на кондиционную культуральную среду (Митрошина с соавт., 2019; Mitroshina et al., 2020b).

2.11.3. Моделирование окислительного стресса (ОС) in vitro

Окислительный стресс (ОС) моделировался путем аппликации в культуральную среду фермента глюкозооксидазы (5 нг/мл) (Sigma, Германия). Глюкозооксидаза катализирует реакцию дегидрирования глюкозы и перенос отнятого водорода на кислород воздуха с образованием перекиси водорода,

при этом глюкоза окисляется до глюконолактона (Мищенко Т.А. et al., 2018; Митрошина с соавт., 2019).

2.11.4. Моделирование ишемия-подобных условий *in vitro*

Моделирование комплекса ишемия-подобных условий осуществлялось путем комбинированного воздействия всех повреждающих факторов на первичные культуры гиппокампа в течение 10 минут. Насыщению аргоном подвергалась культуральная среда, лишенная энергетических субстратов, после чего в нее добавлялась глюкозооксидаза (5нг/мл). При моделировании ишемия-подобных условий использование глюкозооксидазы в среде, не содержащей глюкозы, оправдано, поскольку даже при полной замене культуральной среды на среду без энергетических субстратов, в межклеточном пространстве сохраняется 0,56 – 0,76 моль/л глюкозы, что достаточно для активности фермента в течение нескольких часов (Митрошина с соавт., 2019).

2.11.5. Моделирование β -амилоидопатии *in vitro*

Были применены два протокола фармакологическое моделирование β -амилоидоза *in vitro*. Первый протокол предполагает острое однократное введение А β (1-42) в культуральную среду на 10 день культивирования (DIV), с конечной концентрацией раствора 3,5 мкМ.

Второй протокол заключается в хроническом внесении β А в культуральную среду начиная с 10 DIV, с конечной концентрацией раствора 3,5 мкМ. Внесение пептида производится каждые два дня, после смены культуральной среды (Mitroshina et al., 2020c).

Подготовка β -амилоида, обработанного HFIP

АВ1-42 синтетический пептид (H-1368, Bachem, Bubendorf, Switzerland) растворяют в 100% 1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol (HFIP) в концентрации 6 мг/мл и инкубируют в течение 1,5 ч до полного растворения при 37 ° С при перемешивании. После полного растворения раствор А β -HFIP

инкубируется при комнатной температуре не менее 30 минут. Далее пробирку с амилоидом оставляют открытой в вытяжном шкафу в течение ночи для испарения HFIP. Хранить высушенные пептидные пленки над осушителем в стеклянных банках при температуре -20°C .

Приготовление фибриллярного A β

В пробирке с подготовленной амилоидной пленкой размешивают 5 mM свежего A β 42 в DMSO при комнатной температуре. Для разведения A β до 100 μM , добавить 10 mM HCl при комнатной температуре. Перемешивать с помощью вортекса в течение 15 с, перенести в термостат при 37°C и инкубировать в течение 24 ч.

2.12. Режим аппликации нейротрофических факторов и ингибиторов внутриклеточных киназ

При моделировании повреждающих факторов ишемического повреждения и ишемия-подобных условий нейротрофические факторы BDNF (1 нг / мл, Millipore, США), GDNF (1 нг / мл, Millipore, США), а также ингибиторы внутриклеточных киназ (1 мкМ) добавляли в культуральную среду за 20 минут до моделирования стресс-фактора, при моделировании стресс-фактора и при обратной замене среды. В работе были использованы оригинальные ингибиторы киназ, любезно предоставленные проф. Тарабыкиным В.С. (Университет Charite, Германия) и д. м. н. Римой Аль-Авар (Ontario Institute for Cancer Research, Канада). Список используемых блокаторов представлен в приложении 2.

Ингибитор HIF-пролил гидроксилазы Neuroadapt, химическая формула которого представлена на рис. 27 был любезно предоставлен к.х.н. А.В. Полозниковым. Для исследований его цитотоксичности проводилась однократная аппликация соединения в концентрациях 0,5,1,5,10,15,20 и 30 μM . При моделировании гипоксии были использованы концентрации 0,5,1,5,10,15 и 20 μM , аппликация которых в культуральную среду проводилась по двум протокола – согласно первому за 20 минут до моделирования стресс-фактора, при моделировании стресс-фактора и при

обратной замене среды, согласно второму – через два часа после моделирования гипоксии и далее ежедневно на протяжении 7 суток.

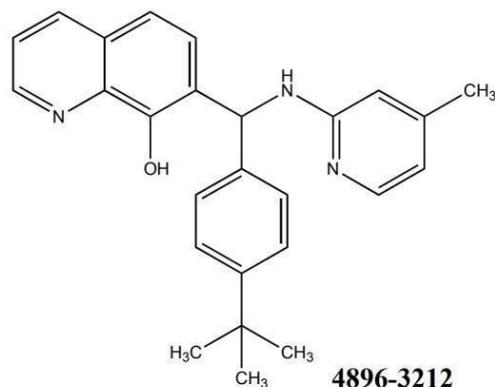


Рисунок 27. Химическая формула ингибитора NIF PHD 4896-3212 (Нейроадапт)

2.13. Методы статистической обработки результатов

Полученные данные были проверены на нормальность распределения с применением критерия Шапиро-Уилка. В случае, если данные подчинялись нормальному распределению, они представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($m \pm SEM$). Данные, распределение которых отличается от нормального, представлены как «M [Q1; Q3]», где M – медиана, Q1 – первый квартиль (квантиль 0,25) и Q3 – третий квартиль (квантиль 0,75) групповых выборок. Достоверность статистических различий между выборками, имеющих нормальное распределение, оценивалась с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с post-hoc критерием Бонферрони для множественных сравнений. При повторных измерениях применялся метод repeat-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 $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Молекулярно-клеточные механизмы, лежащие в основе эффектов, оказываемых нейротрофическими факторами BDNF и GDNF на адаптацию нервных клеток к действию повреждающих факторов

3.1.1. Воздействие нейротрофических факторов BDNF и GDNF на жизнеспособность нервных клеток первичных культур гиппокампа при моделировании факторов ишемии и ишемия-подобных условий *in vitro*

На первом этапе исследования нами была проведена оценка роли нейротрофических факторов в активации адаптационных процессов в нервных клетках и оценка 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 – хронический окислительный стресс, дефицит кислорода и энергетических субстратов. Оценивалась динамика жизнеспособности клеток первичных культур гиппокампа в течение 7 суток после моделирования ишемия-подобных условий, а также каждого фактора ишемии в отдельности на фоне аппликации рекомбинантных белков BDNF, GDNF и их совместного применения (табл. 3).

Исследование роли каждого из патогенетических звеньев ишемии в отдельности позволяет глубже понять молекулярные механизмы и метаболические каскады, развивающихся в влиянии стресс-факторов и роль эндогенных регуляторных систем головного мозга в адаптации к их воздействию. Основными повреждающими факторами ишемии являются дефицит кислорода и глюкозное голодание (Мищенко с соавт., 2018). Кроме того, в дальнейшем развивается окислительный стресс в результате усиления свободнорадикального перекисного окисления липидов. Известно, что окислительного стресса происходит не только при ишемическом повреждении, усиление продукции АФК отмечается при различных

патологических состояний, например при сосудистых патологиях, нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, при развитии злокачественных новообразований (Chiang et al., 2018; Lorigados Pedre et al., 2018).

Таблица 3.

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

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#
Гипоксия+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*#
ОС	12,95±1,18*	38,39±2,09*	54,26±5,61*
ОС + BDNF	8,42±2,25#	16,29±4,46*#	18,54±5,73*#
ОС + GDNF	4,56±1,41#	5,84±0,61#	8,21±3,61#
ОС + 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*#

* - статистически достоверные отличия от группы «Интактная», # - статистически достоверные отличия от соответствующей контрольной группы

(«Гипоксия», «ГД», «ОС» или «Ишемия»), $p < 0,05$; $N=9$, ANOVA, post-hoc критерий Бонферрони (Митрошина с соавт., 2019).

Для исследования системного влияния окислительного стресса на нервные клетки *in vitro* нами был применен подход с использованием фермента глюкоксидазы и подобраны ее оптимальные концентрации (Мищенко с соавт., 2018). Распространенным методом моделирования окислительного стресса является однократная аппликация перекиси водорода непосредственно в культуральную среду. Такой подход к моделированию ОС позволяет оценить антиоксидантную емкость модельной системы, поскольку время жизни перекисей в культуральной среде как сложном многокомпонентном белковом растворе крайне короткое и такой метод приводит к локальному краткосрочному повреждению. Использование глюкоксидазы для окисления глюкозы с образованием реакционно-активных форм кислорода позволяет увеличить генерацию АФК в течение длительного времени, которое ограничено только наличием реакционного субстрата в культуральной среде. Поэтому важным преимуществом используемого нами методического подхода является то, что применение глюкозооксидазы позволяет вызвать хроническое повреждение, носящее длительный, системный характер и затрагивающее практически все клетки в культуре. Выявлено, что применение глюкоксидазы в концентрации 5 нг/мл через 24 часа достоверно ($p < 0,05$) увеличивает число мертвых клеток в первичных культурах гипшампа до $12,95 \pm 1,18\%$, в концентрации 20 нг/мл до $52,5 \pm 7,4\%$, а применение фермента в концентрации 50 нг/мл вызывает гибель $79,8 \pm 9,6\%$ через сутки после аппликации. На 7 суток после воздействия глюкоксидазы 5 нг/мл доля мертвых клеток составила $54,26 \pm 5,61\%$, при применении глюкоксидазы 50 нг/мл через 7 суток погибали все клетки в культуре. В связи с этим для дальнейших исследований была выбрана концентрация 5 нг/мл (Мищенко с соавт., 2018).

Далее была создана комплексная модель ишемия-подобных условий *in vitro*, сочетающая все три ключевых фактора ишемического повреждения – кислородную и глюкозную депривацию и хронический окислительный стресс (рис. 28) (Митрошина с соавт., 2019). Было проведено исследование жизнеспособности клеток первичных культур гиппокампа на 1, 3 и 7 день после моделирования каждого фактора ишемии в отдельности и комплекса ишемия-подобных условий на фоне аппликации BDNF, GDNF, а также их совместного применения (табл. 3).

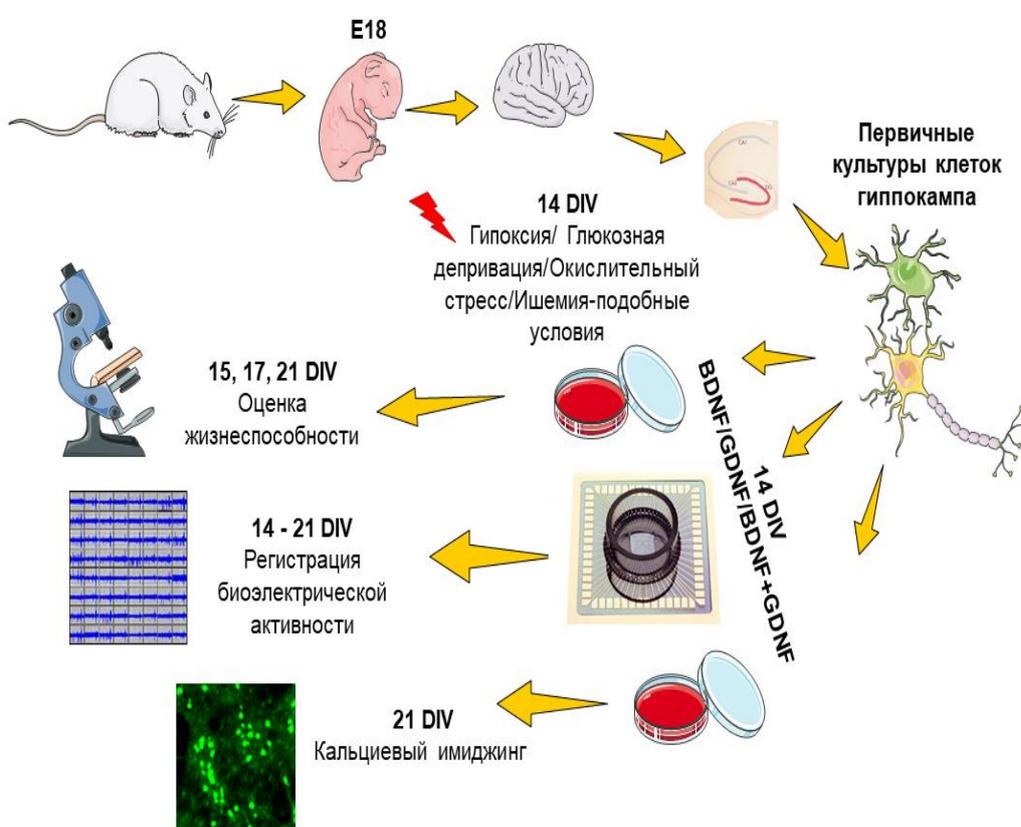


Рисунок 28. Схема экспериментов по исследованию роли нейротрофических факторов BDNF и GDNF в адаптации нейронных сетей к действию повреждающих факторов ишемии

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 (Ведунова М.В. с соавт., 2016; Митрошина с соавт., 2019). При моделировании глюкозной депривации и окислительного стресса число мертвых клеток увеличивается постепенно без выраженных критических периодов (табл. 3). 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, $p < 0,05$) более выражено, чем влияние каждого из факторов ишемии в отдельности.

Анализ морфологии культивированных клеток можно предположить, что глюкозная депривация вызывает преимущественно некротическую гибель клеток, в то время как гипоксия и окислительный стресс приводят к развитию апоптоза с образованием апоптотических телец (рис. 29).

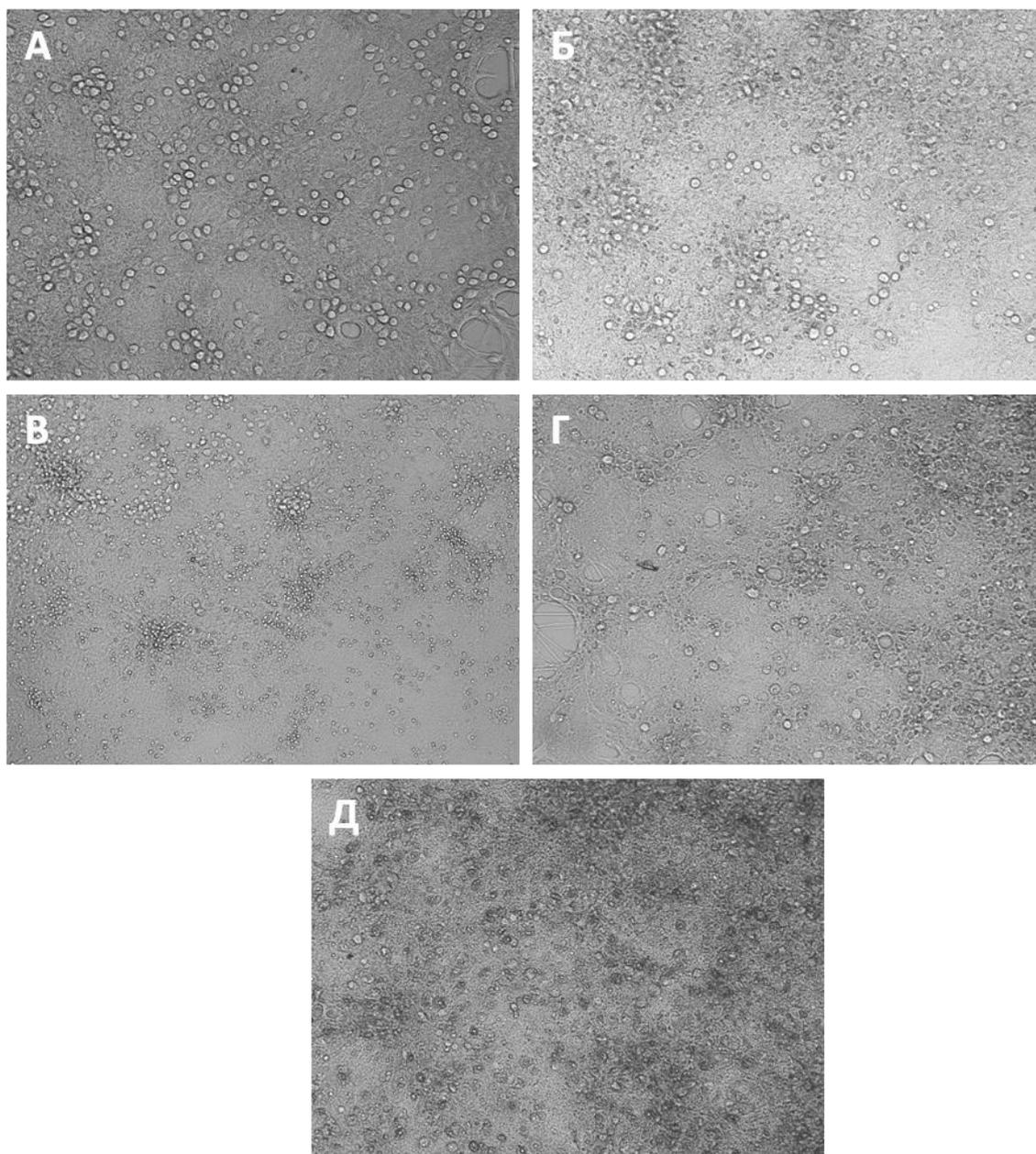


Рисунок 29. Морфологическая структура диссоциированных культур гиппокампа. А — интактная культура, Б-Д - на 7 сутки после моделирования факторов ишемии *in vitro*, Б – гипоксии, В – окислительного стресса, Г – глюкозной депривации, Д – комплекса факторов ишемии (Митрошина с соавт., 2019)

Таким образом, мы можем предположить, что разные звенья ишемического повреждения активируют различные метаболические сигнальные пути, вызывающие гибель клеток. При моделировании гипоксии и окислительного стресса наблюдается развитие сходных типов клеточной

гибели, что вероятно обусловлено запуском свободно-радикальных процессов в результате разобщения окислительного фосфорилирования при гипоксическом повреждении (Hertz, 2008). При дефиците энергетических субстратов нейроны погибают по типу некротической гибели, кроме того сам апоптоз является энергозависимым процессом и его развитие при глюкозной депривации затруднено (Hwang et al., 2018).

Анализ жизнеспособности культур клеток на фоне аппликации нейротрофических факторов показал, что применение как BDNF (1нг/мл), так и GDNF (1 нг/мл), а также их сочетания приводит к достоверному снижению числа мертвых клеток в культуре при моделировании всех изолированных факторов ишемии и моделировании ишемия-подобных условий.

Показано, что различные нейротрофические факторы отличаются по эффективности защитного действия при моделировании различных компонентов ишемического повреждения. Превентивное применение BDNF демонстрирует наиболее выраженный эффект при моделировании острой гипоксии и ишемия-подобных условий (7 день после воздействия «Интактные» $6,32 \pm 2,26\%$, «Гипоксия» $49,55 \pm 3,72\%$, «Гипоксия + BDNF» $12,98 \pm 4,8\%$, «Ишемия» $85,48 \pm 3,24\%$, «Ишемия+ BDNF» $31,77 \pm 4,24\%$ мертвых клеток). Нейропротекторный 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 $8,21 \pm 3,61\%$, 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.

3.1.2. Влияние нейротрофических факторов на ультраструктуру первичных культур гиппокампа при моделировании гипоксии *in vitro*

На следующем этапе работы нами 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 как ишемического повреждения, так и 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.

Исследование ультраструктурного строения первичных культур гиппокампа было выполнено через сутки после моделирования острой гипоксии с помощью электронной микроскопии. В норме в культурах на 15 DIV наблюдаются многочисленные зрелые химические синапсы с преобладанием аксо-дендритных и аксо-шипиковых контактов (рис. 30 А). Кристы в митохондриях хорошо визуализируются (рис. 30 Б, В). Основной пул синаптических контактов составляют везикулярные симметричные и ассиметричные аксо-шипиковые и аксо-дендритные контакты (рис. 30 А). Наблюдаются как химические синапсы с высокой осмиофильностью, типичной для хорошо развитого постсинаптического уплотнения (далее - ПСУ) (рис. 31 Б), так и множество "слабых" синаптических контактов с низко осмиофильным ПСУ. Это является характерной ультраструктурой развивающихся нейрон-глиальных сетей.

Воздействие гипоксии приводит к морфологической деструкции нейрон-глиальных сетей, визуализируется большое количество клеток с разрушенными органеллами. В частности, в some нейронах присутствовали

митохондрий с измененными кристами, количество крист в митохондриях 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. 30 Г, Д, Е). Отмечены измененные синаптические везикулы с двойной мембраной. Количество аксональных бутонов с такими везикулами в группе "Гипоксия" возросло на 23,47% (рис. 31 В). Количество зрелых синаптических контактов в группе «Гипоксия» было достоверно ниже значений интактной группы на $79,67 \pm 12,14$ % ($p < 0.05$, ANOVA) (рис. 31 А).

Интересно отметить, что из синаптических контактов сохранялись преимущественно самые "сильные" синапсы. По сравнению с интактной группой в группе «Гипоксия» доля ассиметричных синапсов с высоко-осмиофильными ПСУ увеличилось на 15,91% (рис. 31 Б). Также отмечено увеличение доли синапсов с перфорированным ПСУ ко всем ассиметричным контактам по сравнению с интактной группой (26,08%) (рис. 32 А). Поскольку эти синапсы считаются более эффективными, то такое повышение отражает включение компенсаторных механизмов клетки. Острая нормобарическая гипоксия не только снижает количество зрелых контактов. Отмечена тенденция к уменьшению площади ПСУ, что говорит о качественном изменении синаптического пула и снижении эффективности уже существующих синапсов (рис. 32 Б).

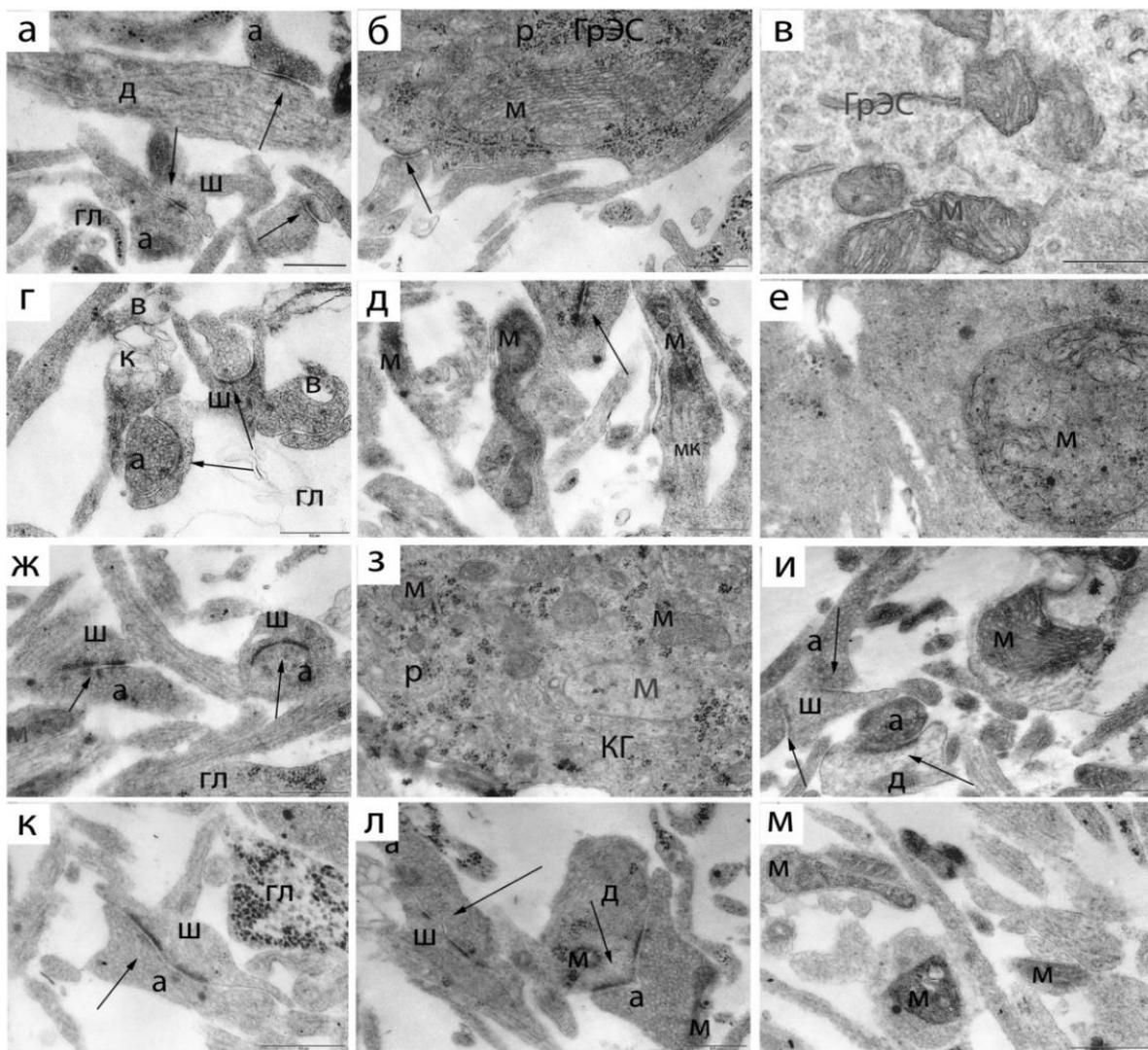


Рисунок 30. Репрезентативные электронно-микроскопические изображения первичных культур клеток гиппокампа на первые сутки после моделирования острой нормобарической гипоксии. (а-в) Интактные, (г-е) Гипоксия, (ж-и) Гипоксия+BDNF, (к-м) Гипоксия+GDNF. а) Ассиметричные везикулярные аксо-шипиковые и аксо-дендритные 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-шипииковые контакты с хорошо выраженным постсинаптическим уплотнением, з) Митохондрии в теле клетки, имеются митохондрии с измененной внутренней структурой, множество рибосом, и) Аксо-шипииковые и аксо-дендритные контакты, набухшая митохондрия в дендрите, к) Аксо-шипииковый ассиметричный перфорированный контакт, глиальный отросток с осмиофильными гранулами, л) аксо-шипииковый 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 (Shishkina et al., 2018; Mishchenko et al., 2019; Mitroshina et al., 2019)

Протяженность постсинаптического уплотнения ассиметричных синапсов статистически достоверно не отличалась от группы "Нормоксия" (рис. 32 В). Следовательно, нейрон-глиальная сеть после воздействия эпизода острой гипоксии, не только теряет часть синаптических контактов, необходимых для ее нормального функционирования, но и претерпевает изменение структуры сохранившихся синапсов. Превентивное применение нейротрофического фактора BDNF (1 нг/мл) при моделировании гипоксии способствовало сохранению ультраструктуры нервных клеток *in vitro*. Отмечено, что митохондрии в пресинапсах сохраняли нормальную морфологию, в 85% аксональных бутонов синаптические везикулы были нормальных размеров, однако встречались и измененные везикулы с двойной оболочкой (рис. 30 Ж). При этом в постсинаптических окончаниях присутствовали помимо морфологически нормальных митохондрий также митохондрии набухшей формы, в которых отмечалось малое количество крист. Важно отметить, что в группе «Гипоксия+BDNF» отсутствовали смешанные и авезикулярные контакты, присутствие которых характерно для данной стадии развития гиппокампальных культур. Наблюдались десмосомовидные и симметричные аксо-дендритные везикулярные контакты. Количество синаптических контактов в группе «Гипоксия+BDNF» было

достоверно выше, чем в группе «Гипоксия» («Гипоксия+BDNF» $45,30 \pm 6,89\%$, «Гипоксия» $20,33 \pm 6,07\%$). Помимо этого происходит уменьшение площади сечения (рис. 32 Б) и протяженности (рис. 32 В) ПСУ по сравнению с группой «Гипоксия» на 32,17% и 50,92% соответственно. Можно предположить, что большее количество сохраненных синаптических контактов возможно благодаря стабильной структуре митохондрий в аксонах и телах нейронов.

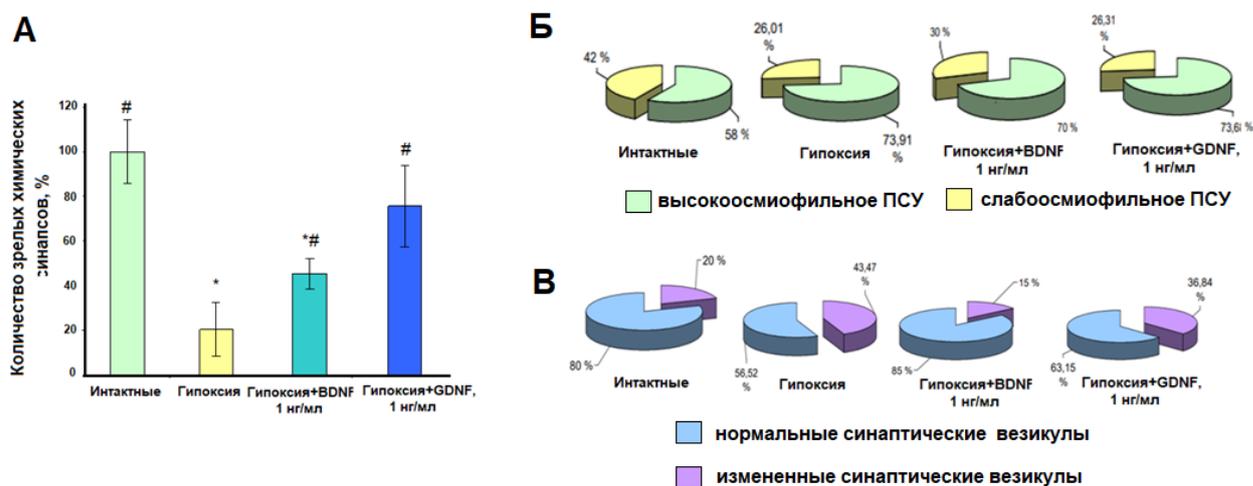


Рисунок 31. Морфометрические характеристики первичных культур гиппокампа после моделирования острой нормобарической гипоксии *in vitro*. А - количество зрелых синаптических контактов; Б - процентное соотношение зрелых синаптических контактов со слабой (желтый) и высокой (зеленый) осмиофильностью постсинаптического уплотнения, В - процентное соотношение аксональных бутонов с нормальными (голубой) и с измененными (фиолетовый) синаптическими везикулами. * — статистически значимые различия с группой «Интактные»; # — с группой «Гипоксия», N=6, ANOVA, post-hoc критерий Бонферрони, $p < 0.05$ (Shishkina et al., 2018; Mitroshina et al., 2019)

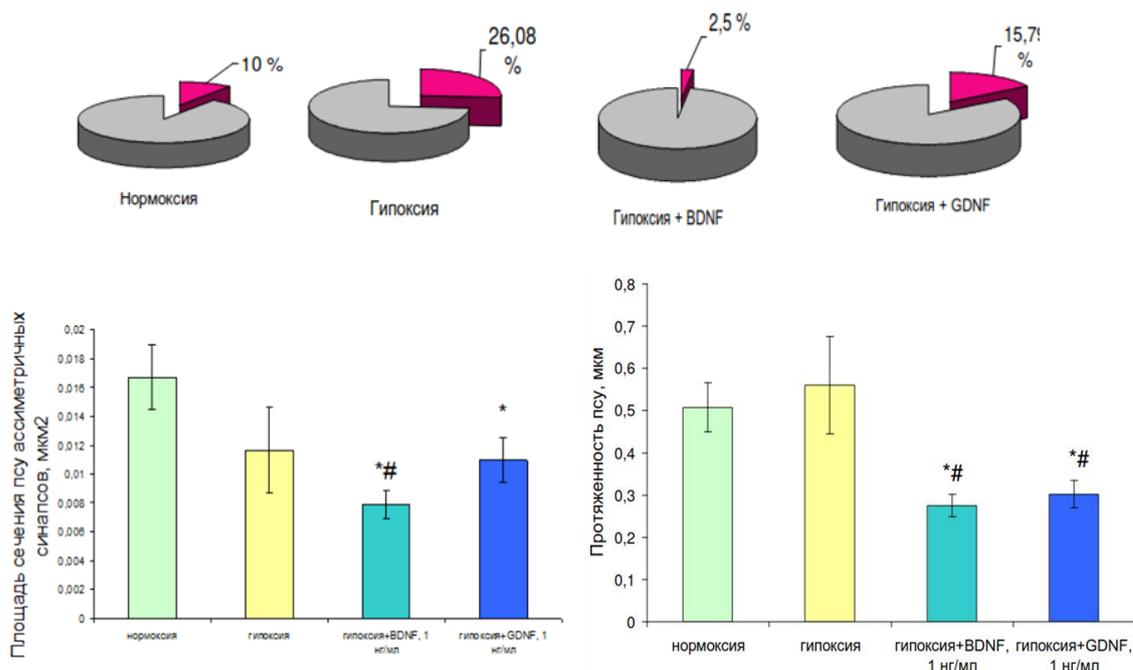


Рисунок 32. Морфометрические характеристики первичных культур гиппокампа после моделирования острой нормобарической гипоксии *in vitro*. А - Процентное соотношение количества зрелых химических синапсов с перфорированным постсинаптическим уплотнением (розовым) относительно всех зрелых контактов в различных экспериментальных группах после моделирования нормобарической гипоксии; Б - площадь сечения постсинаптического уплотнения везикулярных ассиметричных синапсов после моделирования острой нормобарической гипоксии *in vitro*., В - протяженность постсинаптического уплотнения везикулярных ассиметричных синапсов после моделирования острой нормобарической гипоксии *in vitro*. * — статистически значимые различия с группой «Интактные»; # — с группой «Гипоксия», ANOVA, post-hoc критерий Бонферрони, $p < 0.05$ (по Mitroshina et al., 2019, Mishchenko et al., 2019)

В клетках культур группы «Гипоксия+GDNF» отмечалось выраженное изменение структуры митохондриального аппарата. В большинстве случаев визуализировались деформированные или полностью разрушенные митохондрии (рис. 30 Л, М). Однако, несмотря на наблюдаемые изменения в

ультраструктуре нейронов, количество зрелых синаптических контактов было достоверно выше, чем в группе «Гипоксия» и составило $75,66 \pm 18,25\%$. Структура постсинаптического уплотнения отличалась от всех предыдущих групп. Зрелые химические контакты имели меньшую протяженность ($0,3 \pm 0,03$ мкм) по сравнению с группами "Нормоксия" и "Гипоксия", при этом такие параметры как количество синапсов с высоко осмиофильным ПСУ и его площадь сечения статистически неотличимы от групп "Гипоксия" (рис. 32)

Таким образом, 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, в случае нейротрофического фактора BDNF – сохранение ультраструктуры митохондрий и синаптических везикул, частичном сохранении количества зрелых синаптических контактов. Таким образом, нейропротекторное действие исследуемых регуляторных молекул на синаптический аппарат нервных клеток опосредовано разными клеточными механизмами.

Также нами была выполнена проверка клеточного состава первичных культур гиппокампа с помощью иммуноцитохимического окрашивания (Mitroshina et al., 2021). Показано, что нейроны и астроциты присутствуют в первичных культурах гиппокампа на 21 DIV в соотношении 1:2 (рис. 33). Гипоксия приводит к преимущественной гибели нейронов; соотношение типов клеток меняется и составляет 1:3,6 (рис. 33В). Следует также отметить фрагментацию нейрональных отростков, что свидетельствует о разрушении связей между клетками и утрате синапсов. Глюкозная депривация оказывает менее выраженное влияние на морфологию клеточных культур (рис. 33С).

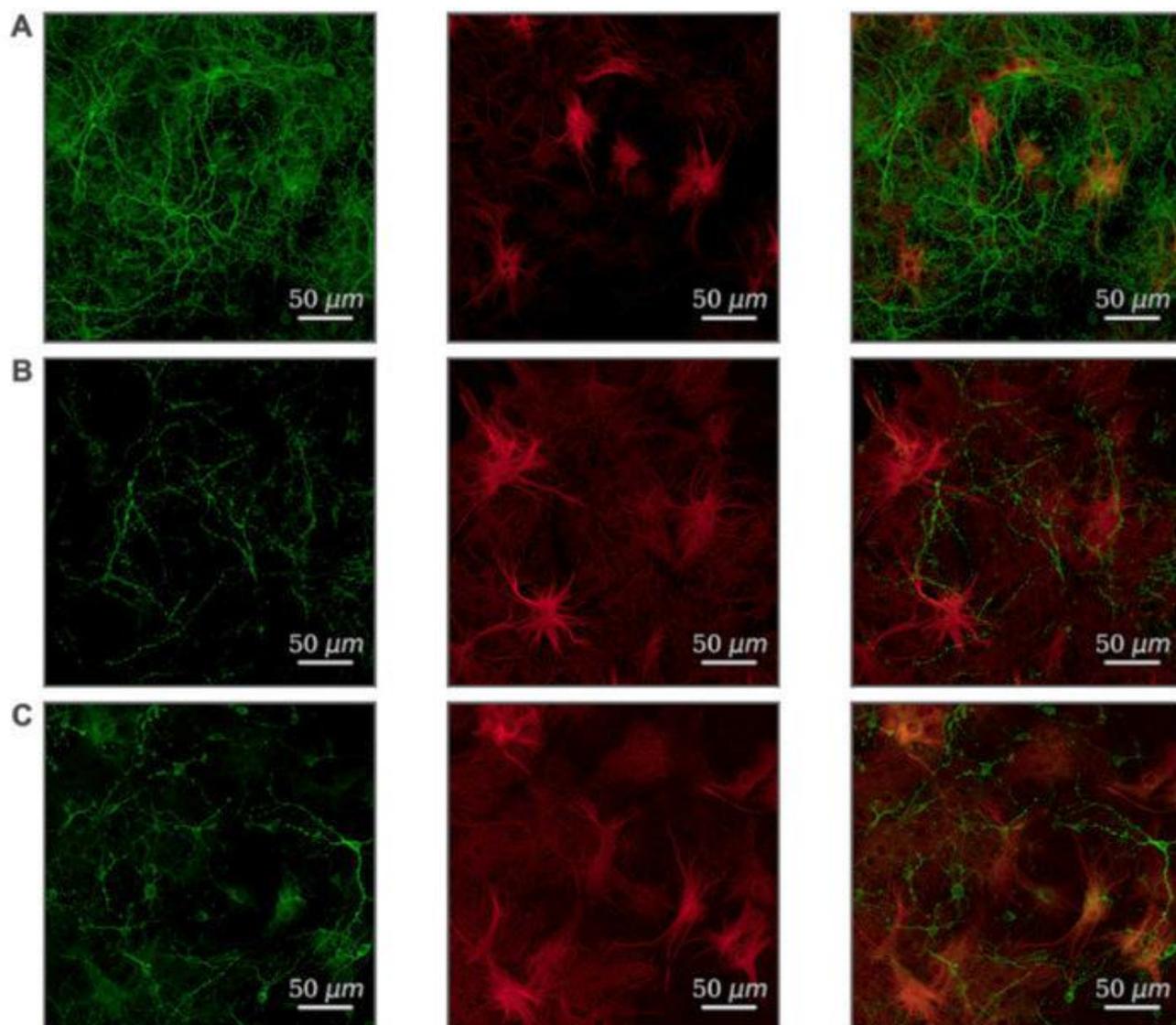


Рисунок 33. Морфология нейрон-глиальных культур на 21 день культивирования *in vitro*. Зеленый канал – нейроны, меченые первичными антителами к белку, ассоциированному с микротрубочками MAP2 и вторичными антителами AlexaFluor 488; красный – астроциты, меченные первичными антителами к глиальному фибриллярному белку GFAP и вторичными антителами AlexaFluor 647. А – интактная культура; Б – гипоксия; С – ГД. Изображения получены с помощью микроскопа Zeiss LSM 800, объектив Plan-Apochromat 20x/0.8, масштабная шкала - 50 мкм (по Mitroshina et al., 2021)

Кроме того, следует отметить, что при культивировании клеток гиппокампа не подавлялся рост микроглии. Иммуноцитохимический анализ

показывает присутствие клетки микроглии (рис. 34). Доля клеток микроглии не превышает 2-5% от общего числа клеток.

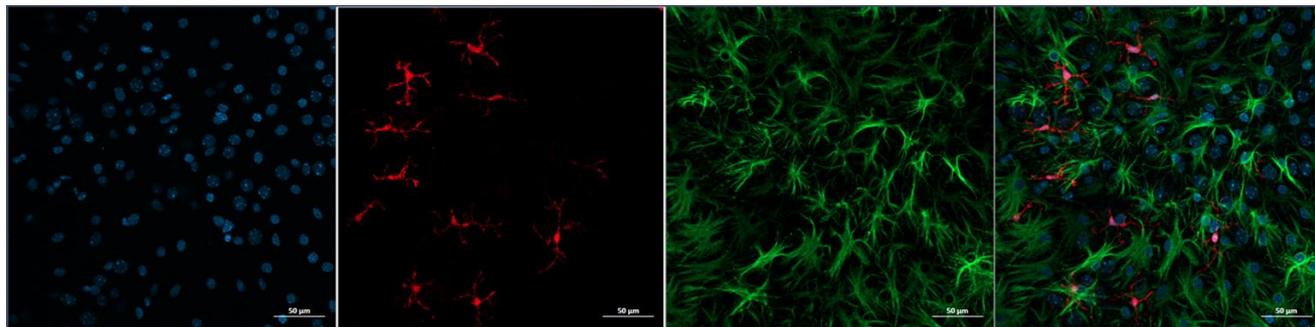


Рисунок 34. Репрезентативные конфокальные изображения иммуноцитохимического окрашивания первичной культуры клеток гиппокампа. Синий канал — DAPI, красный канал – клетки микроглии, меченые первичными антителами к Iba2 и вторичными антителами AlexaFluor 647, Зеленый канал – астроциты, меченные первичными антителами к GFAP и вторичными антителами AlexaFluor 488, Изображения получены с помощью микроскопа Zeiss LSM 800, объектив Plan-Apochromat 20x/0.8, масштабная шкала - 50 мкм

Таким образом, иммуноцитохимический анализ подтверждает, что подавляющее количество клеток в исследуемых нами культурах — это нейроны и астроциты, что позволяет нам говорить об исследовании нейрон-глиальных сетей.

3.1.3. Воздействие нейротрофических факторов BDNF и GDNF на спонтанную биоэлектрическую активность клеток первичных культур гиппокампа при моделировании гипоксии *in vitro*

Для исследования влияния нейротрофических факторов BDNF и GDNF на нейросетевую активность при гипоксическом повреждении с помощью мультиэлектродных матриц была зарегистрирована спонтанная биоэлектрическая активность первичных культур клеток гиппокампа.

Регистрация биоэлектрической активности проводилась до моделирования гипоксии (базовый уровень активности), во время моделирования гипоксического повреждения (рис. 35) и далее ежедневно в течение 7 суток. Кратковременный эпизод острой нормобарической гипоксии приводит к выраженным и необратимым изменениям функциональной структуры нейронных сетей, что согласуется с ранее полученными данными (Ведунова М.В. с соавт., 2016). Отмечено угнетение спонтанной биоэлектрической активности (достоверное снижение числа малых сетевых пачек импульсов и числа составляющих их спайков) (табл. 4). Также были описаны значительные изменения функциональной структуры нейронных сетей (рис. 36, 37). Превентивное применение исследуемых нейротрофических факторов позволяло сохранять биоэлектрическую активность нейронных сетей на определенном функциональном уровне после моделирования гипоксии на протяжении всего периода наблюдения. В группе «Гипоксия» во время острого эпизода гипоксии наблюдались одиночные электрические события (спайки). В группах «BDNF» и «GDNF» наблюдались полноценные сетевые ответы: количество пачек/10мин: «BDNF» до гипоксии – $202,5 \pm 14,61$ пачек/10 минут, во время гипоксии – $103,4 \pm 10,4$, «GDNF» до гипоксии – $235,6 \pm 18,26$ пачек/10 минут, во время гипоксии – $195,85 \pm 8,94$; количество спайков в пачке: «BDNF» до гипоксии $279,8 \pm 21,16$, во время гипоксии – $108,7 \pm 9,1$ «GDNF» до гипоксии $362,15 \pm 17,28$, во время гипоксии – $179,075 \pm 10,41$) (рис. 35).

В отдаленном постгипоксическом периоде (7 суток после моделирования гипоксии) сетевая биоэлектрическая активность практически отсутствовала (число малых сетевых пачек составило 6% от исходного уровня активности, число спайков в пачках 5,3%).

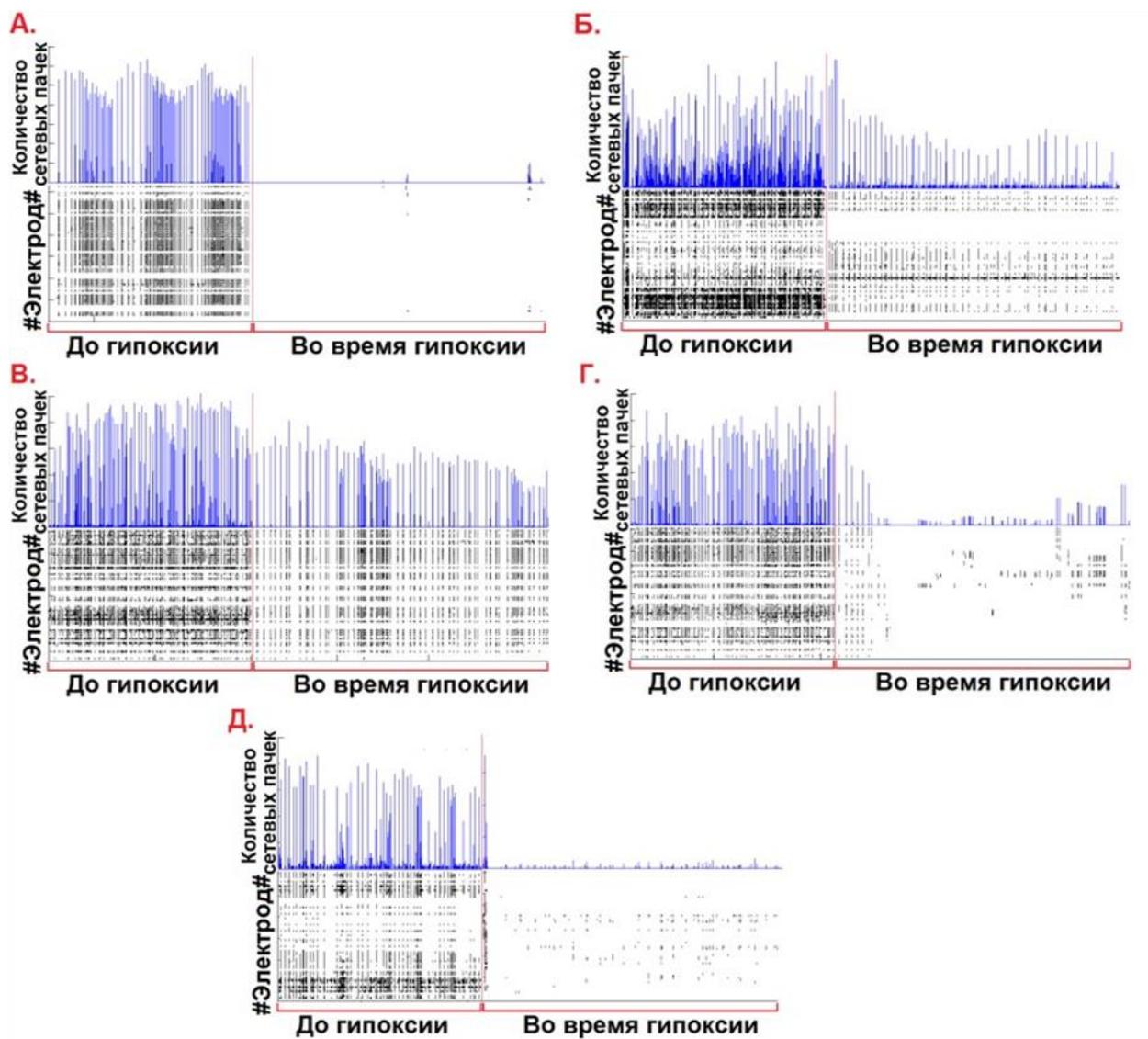


Рисунок 35. Релевантные примеры количества малых сетевых пачек и растровых диаграмм спонтанной биоэлектрической активности первичной культур гиппокампа во время моделирования гипоксии. А – Гипоксия, Б – группа с применением BDNF (1 нг/мл), В – группа с применением GDNF (1 нг/мл), Г - группа с применением BDNF (1 нг/мл)+ GDNF (1 нг/мл), Д - группа с применением BDNF (10 нг/мл)+ GDNF (10 нг/мл) (Mishchenko et al., 2015; Ведунова М.В. et al., 2016)

Во всех экспериментальных группах с превентивным применением нейротрофических факторов уровень биоэлектрической активности по изученным показателям был достоверно ($p < 0,05$) выше, чем в группе «Гипоксия» (табл. 4). Интересно отметить, что при совместном применении

нейротрофических факторов защитный эффект был менее выражен, чем при применении каждого из них в отдельности.

Таблица 4

Основные параметры спонтанной биоэлектрической активности первичных культур клеток гиппокампа через 7 суток после моделируемого стресса (данные нормированы относительно исходного уровня активности, принятого за единицу)

Группа культур	Количество малых сетевых пачек	Количество спайков в пачке
Контроль (нормоксия)	1,25±0,25	0,95±0,14
Гипоксия	0,06±0,02*	0,05±0,04*
Гипоксия+BDNF 1 нг/мл	0,80±0,20*#	0,63±0,31*#
Гипоксия+GDNF 1 нг/мл	1,14±0,23#	0,82±0,13
Гипоксия+BDNF 1 нг/мл + GDNF 1 нг/мл	0,76±0,33*#	0,61±0,37*#
Гипоксия+BDNF 10 нг/мл + GDNF 10 нг/мл	0,66±0,25*#	0,56±0,29*#

* – статистически значимые различия с исходным уровнем, # – статистически значимые различия с группой "Гипоксия", $p < 0,05$ (ANOVA) (по (Mishchenko et al., 2015; Ведунова М.В. с соавт., 2016)

В контрольной группе культур происходило не только достоверное снижение уровня спонтанной биоэлектрической активности, но и изменение ее функциональных характеристик, проявляющееся в достоверном ($p < 0,05$, ANOVA) более чем двукратном увеличении времени генерации и распространения сигнала по сети (рис. 36). Аппликация как BDNF, так и GDNF предотвращала подобные изменения.

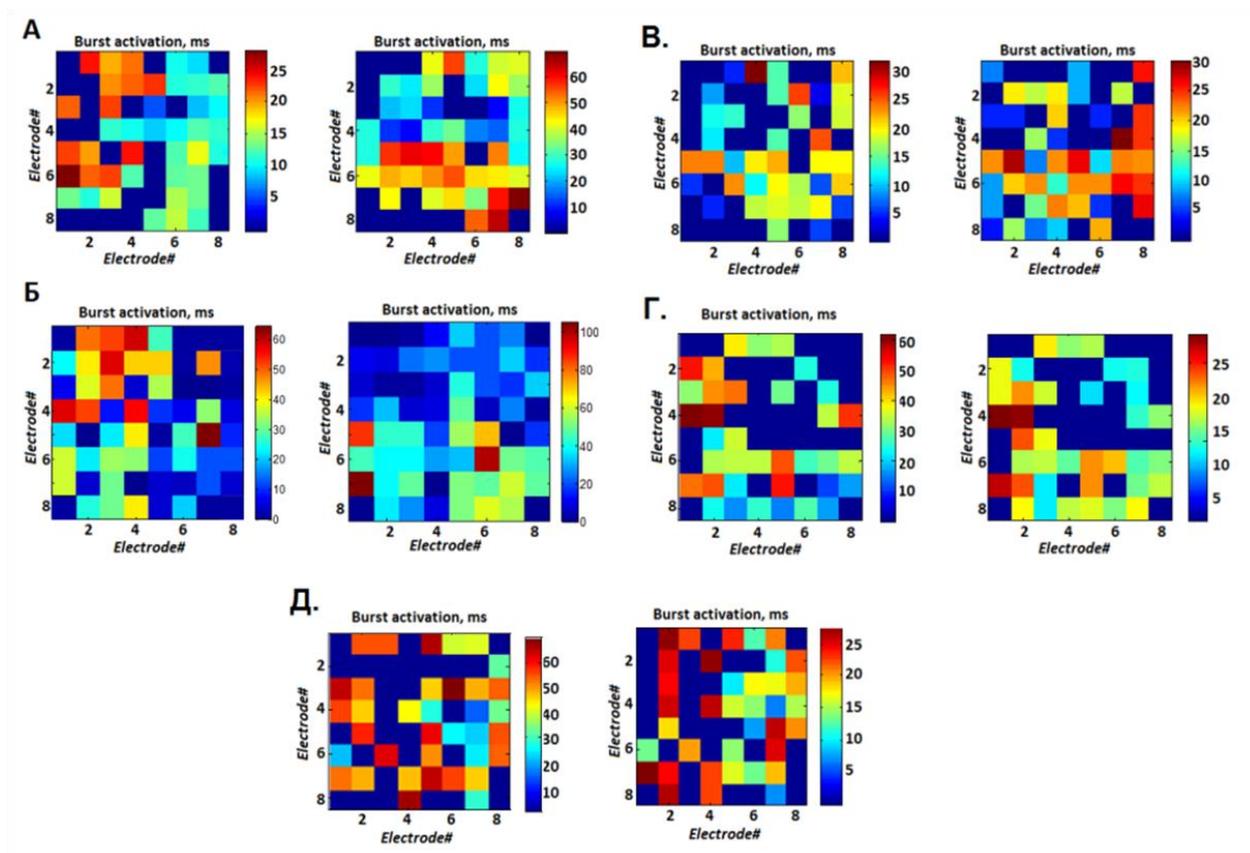


Рисунок 36. Релевантные примеры паттернов активации спонтанной биоэлектрической активности первичных культур клеток гиппокампа до моделирования гипоксии (слева) и через 24 часа после гипоксического воздействия (справа). А – контроль (гипоксия), Б - BDNF (1 нг/мл), В - GDNF (1 нг/мл), Г - BDNF (1 нг/мл)+ GDNF (1 нг/мл), Д - BDNF (10 нг/мл)+ GDNF (10 нг/мл). Цветовая диаграмма – время появления спайков в сетевой малой пачке, регистрируемых с электродов, мс ((Mishchenko et al., 2015; Ведунова М.В. с соавт., 2016; Shishkina et al., 2018)

Кроме того, показано, что гипоксия вызывает необратимые изменения в профиле сетевой пачки импульсов. Происходит достоверное резкое снижение количества спайков, составляющих пачку, а также ее длительности. В экспериментальных группах с применением как BDNF, так GDNF (1 нг/мл) наблюдается сохранение нейросетевой активности и структуры сетевых пачек. В группе культур с комбинированным применением эквимоллярных концентраций нейротрофических факторов

происходило изменение профиля сетевой пачки при неизменности количества спайков ее формирующих (рисунок 37).

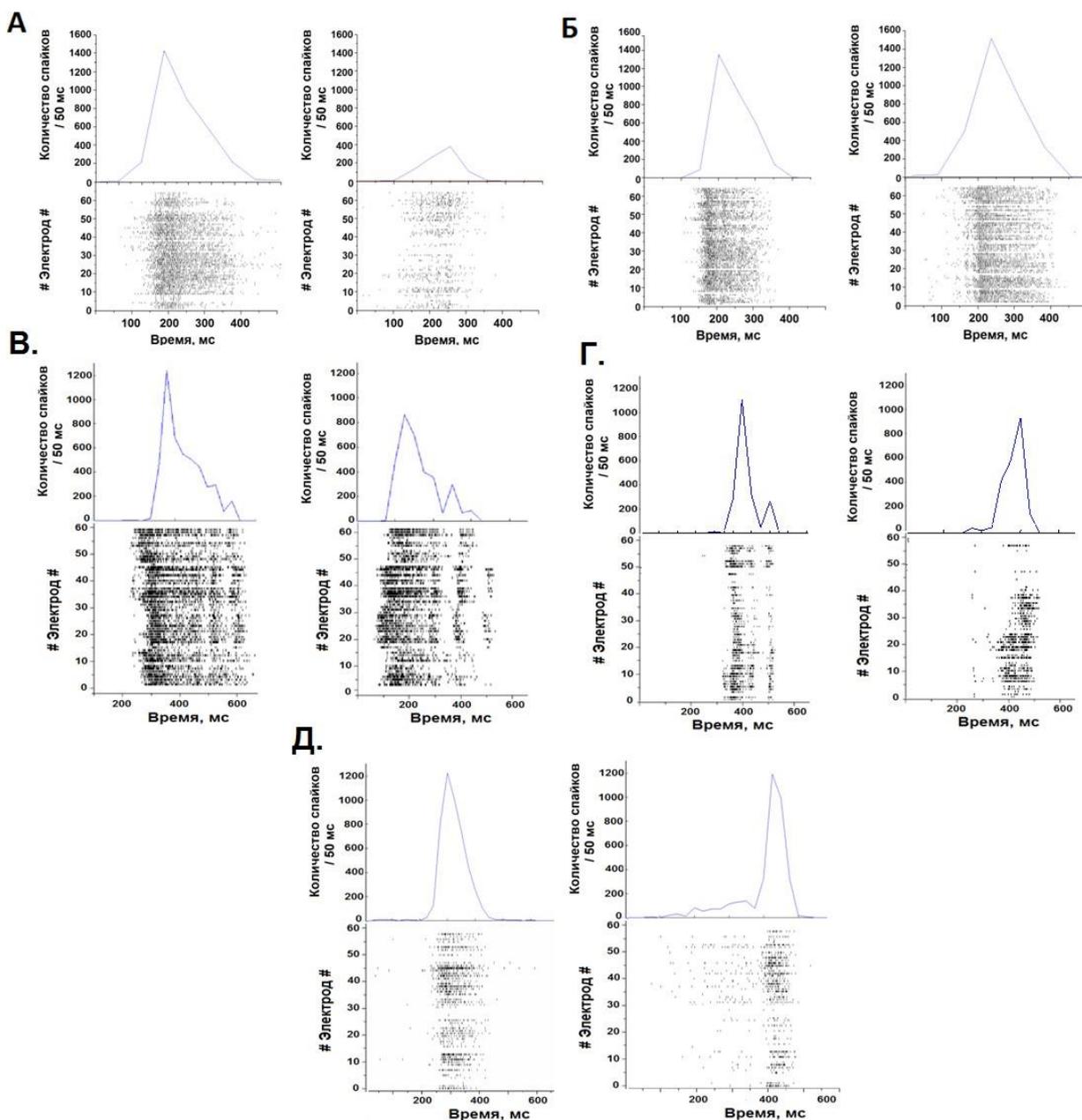


Рисунок 37. Количество спайков за 50 мс (сверху) и растровые диаграммы биоэлектрической активности первичной культуры клеток гиппокампа (снизу) до гипоксического воздействия (слева) и через 24 часа после моделирования гипоксии (справа). А – контроль (гипоксия), Б - BDNF (1 нг/мл), В - GDNF (1 нг/мл), Г - BDNF (1 нг/мл)+ GDNF (1 нг/мл), Д - BDNF (10 нг/мл)+GDNF (10 нг/мл) (Mishchenko et al., 2015; Ведунова М.В. с соавт., 2016)

Таким образом, полученные данные убедительно свидетельствуют, что превентивное применение нейротрофических факторов BDNF и GDNF в концентрации 1 нг/мл при моделировании гипоксии эффективно нивелирует изменения спонтанной биоэлектрической активности нейронных сетей и позволяет поддерживать их функциональную структуру.

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

3.1.4. Роль нейрональных киназ в реализации нейропротекторного действия BDNF GDNF

Для выявления молекулярных механизмов защитного действия исследуемых нейротрофических факторов нами были исследованы магистральные метаболические каскады, активируемые рецепторами TrkB и GFR α , а также ряд дополнительных внутриклеточных путей. Ключевыми участниками этих метаболических каскадов являются внутриклеточные киназы. Наиболее изученными каскадами, реализующими 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, активируемых 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 IKK β . Эти киназы являются компонентами каскадов, имеющих общие звенья и точки пересечения с магистральными каскадами, активируемыми нейротрофическими факторами BDNF и GDNF и могут являться мишенями, реализующими их нейропротекторные эффекты.

Данные о жизнеспособности первичных культур нервных клеток гиппокампа при ингибировании внутриклеточных киназ представлены в табл.

5. В условиях нормоксии только ингибирование RET и RAF киназ достоверно снижало жизнеспособность клеток первичных культур гиппокампа. В постгипоксическом блокада рецепторов TrkB и RET соответственно привело к резкому снижению жизнеспособности клеток и нивелировало защитное действие нейротрофических факторов. Жизнеспособность клеток группы «Гипоксия+BDNF+TrkB» не отличается от значений группы «Гипоксия», а группы «Гипоксия+GDNF+RET» достоверно ниже, чем «Гипоксия»

Таблица 5

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

Ингибируемая киназа	Нормальные условия	Гипоксия	Гипоксия + BDNF	Гипоксия + GDNF
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*#

* - 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., 2019, 2020a, 2021; Loginova et al., 2022)

Анализ магистральных метаболических каскадов, активируемых рецепторами нейротрофических факторов, показал, что ингибирование киназ Akt-1, MAP2K1/2, Erk2, и RAF1 приводит к полной отмене нейропротекторного действия BDNF (табл. 5). Блокада киназ Raf1, MAP2K1/2, Erk2 при применении глиального нейротрофического фактора не изменяла жизнеспособность клеток первичных культур гиппокампа относительно группы «Гипоксия+GDNF». Однако ингибирование киназы Akt-1 приводило к достоверному снижению жизнеспособности нервных клеток по сравнению с группой «Гипоксия+GDNF» (табл.5).

Таким образом, показано, что нейротрофический фактор BDNF реализует свои нейротрофические эффекты через активацию рецептора TrkB, реализующего свои эффекты как посредством активации MAPK/ERK, так и PI3K-сигнальных путей, а нейропротекторные эффекты GDNF обприактивации рецепторной RET-киназы в основном опосредованы активностью киназ PI3K-сигнального пути что согласуется с литературными данными (Wang, 2013; Ferrini et al., 2021; Kotliarova and Sidorova, 2021).

Также нами было изучена роль компонентов Jak/STAT пути в реализации нейропротекторного действия исследуемых нейротрофических факторов. Жизнеспособность клеток первичных культур на фоне блокады киназ Jak1, Jak2 не отличалась от показателей группы «Гипоксия+BDNF», однако блокада данных киназ при аппликации GDNF вела к достоверному снижению жизнеспособности нервных клеток по сравнению с группой «Гипоксия+GDNF».

Далее мы проанализировали влияние блокады киназ eEF2K, SRC и IKK β на реализацию нейропротекторных эффектов BDNF и GDNF. Показано, что в нормальных условиях блокада киназ eEF2K и IKK β не влияет на жизнеспособность нервных клеток гиппокампа, блокада SRC киназы вызывала снижение жизнеспособности (85,94 \pm 0,69%). При этом ингибирование всех трех киназ оказывало защитный эффект при воздействии

кислородной депривации, сохраняя жизнеспособность клеток первичных культур гиппокампа на достоверно более высоком уровне, чем в группе «Гипоксия» (Mitroshina et al., 2021; Loginova et al., 2022).

Блокада SRC киназы при моделировании гипоксии не влияла на защитное действие как BDNF ($83,85 \pm 1,65$ %), так и GDNF ($82,91 \pm 2,35$ %). Ингибирование киназы eEF2K не влияло на нейропротекторное действие BDNF ($82,45 \pm 2,14$ %) и нивелировало действие GDNF ($74,76 \pm 2,32$ %). При блокаде киназы IKK β наблюдался обратный эффект: показано достоверное снижение числа живых клеток при аппликации BDNF ($72,65 \pm 2,09$ %) и сохранение нейропротективного действия GDNF ($82,96 \pm 2,12$ %). При этом блокада данных киназ при гипоксическом повреждении без применения нейротрофических факторов напротив поддерживала жизнеспособность нервных клеток. Таким образом, впервые выявлена роль киназ SRC, eEF2K и IKK β в реализации нейропротекторного действия нейротрофических факторов.

Далее нами было исследовано влияние впервые выявленных киназ, участвующих в реализации нейропротекторного действия BDNF и GDNF, на функциональную кальциевую активность первичных культур клеток гиппокампа в постгипоксическом периоде. Результаты, полученные при исследовании влияния гипоксии на функциональную кальциевую активность, согласуются с данными анализа биоэлектрической активности. Показано, что на 21 день культивирования в норме наблюдается устойчивый паттерн кальциевой активности (процент работающих клеток $65,82 \pm 3,53$ %, частота $1,43 \pm 0,27$ осц/мин, длительность $11,79 \pm 0,88$ с) (таблица 6). Воздействие гипоксии приводит к значимым изменениям спонтанной кальциевой активности первичных нейрональных культур. На 7-е сутки постгипоксического периода показано снижение как количества метаболически активных клеток в культуре ($33,31 \pm 3,26$ %), так и частоты кальциевых осцилляций ($0,56 \pm 0,06$ осц/мин).

Применение обоих нейротрофических факторов сохраняло долю активных клеток на уровне интактных культур («Гипоксия+BDNF» 54,25±5,34%, «Гипоксия+GDNF» 50,38±2,49 % активных клеток). 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. Доля клеток, в которых регистрировались кальциевые события, при блокаде данных киназ на фоне аппликации нейротрофических факторов не отличалась от показателей группы «Гипоксия». Интересно отметить, что при ингибировании киназы SRC увеличивалась длительность кальциевых осцилляций («Контроль» - 12,1±0,49 с, «Гипоксия + BDNF + SRC» - 17,21±1,49 с, «Гипоксия + GDNF + SRC» - 16,28±3,95 с).

При аппликации нейротрофического фактора BDNF блокада киназы IKK β нивелировала его защитное действие. В группе «Гипоксия + BDNF + IKK β » доля клеток, проявляющих кальциевую активность (30,88±3,42%) и частота возникновения кальциевых событий (0,54±0,09) не отличались от показателей группы «Гипоксия». Однако на защитное действие GDNF ингибирование IKK β не влияло (52,02±4,68 %).

Таблица 6

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

Ингибируемая киназа	Процент клеток, проявляющих Ca ²⁺ активность	Длительность, с	Частота, осц/мин
Контроль	61,05±3,4	12,1±0,49	1,42±0,04
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+IKK β	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 +IKK β	52,02±4,68*	12,16±0,59	0,59±0,05*

* - достоверные отличия по сравнению с интактной группой, # - достоверные отличия по сравнению с группой "Гипоксия", ($p < 0,05$, ANOVA post-hoc критерий Бонферрони) (Mitroshina et al., 2019, 2021)

Анализ параметров связности нейрон-глиальной сети подтвердил сохранение динамической нейрон-глиальной сети в постгипоксическом периоде при аппликации нейротрофических факторов. Как видно на рисунке 38, в интактных культурах наблюдается высокий уровень корреляции активности между клетками в культуре, развита система функционально значимых связей. Коэффициент корреляции кальциевой активности между всеми парами клеток в культуре составил 0,18 [0,15; 0,26], для непосредственно контактирующих между собой 0,29 [0,22; 0,38]. Гипоксия приводит к снижению числа клеток, активность которых синхронизована друг с другом (рис.38). Коэффициент корреляции достоверно снизился до 0,09 [0,08; 0,13], для соседних клеток до 0,12 [0,11; 0,25]. Также воздействие гипоксии приводит к значительной потере функциональных связей нейрон-глиальных сетей («Интактные» - 100,8 [47,76; 271,76], «Гипоксия» - 4,26 [3,39; 29,73]). Применение BDNF и GDNF при моделировании гипоксии позволяет сохранить уровень корреляции кальциевой активности между клетками на достаточно высоком, однако не происходит сохранения количества функционально значимых связей (рис. 39, 40). Корреляция кальциевой динамики при добавлении BDNF сохраняется на уровне интактной культуры (применение BDNF, корреляция активности всех клеток 0,16 [0,15; 0,18],

непосредственно контактирующих между собой 0,23 [0,17; 0,44]); применение GDNF, корреляция активности всех клеток 0,15 [0,14; 0,21], непосредственно контактирующих между собой 0,21 [0,19; 0,37]) .

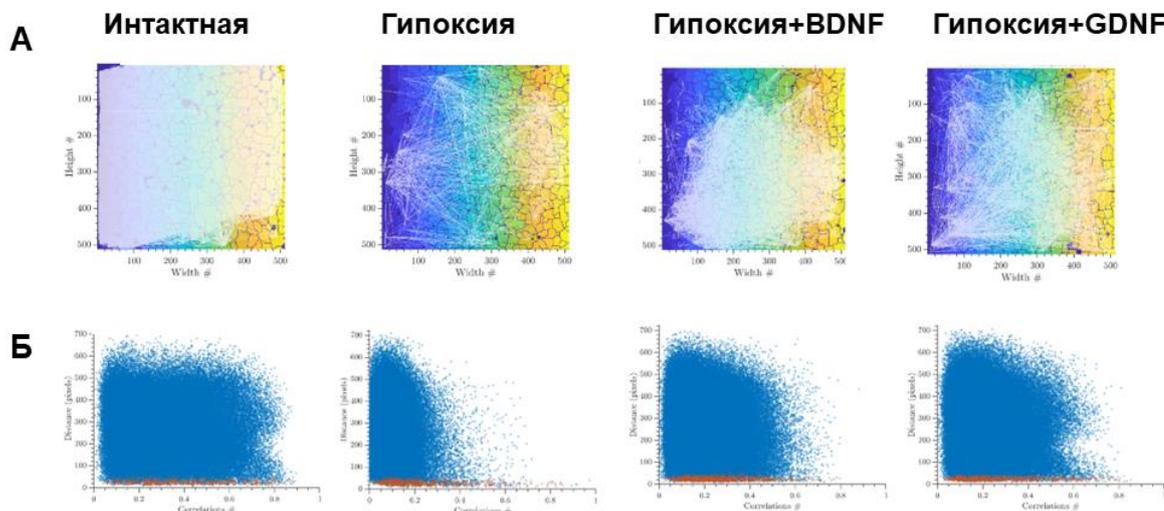


Рисунок 38. Репрезентативные примеры изменения корреляционных сетей в постгипоксическом периоде, 21 DIV: А – ориентированный граф, где ребра графа представляют собой функционально значимые связи между клетками (уровень корреляции кальциевого сигнала $\geq 0,3$); Б - зависимость корреляций спонтанных кальциевых осцилляций от расстояния между клетками, красными точками показаны соседние клетки, контактирующие сомами, синими точками – удаленные друг от друга пар клеток

Однако следует отметить, что при аппликации BDNF и GDNF не происходит сохранения количества функционально значимых связей между клетками («Интактная группа» - 100,8 [47,76; 271,76], «Гипоксия + BDNF» - 0,59 [0,13; 14,28], «Гипоксия + GDNF» - 0,65 [0,37; 47,88]) и процента коррелированных связей от общего числа возможных связей («Интактная группа» - 12,63 [8,12; 34,84], «Гипоксия + BDNF» - 0,08 [0,01; 2,02], «Гипоксия + GDNF» - 0,09 [0,04; 6,96]), что не отличается от показателей группы «Гипоксия» (0,33 [0,17; 23,76] и 0,05 [0,02; 3,58] соответственно). Максимально возможным количеством функциональных связей считается

ситуация, когда все клетки взаимодействуют друг с другом. Вероятно, снижение количества функциональных связей с изменениями структуры синаптических контактов, снижением площади и протяженности постсинаптических уплотнений, выявленных при ультраструктурных исследованиях, и соответственно снижением силы синапсов и уровня стимуляции сети.

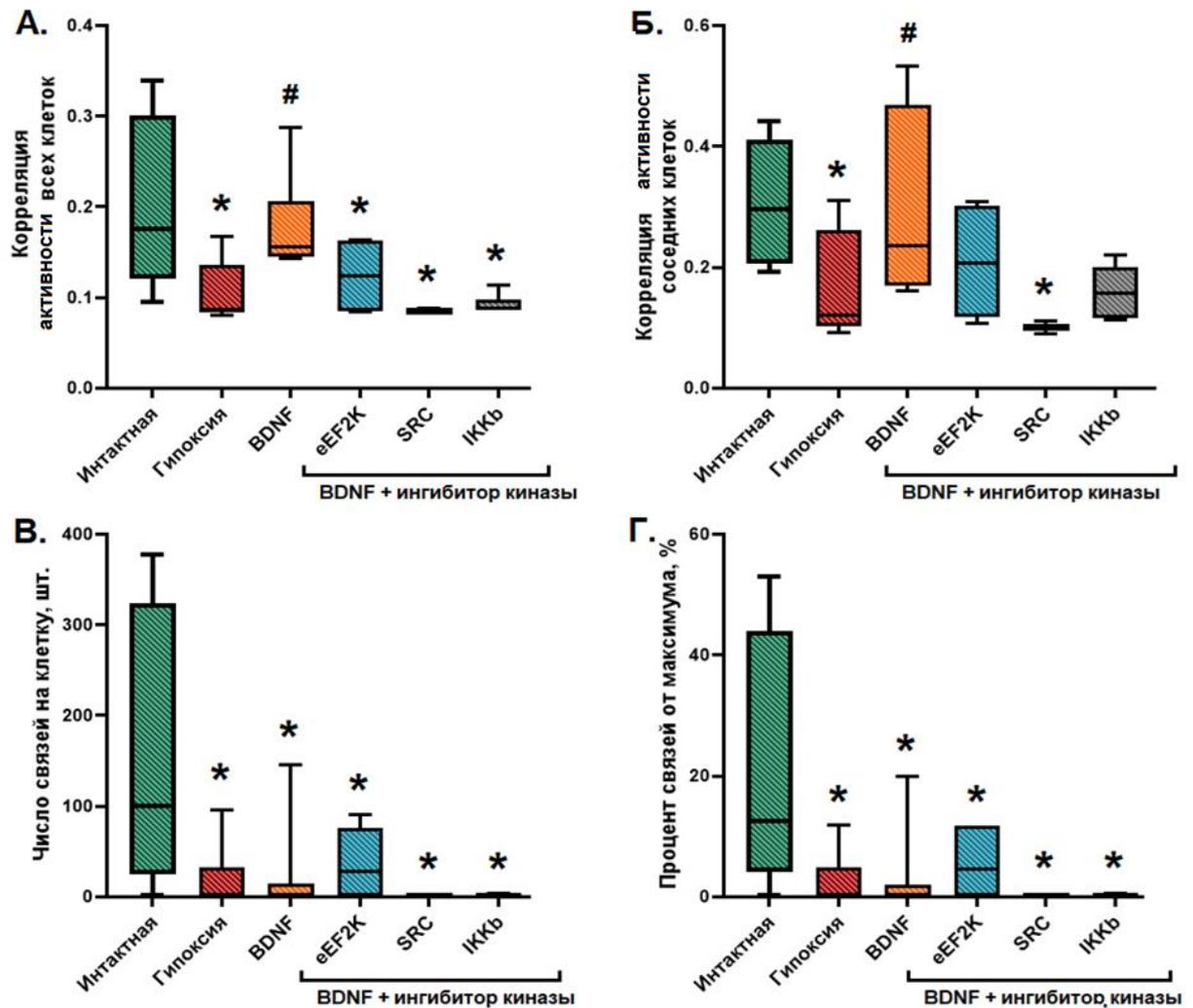


Рисунок 39. Реорганизация кальциевой активности нейрон-глиальной сети в первичных культурах гиппокампа в постгипоксическом периоде (21 DIV): А - средний уровень корреляции активности всех клеток; Б - средний уровень корреляции активности соседних клеток; В - среднее количество функциональных связей на клетку; Г - процент коррелированных связей от общего числа возможных связей, * - достоверные отличия по сравнению с «Интактной группой», $p < 0,05$, тест Краскела-Уоллеса (по Mitroshina et al., 2019, 2021 с дополнениями)

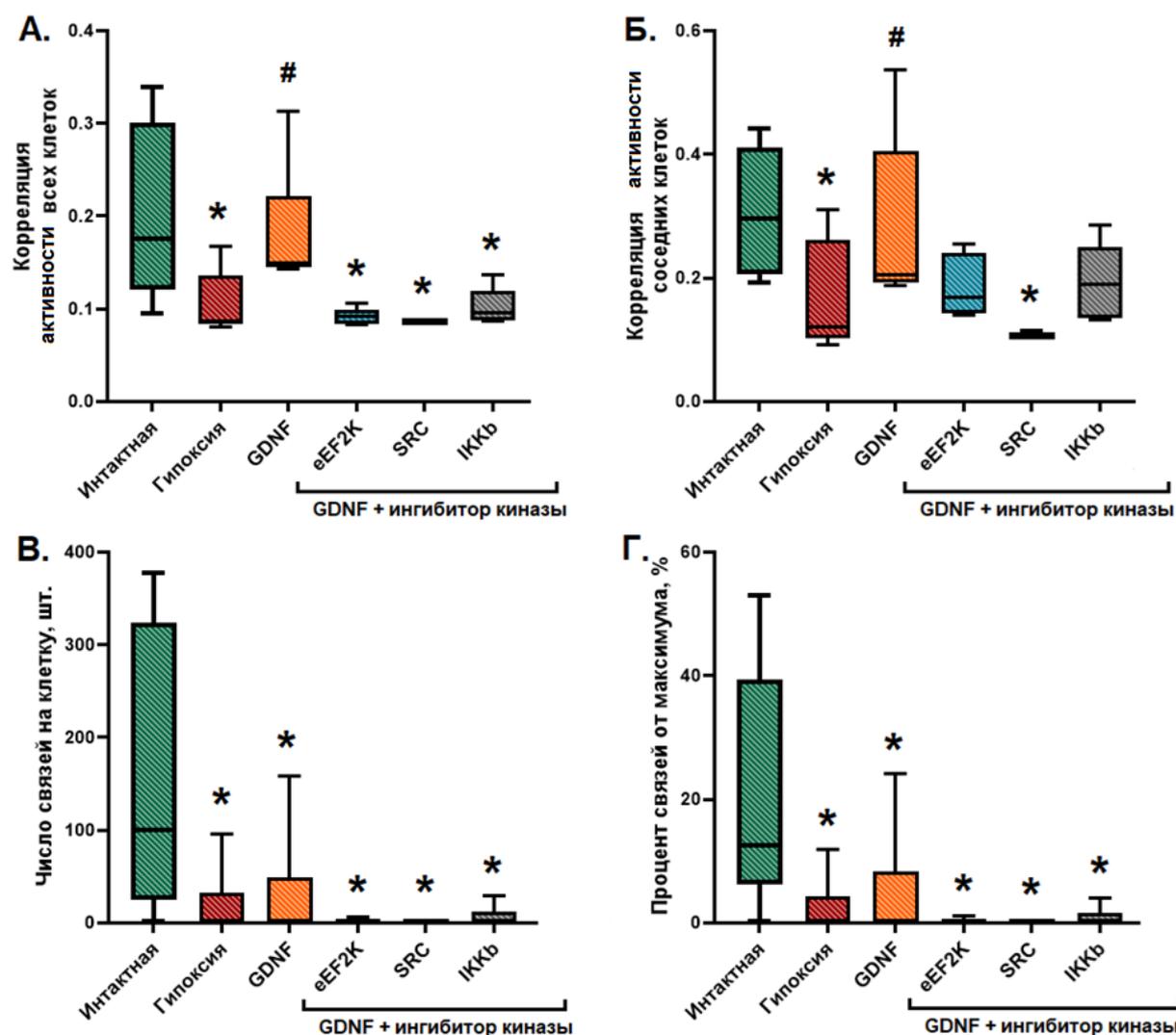


Рисунок 40. Реорганизация кальциевой активности нейрон-глиальной сети в первичных культурах гиппокампа в постгипоксическом периоде (21 DIV): А - средний уровень корреляции активности всех клеток; Б - средний уровень корреляции соседних клеток; В - среднее количество функциональных связей на клетку; Г - процент коррелированных связей от общего числа возможных связей. * - достоверные отличия по сравнению с «Интактной» группой, $p < 0,05$, тест Краскела-Уоллеса (по Mitroshina et al., 2019, 2021 с дополнениями)

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.39, 40). Таким образом, нами были выявлены новые киназ-ассоциированные механизмы нейропротекторного действия нейротрофических факторов BDNF и GDNF.

Особый интерес вызывают данные о сохранении параметров индивидуальной кальциевой активности нервных клеток в группах «BDNF+eEF2K» и «GDNF+IKK β » на фоне снижения коллективных характеристик клеточной сигнализации. Это может рассматриваться как сложный механизм разбалансировки нейрон-астроцитарных взаимодействий, опосредованных работой отдельных ферментов.

3.1.5. Взаимное влияние нейротрофических факторов BDNF, GDNF и фактора HIF-1 в норме и при моделировании гипоксии

Еще одним возможным аспектом реализации нейропротекторного действия нейротрофических факторов является их взаимодействие с системой фактора, индуцируемый гипоксией HIF-1. Данный белковый комплекс является ключевым регулятором ответа клетки на гипоксию. Концентрация его субъединицы HIF-1 α контролируется ферментами семейства пролил-4-гидроксилазного домена (PHD), активность которых зависит от концентрации кислорода. Ингибирование данного фермента приводит к накоплению HIF-1 α 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 HIF-1 α , а также оценено влияние стабилизации комплекса HIF-1 на уровень экспрессии мРНК нейротрофических факторов и их

рецепторов через 24 часа после моделирования гипоксии методом ПЦР в реальном времени. Для стабилизации комплекса HIF-1 нами был использован оригинальный высокоселективный ингибитор нейронального подтипа PHD2 Нейроадапт, любезно предоставленный к.х.н. А.В. Полозниковым (НИИ ВШЭ) и ООО НТП «Биоклиникум».

Показано, что экзогенное применение нейротрофических факторов в физиологических условиях не влияет на уровень экспрессии их мРНК в первичных культурах клеток гиппокампа (рис. 41 А, 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 и согласуется с литературными данными. 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. 41).

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

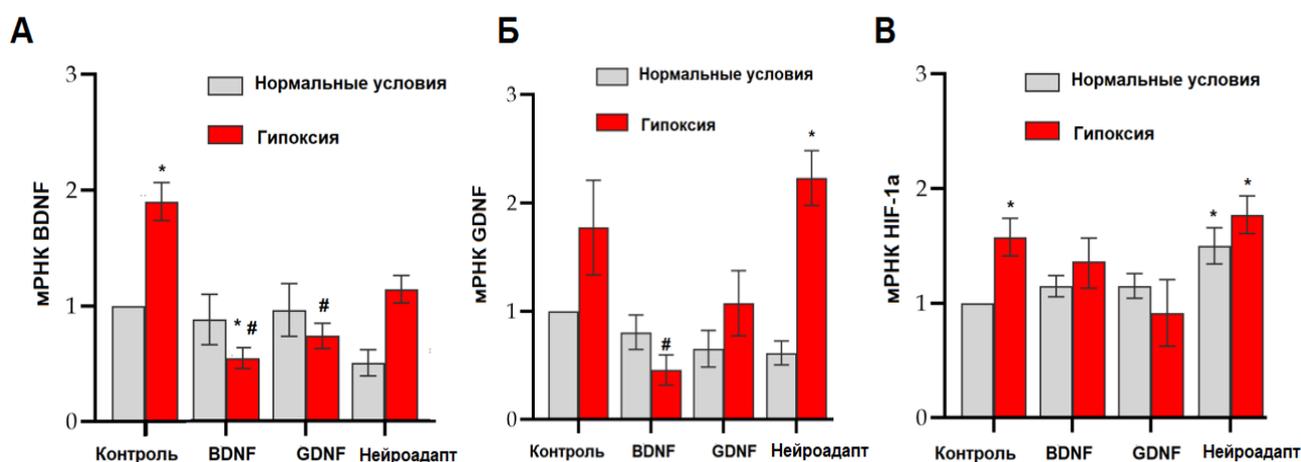


Рисунок 41. А - Оценка изменения уровня экспрессии мРНК BDNF, Б - Оценка изменения уровня экспрессии мРНК GDNF, В - Оценка изменения уровня экспрессии мРНК HIF-1a в клетках первичных культур гиппокампа через 24 часа после моделирования гипоксии. Данные нормализованы относительно контрольной группы в нормальных условиях, в качестве референсного гена использован *Oaz1*. * - различия достоверны относительно группы «Контроль, нормальные условия» # - различия достоверны относительно группы «Контроль, гипоксия»; $p < 0.05$, ANOVA, post-hoc критерий Бонферрони (по Vedunova et al., 2015; Мищенко et al., 2018; Mishchenko et al., 2019 с дополнениями)

Далее было оценено влияние нейротрофических факторов на уровень экспрессии мРНК HIF-1a 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. 41 В). 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 HIF-1a в постгипоксическом периоде, что возможно объясняется тем, что HIF-1a является первой, быстрой фазой ответа клетки на снижение концентрации кислорода, а нейротрофические факторы – следующей

степенью адаптивного ответа, активация которой заканчивает действие первой фазы.

Также нами 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. 42 А). При аппликации BDNF во время моделирования гипоксии увеличение экспрессии мРНК TrkB в постгипоксическом 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 GFR α -RET. В нормальных условиях аппликация нейротрофического фактора BDNF не влияла на уровень продукции мРНК GFR α , а аппликация GDNF вызывала снижение уровня его экспрессии, что в целом может рассматриваться как сохранение гомеостатического баланса (рис. 42 Б). В постгипоксическом периоде уровень экспрессии мРНК GFR α не изменялся во всех исследуемых группах.

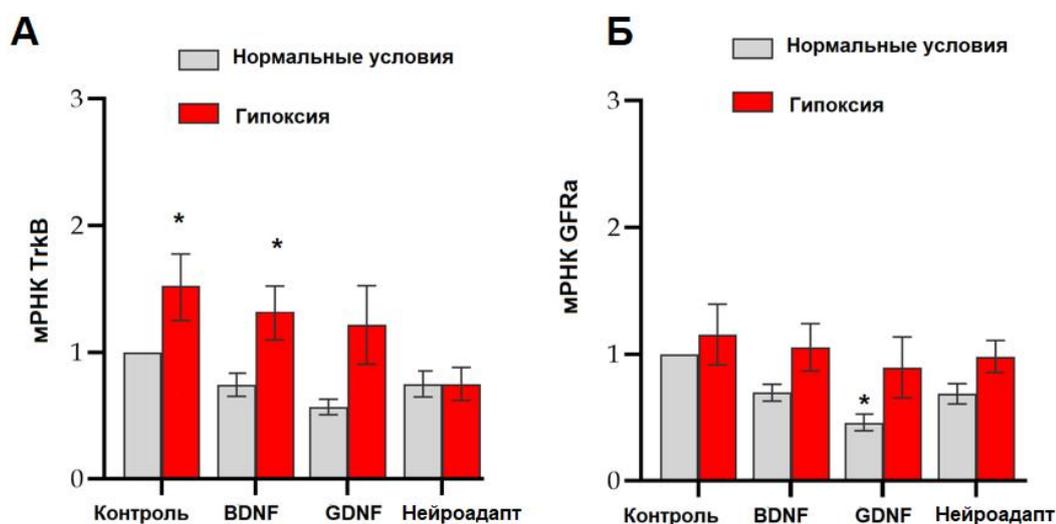


Рисунок 42. А – Оценка изменения уровня экспрессии мРНК тирозинкиназных рецепторов В типа, Б – Оценка изменения уровня экспрессии мРНК рецепторов GFR α в клетках первичных культур гиппокампа через 24 часа после моделирования гипоксии. Данные нормализованы относительно контрольной группы в нормальных условиях, в качестве референсного гена использован *Oaz1*. * - различия достоверны относительно группы «Контроль, нормальные условия» # - различия достоверны относительно группы «Контроль, гипоксия»; $p < 0.05$, ANOVA, post-hoc критерий Бонферрони (по Vedunova et al., 2015; Мищенко et al., 2018; Mishchenko et al., 2019 с дополнениями)

Имеются литературные данные, полученные на клетках не нейрональной природы, свидетельствующие, что HIF-пролилгидроксилаза может влиять на активацию транскрипционного фактора NF- κ B, поскольку способна ингибировать формирование комплекса киназ IKK α и IKK β , необходимого для активации NF- κ B (Wong et al., 2013). Транскрипционный фактор NF- κ B оказывает широкий спектр биологических эффектов, участвуя в том числе и в регуляции продукции нейротрофических факторов, мы проанализировали влияние ингибирования HIF-пролилгидроксилазы на уровень экспрессии мРНК киназы IKK β в норме и при моделировании гипоксии. Результаты представлены на рис. 43.

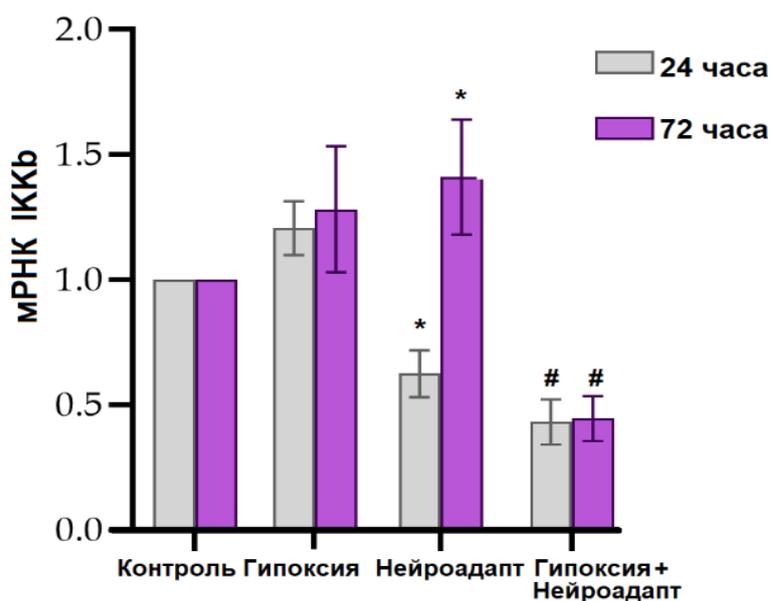


Рисунок 43. Уровень экспрессии мРНК IκBβ в первичных культурах клеток гиппокампа мыши при блокаде HIF-пролилгидроксидазы (PHD2) ингибитором Нейроадапт. Данные нормализованы к интактным культурам. В качестве референсного гена использован Oaz1. * - отличия достоверны относительно контрольной группы, # - отличия достоверны относительно группы «Гипоксия», $p \leq 0.05$, ANOVA

Показано, что применение ингибитора PHD приводит к снижению экспрессии мРНК киназы IκBβ через 24 часа после применения блокатора и достоверному усилению через 72 часа в 1,42 раза. Отмечено длительное достоверное снижение экспрессии данной киназы при блокаде PHD при моделировании гипоксии. Снижение экспрессии данной киназы отмечалось через 24 часа после моделирования гипоксии и сохранялось на менее трех суток. Таким образом, блокада HIF- пролилгидроксидазы значимо отражается на экспрессии IκBβ.

Заключение по разделу 3.1

Первый этап работы убедительно показал, что оба исследуемых нейротрофических фактора обладают выраженным нейропротекторным действием при моделировании изолированных компонентов ишемического повреждения и комплексных ишемия-подобных 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 ишемия-подобных условий. Оба нейротрофических фактора позволяют предотвратить изменения функциональной нейросетевой кальциевой и биоэлектрической активности. Превентивное применение нейротрофических факторов BDNF, GDNF способствует частичному сохранению ультраструктуры клеток нервной системы. Эффект нейротрофического фактора GDNF заключался в сохранении количества и структуры зрелых синаптических контактов, в случае нейротрофического фактора BDNF – сохранение целостности митохондриального аппарата клеток и синаптических везикул. Проведенные исследования показали, что оба нейротрофических фактора оказывают нейропротекторное действие на синаптический пул клеток, но достижение защитного эффекта опосредовано разными механизмами. Анализ магистральных метаболических путей, активируемых рецепторами исследуемых нейротрофинов показал, BDNF реализует свои нейротрофические эффекты посредством активации как MAPK/ERK, так и PI3K-сигнальных путей, а нейропротекторные эффекты GDNF в основном опосредованы активностью киназ PI3K-сигнального пути. Были выявлены новые нейрональные киназы, участвующие в реализации действия нейротрофических факторов. Показано, что киназа SRC участвует в реализации защитных эффектов как BDNF, так и GDNF, блокада киназы IKK β нивелирует защитное действие BDNF, а киназа Jak1, Jak2 и eEF2K – GDNF.

Данные о роли киназы eEF2K представляют значительную новизну, поскольку взаимосвязь между каскадами GDNF и путями, задействующими

киназу eEF2K, в настоящее время не исследована. Важно отметить, что блокада eEF2K негативно влияет на жизнеспособность нервных клеток только при применении GDNF, однако нивелирует положительный эффект на уровень скоррелированности кальциевой активности нейрон-глиальной сети при применении обоих нейротрофических факторов. Влияние eEF2K на нейросетевую активность вероятно связано с ее участием в синаптической пластичности. Известно, например, что eEF2K является основным молекулярным субстратом, опосредующим синаптическую пластичность и эффекты некоторых антидепрессантов, связанные с увеличением продукции BDNF (Suzuki and Monteggia, 2020). С другой стороны, имеются данные, что инфузия ингибитора eEF2K NH125 в область гиппокампа напротив увеличивала экспрессию BDNF у мышей (Chang et al., 2018). Возможно, этим может объясняться сохранение жизнеспособности клеток при блокаде киназы eEF2K на фоне применения BDNF.

Киназа IKK β напротив участвует преимущественно в реализации действия BDNF. Известно, что данная киназа принимает участие в активации транскрипционного фактора NF- κ B, активация которого является одним из известных путей действия BDNF. Канонический сигнальный путь NF- κ B (NEMO-зависимый путь) опосредуется комплексами киназ, состоящими из каркасного белка NEMO (или IKK γ) и двух киназ IKK α и IKK β (Sadek et al., 2020). NEMO мультимеризует субъединицы IKK, что способствует активации комплекса через транс-аутофосфорилирование. После активации комплекс связывается и фосфорилирует белки I κ B на специфических серинах на N-конце, что приводит к убиквитинированию и протеасомной деградации. Свободные I κ B также подвергаются конститутивной деградации через убиквитин-независимый путь. Когда I κ B разрушаются, свободный NF- κ B может перемещаться в ядро, где связывается с сайтами κ B на ДНК и активирует экспрессию генов (Molavi Pordanjani and Jalal Hosseini-mehr, 2016).

Полученные нами данные свидетельствуют, что для опосредованного нейротрофическими факторами BDNF и GDNF поддержания функциональной

нейросетевой кальциевой активности при моделировании гипоксии чрезвычайно важна роль киназы SRC. Интересно, что при этом блокада SRC не влияет на жизнеспособность нервных клеток при применении исследуемых нейротрофических факторов. Вероятно, роль SRC киназы связана в нейротрофин-опосредованной модуляции синаптической передачи. Киназы семейства Src участвуют как в NMDA-опосредованной активации TrkB-, так и в TrkB-опосредованном фосфорилировании тирозина рецепторов NMDA. Представители данного семейства киназ высоко экспрессируются в нейронах и являются важными регуляторами синаптической передачи, в частности, за счет фосфорилирования тирозина в субъединицах GluN2B и GluN2A рецептора NMDA для положительной модуляции синаптической передачи (Salter and Kalia, 2004; Ohnishi et al., 2011). Более того, активация TrkB приводит к прямой активации киназ семейства Src и усилению обратной связи фосфорилирования TrkB (Barry and McGinty, 2017). Сведений об участии киназы SRC в реализации действия глиального нейротрофического фактора на сегодняшний день недостаточно. Вероятно, GDNF-опосредованная активация SRC важна для выживания нейронов и роста аксонов (Blennerhassett and Lourenssen, 2022). Также известно, что ингибиторы киназ семейства SRC способны блокировать экспрессию мРНК GDNF (Abe et al., 2019). Таким образом, полученные нами данные расширяют существующие сведения о роли киназы SRC в реализации эффектов нейротрофических факторов и впервые демонстрируют необходимость участия SRC киназы в реализации защитных эффектов BDNF и GDNF на нейросетевом уровне.

Кроме того, нами было показано, что нейротрофические факторы BDNF и GDNF подавляют индуцируемую гипоксией экспрессию мРНК фактора HIF-1 α . Напротив, стабилизация комплекса HIF ведет к увеличению уровня экспрессии мРНК GDNF. Возможно, это объясняется тем, что индукция HIF-1 является первой, быстрой фазой ответа клетки на снижение концентрации кислорода, а усиление синтеза нейротрофических факторов – следующей ступенью адаптивного ответа, активация которой завершает действие первой

фазы. Также показано, что стабилизация HIF-1 приводит к снижению экспрессии киназы IKK β в постгипоксическом периоде. Таким образом, показано взаимное влияние нейротрофических факторов BDNF и GDNF и индуцируемого гипоксией фактора HIF-1.

Для дальнейших этапов исследования в качестве нейропротекторного агента был выбран BDNF, поскольку он является оптимальным защитным агентом при моделировании гипоксии, являющейся универсальным патогенетическим компонентом широкого спектра неврологических заболеваний. Применение BDNF позволяет эффективно сохранять зрелые синаптические контакты и структуру митохондрий. Кроме того, анализ литературных данных, свидетельствует о потенциальной онкогенности хронической активации RET-киназы, являющейся компонентом рецепторного комплекса GDNF (Mulligan, 2019; Li et al., 2022). Все вышеизложенное позволяет выбрать нейротрофический фактор головного мозга BDNF для разработки вирусного вектора для индукции гиперэкспрессии эндогенного нейропротекторного соединения и коррекции функциональных перестроек нейрон-глиальных сетей при воздействии повреждающих факторов.

3.2. Исследование влияния хронического увеличения уровня экспрессии BDNF на функциональное состояние нейрон-глиальных сетей при моделировании повреждающих факторов *in vitro*

Поскольку различные неврологические и нейрососудистые патологии преимущественно являются хроническими заболеваниями и требуют постоянного применения поддерживающей терапии, представляется необходимым разработать подходы к реализации длительного увеличения продукции нейротрофических факторов в нервных клетках. Одним из эффективных современных методических решений данной задачи является целевая доставка генов интереса в нервные клетки с помощью вирусных векторов. Это приводит к продолжительному усилению продукции целевого белка, а также позволяет селективно влиять на конкретный тип или популяцию клеток, что может иметь решающее значение при коррекции нейродегенеративных процессов.

Оценка эффективности применения аденоассоциированных вирусных векторов, несущих ген BDNF, при различных заболеваниях и повреждениях ЦНС весьма актуальна. Рядом работ показан положительный эффект использования таких вирусных векторных систем при ишемическом повреждении мозга (Yu et al., 2013), дегенерации нейронов сетчатки, болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваниях (Iwasaki et al., 2012; Katsu-Jiménez et al., 2016; Kimura et al., 2016). Однако, в некоторых случаях защитного эффекта получить не удалось (Dekeyster et al., 2015), поэтому требуется более глубокие исследования в данной области. Кроме того, на сегодняшний день нет работ, которые бы освещали влияние гиперэкспрессии BDNF на работу нейронных сетей. Таким образом, требуется комплексная оценка влияния хронического повышения уровня экспрессии BDNF на функциональную нейросетевую активность.

3.2.1. 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 в первичных культурах клеток гиппокампа. Карта используемого вирусного вектора представлена на рис. 44.

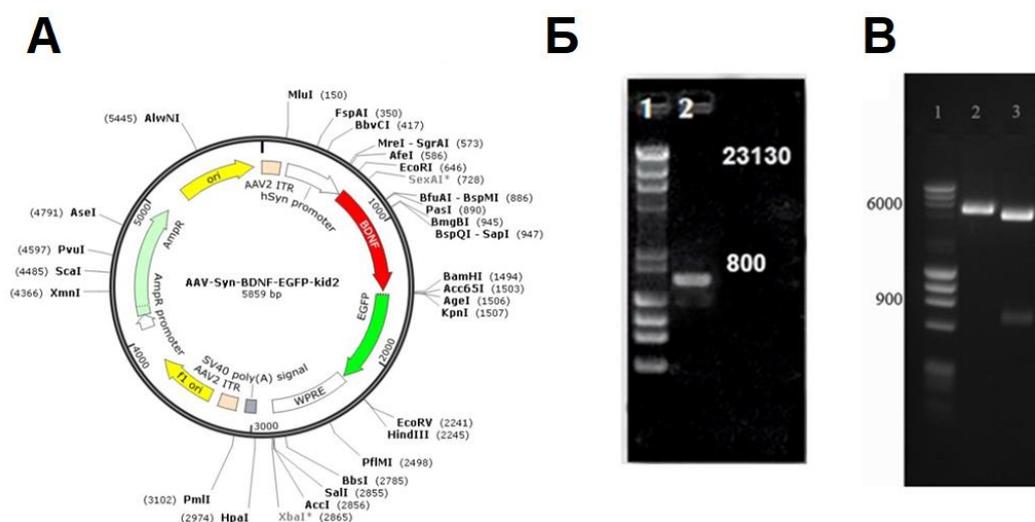


Рисунок 44. А – Карта плазмиды pAAV-Syn-BDNF-EGFP-kid2 (карта построена с помощью программы SnapGene Viewer 3.1.2), Б, В – Качественный анализ результатов ПЦР (Б) и рестрикции (В) методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Б: 1 – маркер длин ДНК, 2 – BDNF; В: 1 – Маркер длин, 2 – Рестрикция AAV-Syn-BDNF-EGFP ферментом EcoRI, 3 – Рестрикция AAV-Syn-BDNF-EGFP ферментами EcoRI и BamHI (Mitroshina et al., 2018b)

Экспрессия EGFP в культурах наблюдалась с 4 суток от момента инфицирования и сохранялась на протяжении не менее трех недель. С помощью иммуноцитохимического окрашивания было показано, что применение разработанного генноинженерного вектора для трансдукции первичных культур клеток гиппокампа мыши вызывает достоверное

увеличение продукции нейротрофического фактора BDNF клетками культуры гиппокампа (рис. 45 А, В). Показано отсутствие цитотоксичности разработанного вирусного вектора (рис. 45С).

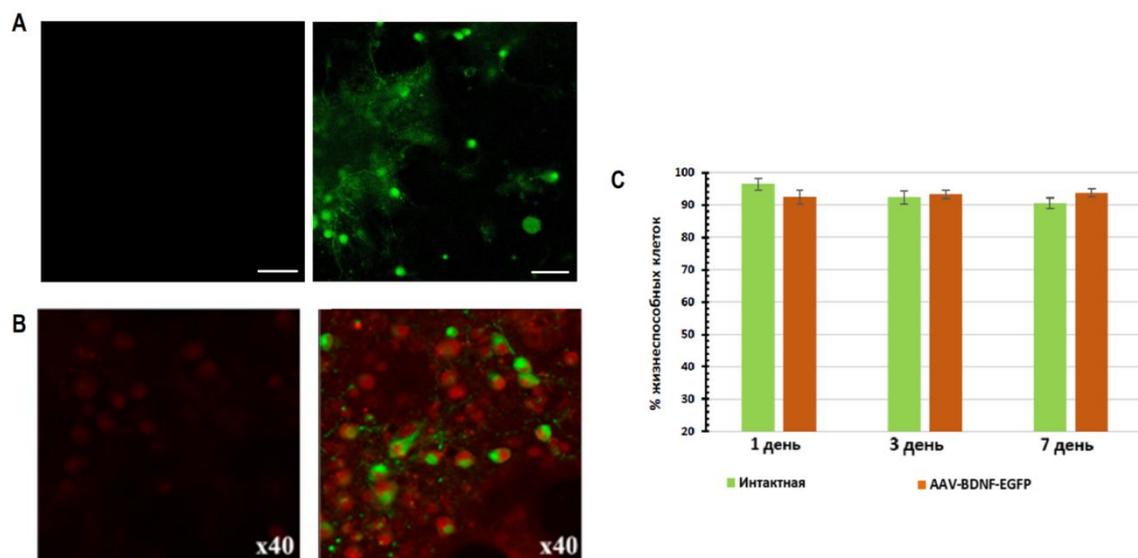


Рисунок 45. Иммуноцитохимическое маркирование белка BDNF в первичной культуре клеток гиппокампа, инфицированной вирусным вектором AAV-Syn-BDNF-EGFP. Красный канал – окрашивание антителами с флуоресцентной меткой Alexa647, зеленый канал – флуоресценция зеленого белка EGFP. А – интактная культура, Б – 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 (Mitroshina et al., 2018a)

Важным аспектом явилась оценка воздействия гиперэкспрессии BDNF на спонтанную электрическую активность. Наши предыдущие исследования показали, что в процессе развития культуры наблюдается усложнение паттерна биоэлектрической активности и появление устойчивого характерного рисунка пачки. Это происходит по мере формирования стабильной морфологической структуры нейронной сети с максимально возможным числом химических синапсов в отсутствии афферентации от

внешних сигналов. К 8-10 DIV происходит формирование устойчивых, регулярно повторяющихся пачек. Дальнейшее развитие (14 DIV) характеризуется появлением нормальных инвертированных, а затем неинвертированных пачек, которые сохраняются до 19-21 DIV, а также постепенным увеличением числа спайков в пачке (Гладков с соавт., 2011). Аналогичные периоды характерны и для формирования паттернов кальциевой активности нейрон-глиальных сетей (Широкова с соавт., 2013).

Анализ основных параметров спонтанной биоэлектрической активности не выявил каких-либо достоверных изменений по сравнению с интактными культурами при инфицировании AAV-Syn-BDNF-EGFP на протяжении наблюдений с 8 DIV (1 сутки после трансдукции) до 21 DIV (14 сутки после трансдукции) (рис. 46). Количество малых сетевых пачек за 10 минут составило на 8 DIV интактные – $56,6 \pm 4,9$ AAV-Syn-BDNF-EGFP – $63,2 \pm 10,56$, на 14 DIV интактные - $102,2 \pm 18,6$ AAV-Syn-BDNF-EGFP – $135,2 \pm 24,8$, на 21 DIV интактные - $186 \pm 23,5$ AAV-Syn-BDNF-EGFP – $235,5 \pm 43,15$, количество спайков в пачке на 8 DIV интактные – $224,2 \pm 30,9$ AAV-Syn-BDNF-EGFP – $183,2 \pm 30,6$, на 14 DIV интактные - $102,2 \pm 18,6$ AAV-Syn-BDNF-EGFP – $310,2 \pm 20,8$, на 21 DIV интактные - $483 \pm 52,5$ AAV-Syn-BDNF-EGFP – $438,5 \pm 61,5$ $p < 0,05$, ANOVA). Отмечена тенденция к увеличению числа спайков в пачке в культурах, инфицированных AAV-Syn-BDNF-EGFP по сравнению с интактными на 13-15 DIV. Примеры растров, характеризующих структуру сетевой пачки, представлены на рис. 47.

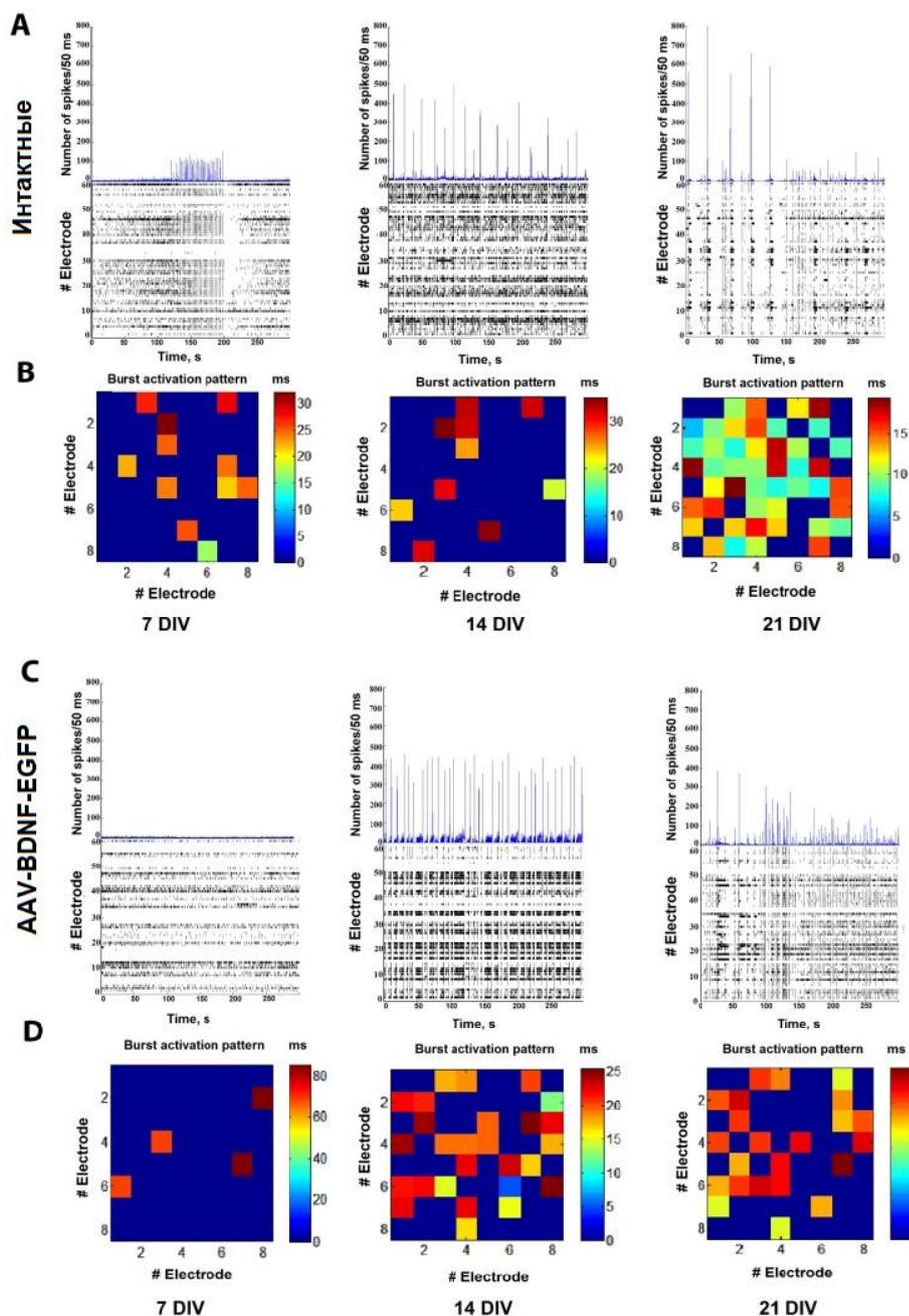


Рисунок 46. Спонтанная биоэлектрическая активность в первичных культурах клеток гиппокампа на 7, 14 и 21 DIV. (А, С) - количество спайков / 50 мс и растровые диаграммы спонтанной биоэлектрической активности в первичных культурах гиппокампа: (А) Интактные, (С) AAV-Syn-BDNF-EGFP; (В, D) репрезентативные примеры паттерна активации спонтанной биоэлектрической активности в первичных культурах гиппокампа: (В) Интактные, (D) AAV-Syn-BDNF-EGFP. Цветовая шкала - время появления спайков в сетевой малой пачке, регистрируемых с электродов, мс (модифицировано из Mitroshina et al., 2018a)

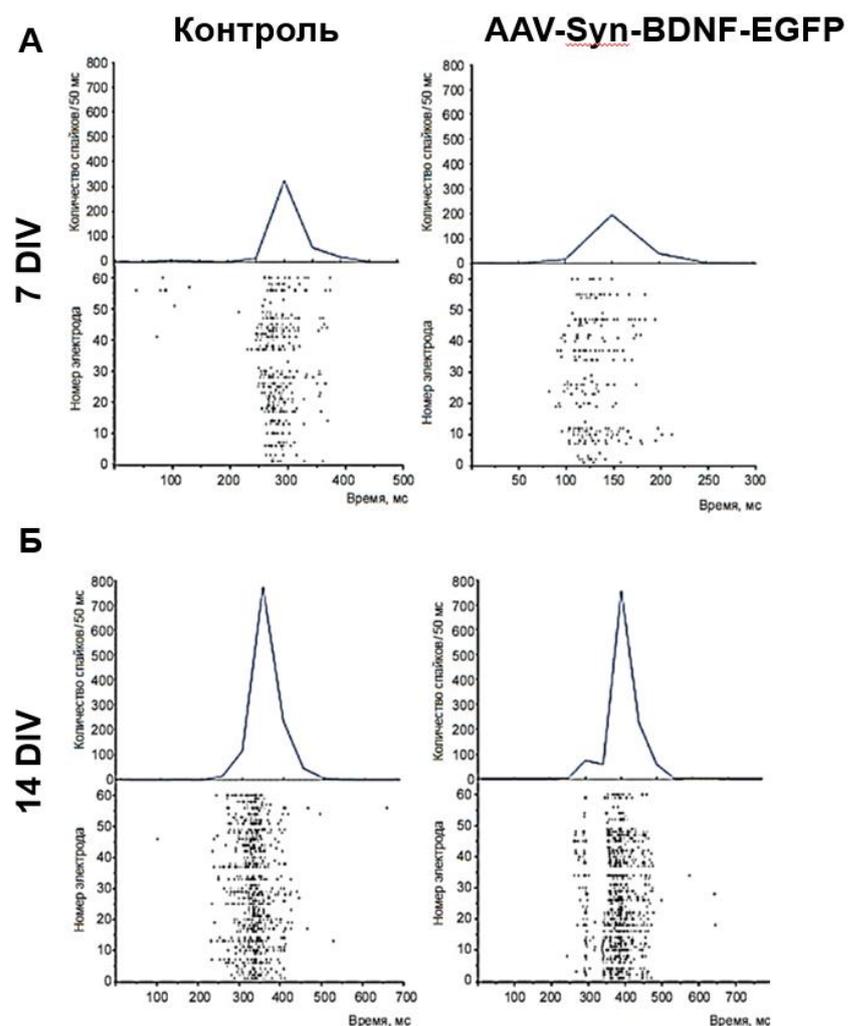


Рисунок 47. Растровые диаграммы спонтанной биоэлектрической активности диссоциированной культуры гиппокампа в постгипоксическом периоде: а — 1-е сутки после инфицирования (7 DIV); б — 7-е сутки после инфицирования (14 DIV); слева — интактная культура; справа — культура, инфицированная вирусом AAV-Syn-BDNF-EGFP (Mitroshina et al., 2018b)

Однако следует отметить, что гиперэкспрессия BDNF оказывает воздействие на паттерн активации, увеличивая времени 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).

Для более глубоко анализа сетевых эффектов, оказываемых гиперэкспрессией BDNF и выявления внутренней структуры сети, нами были

использованы методы корреляционного анализа. Метод корреляционных графов позволяет выявить хабы - элементы с наибольшим числом функционально активных связей, и показать динамические изменения, происходящие в сети в краткосрочном и долгосрочном периоде. При исследовании сетевых пачек импульсов при долговременном культивировании первичных культур на мультиэлектродных матрицах показано, что в различные дни развития (7-21 день развития) одной и той же культуры, в нейронной сети имеются постоянные хабы. Подобное явление зарегистрировано как в контрольных интактных культурах, так и в культурах, инфицированных разработанным вирусным вектором. И в контрольной, и в экспериментальной группах культур формируется сложная функциональная сетевая структура, имеющая к 21 DIV от 4 до 7 хаббов. (рис. 48 a1, б1). Хаб-коэффициент рассчитывался как отношение количества связей электрода к их общему количеству в графе и, таким образом, характеризует значимость группы нейронов, расположенных на одном электроде, для сетевой активности. Гистограмма, представляющая динамику хаб-коэффициента, позволяет оценить изменения значимости каждого электрода в многоэлектродной матрице.

Таким образом, гиперэкспрессия нейротрофического фактора за счет трансдукции вирусным вектором, не приводит к выраженным перестройкам сети в нормальных условиях, что является положительным аргументом при его потенциальном использовании в качестве терапевтического средства

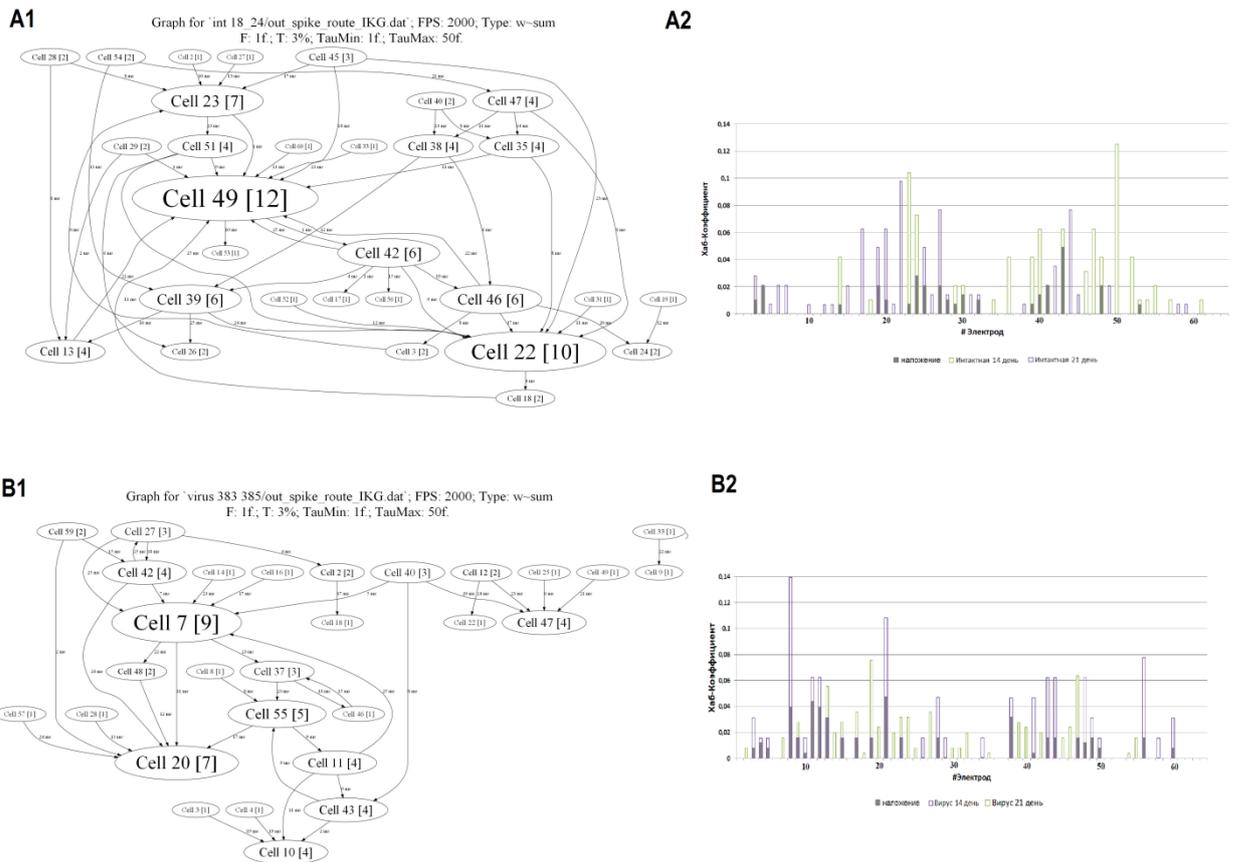


Рисунок 48. Функциональная структура нейронной сети первичных культур гиппокампа при инфицировании AAV-BDNF-EGFP. A1, B1 - Графическое представление коррелированных связей между нейронами в сети. Номер электрода представлен как «Cell X». Количество связей на электроде указано в квадратных скобках. Размер вершины пропорционален количеству значимых связей A1 – интактная культура, 14 DIV, B1 – культура, инфицированная AAV-BDNF-EGFP, 14 DIV; A2, B2 - Функциональные перестройки нейронных сетей в период онтогенеза 14-21 DIV. (а) Интантные; (б) AAV-BDNF-EGFP (Mitroshina et al., 2018a)

3.2.2. 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 стресс-условиях в сравнении с хронической аппликацией рекомбинантного BDNF 1

нг/мл. Данный способ отличается от рассмотренного нами ранее острого однократного применения BDNF и имеет свои особенности, связанные с возможностью развития стойких физиологических изменений

Наше исследование показало, что аденовирусный вектор, содержащий ген BDNF, обладает антигипоксическими и нейропротекторными свойствами при моделировании острой гипоксии в первичных культурах клеток гиппокампа мыши. Продемонстрировано, что он поддерживает не только жизнеспособность клеток после повреждающего воздействия (табл. 7), 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. 49).

Таблица 7.

Анализ жизнеспособности клеток в диссоциированных культурах гиппокампа в постгипоксический период

	Интактные	Гипоксия	Гипоксия+ BDNF 1 нг/мл	Гипоксия+ AAV-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», $p < 0,05$, ANOVA, post-hoc критерий Бонферрони (Mitroshina et al., 2018a)

Сравнение эффектов, оказываемых гиперэкспрессией BDNF и применением рекомбинантного BDNF на биоэлектрическую активность показало сходное влияние обоих способов применения нейротрофина (рис. 49). В группе «Гипоксия» спонтанная пачечная активность полностью прекращалась начиная со 2 минуты замены моделирования гипоксии. В период реоксигенации биоэлектрическая активность восстанавливается. На этом промежутке времени (2 часа после реоксигенации) число пачек

достоверно не различается с исходным уровнем активности, однако количество спайков в пачке, резко сокращается (рис. 49). В группе BDNF и AAV-Syn-BDNF-EGFP сохранялась пачечная активность в течение всего периода моделирования гипоксии (количество малых сетевых пачек/10 мин) – группа «Гипоксия» до моделирования гипоксии - $186 \pm 23,5$, гипоксия: $2,20 \pm 1,78$, реоксигенация – $251,5 \pm 48,35$; группа «Гипоксия+BDNF» до моделирования гипоксии - $203,5 \pm 29,15$, гипоксия - $195,5 \pm 42,04$, реоксигенация $198,2 \pm 34,65$; группа «Гипоксия+AAV-Syn-BDNF-EGFP» – до гипоксии $235,5 \pm 43,15$, гипоксия: $169,00 \pm 47,00$, реоксигенация $215,9 \pm 41,56$.

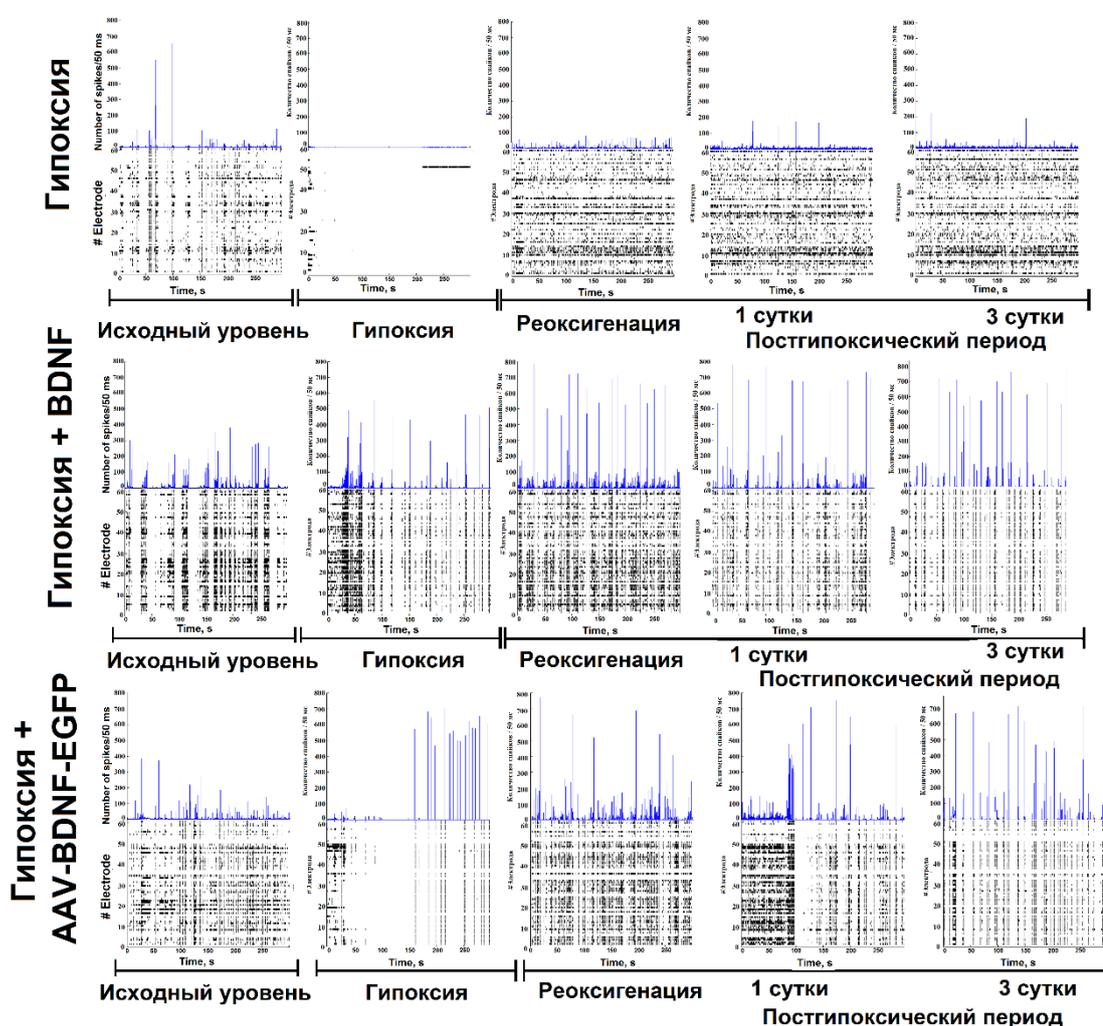


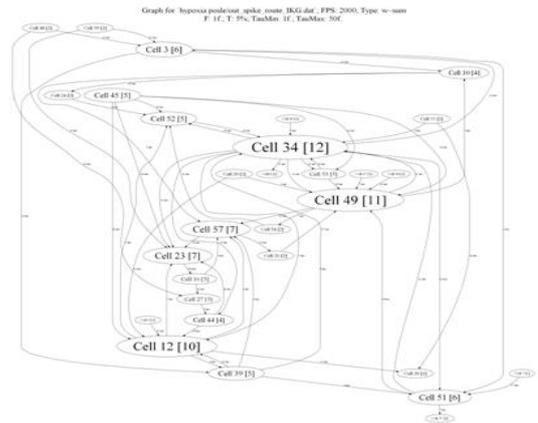
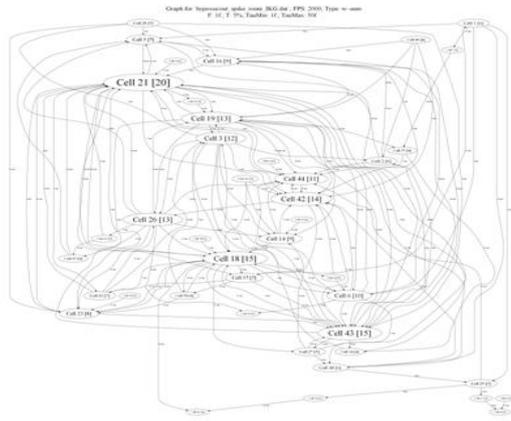
Рисунок 49. Число спайков / 50 мс и растровые диаграммы спонтанной биоэлектрической активности в первичных культурах гиппокампа во время гипоксии и в постгипоксическом периоде: А - гипоксия, В - гипоксия + BDNF, С - гипоксия + AAV-Syn-BDNF-EGFP. Вверху– число спайков за 50 мс, внизу – растровая диаграмма спонтанной биоэлектрической активности (Mitroshina et al., 2018a)

Количество спайков в пачке – «Гипоксия» до моделирования гипоксии - $483 \pm 52,5$ – гипоксия: $15,00 \pm 3,81$, реоксигенация – $64,5 \pm 18,51$; «Гипоксия+BDNF» до моделирования гипоксии - $383,5 \pm 39,75$, гипоксия - $350,5 \pm 43,64$, реоксигенация $555,5 \pm 43,64$; «Гипоксия+AAV-Syn-BDNF-EGFP» – до гипоксии $438,5 \pm 61,5$, гипоксия: $479,00 \pm 37,15$, реоксигенация $615,9 \pm 64,56$; ANOVA). Интересно отметить, что в контрольной группе культур количество спайков в пачке в период реоксигенации снижается в 7,54 раза, в то время как применение BDNF сохраняет число спайков на прежнем уровне.

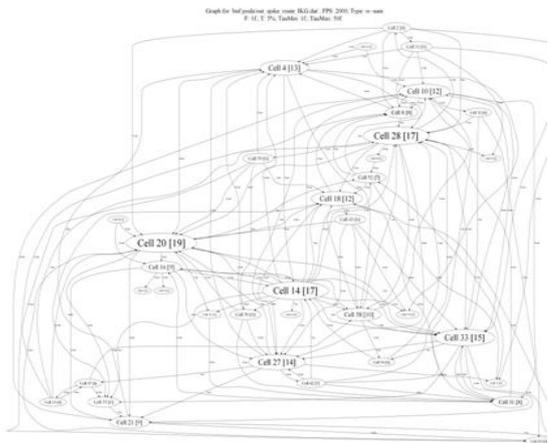
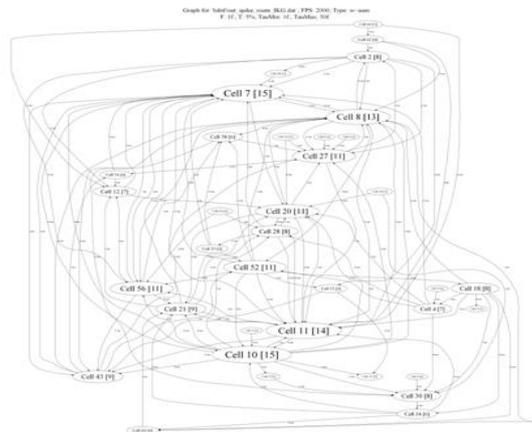
Также нами было показано, что гиперэкспрессия BDNF поддерживает сложную структуру нейронных сетей в постгипоксическом периоде. Кросс-корреляционный анализ показал, что острая гипоксия индуцировала значительное упрощение внутренней структуры нейронной сети в первичных культурах гиппокампа и сокращение числа хабов с уже на 1 сутки постгипоксического периода с $4,75 \pm 0,96$ до моделирования гипоксии до $3,5 \pm 0,87$ (рис. 50).

Анализ хаб-коэффициента (отношение числа связей на электроде к общему числу связей в графе), который характеризует значимость группы нейронов, расположенных на электроде, для сетевой активности, выявлено достоверное ($p < 0,05$, ANOVA) уменьшение количества связей на активных электродах (до моделирования гипоксии среднее значение хаб-коэффициента $0,023 \pm 0,003$, среднее количество связей в хабе $13,67 \pm 0,97$, на первый день постгипоксического периода – среднее значение хаб-коэффициента $0,032 \pm 0,005$, среднее количество связей в хабе $11,00 \pm 0,57$), изменяется значимость отдельных электродов (рис. 51), процент перекрытия в группе «Гипоксия» составляет $41,09 \pm 10,96\%$.

Нуроxia



BDNF 1ug/ml



AAV-BDNF-EGFF

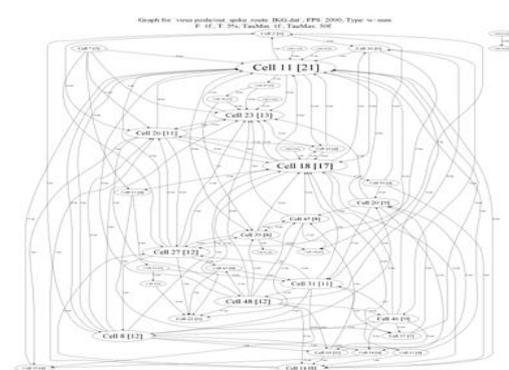
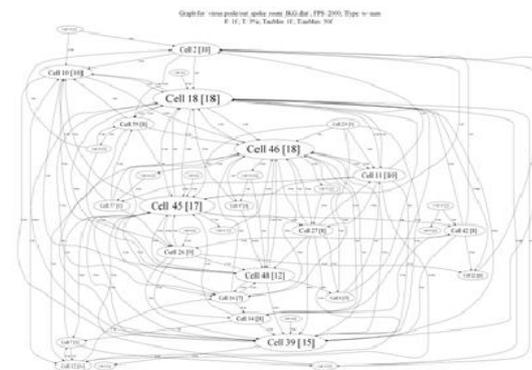


Рисунок 50. Функциональная структура нейронной сети первичных культур гиппокампа при моделировании гипоксии. А – Гипоксия, слева – до моделирования гипоксии, 21 DIV, справа – 1 сутки постгипоксического периода, В – хроническое введение BDNF 1 ug/ml, слева – до моделирования гипоксии, 21 DIV, справа – 1 сутки постгипоксического периода, С – культура, инфицированная AAV-BDNF-EGFP, слева – до моделирования гипоксии, 21 DIV, справа – 1 сутки постгипоксического периода

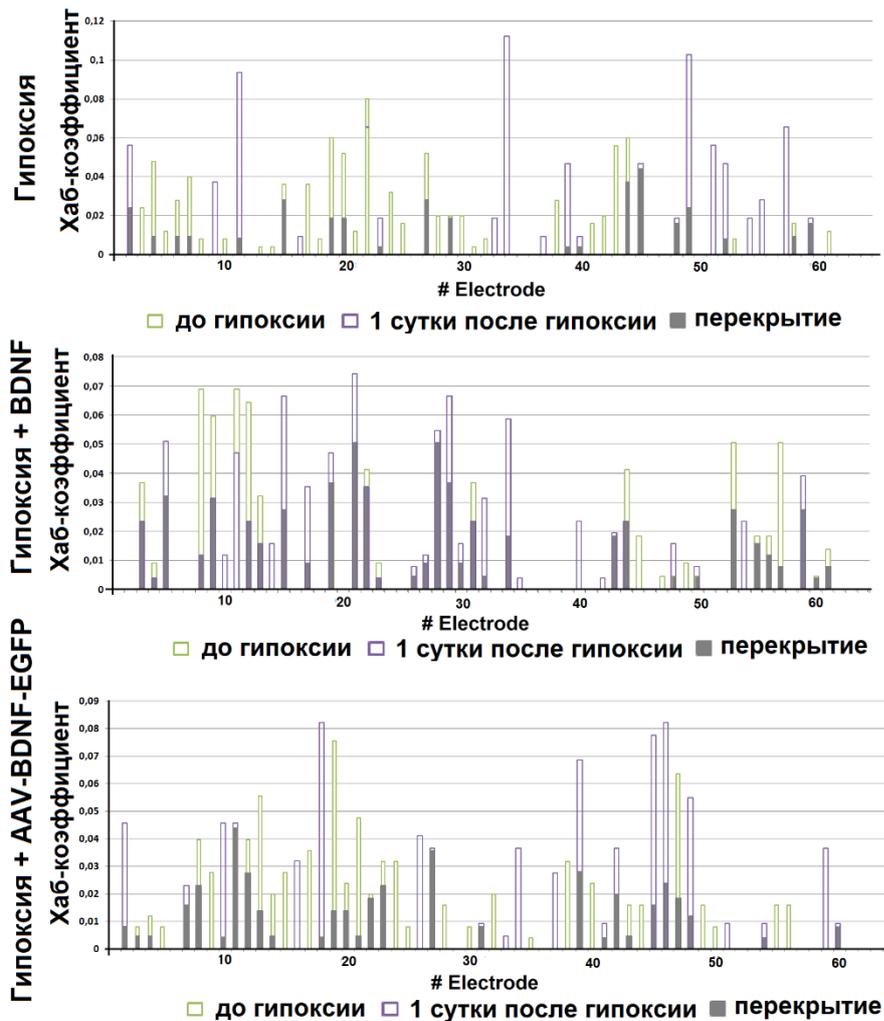


Рисунок 51. Функциональные перестройки нейронных сетей в постгипоксический период (модифицировано из Mitroshina et al., 2018a)

Оба способа применения BDNF позволяли частично нивелировать гипоксическое воздействие на внутреннюю структуру нейронной сети (рис. 51). В группах «Гипоксия + BDNF» и «Гипоксия + AAV-BDNF-EGFP» сохранилась комплексная сетевая структура без выраженных доминант, с несколькими ключевыми хабами. При этом увеличилось количество хабов («Гипоксия + BDNF»: до гипоксии: $6,11 \pm 0,52$; на следующий день после гипоксии: $7,88 \pm 0,35$; «Гипоксия + AAV-BDNF-EGFP»: до гипоксии: $3,81 \pm 0,35$; сутки после гипоксии: $7,45 \pm 0,67$). Среднее число связей в хабе осталось неизменным. Отмечено сохранение значимости отдельных электродов. Таким образом, разработанный вирусный вектор частично устраняет негативные

последствия острой гипоксии, поддерживая спонтанную биоэлектрическую активность первичных культур гиппокампа и сохраняя функциональную структуру нейронной сети, включая паттерн активации и основные функциональные узлы.

Также было продемонстрирована способность AAV-Syn-BDNF-EGFP частично нивелировать негативные эффекты гипоксии, оказываемые на кальциевую активность культур. Оценку Ca^{2+} активности в первичных культурах гиппокампа, трансдуцированных AAV-Syn-BDNF-EGFP, проводили на 7-е сутки постгипоксического периода. Показано, что в группе «Гипоксия» процент клеток, проявляющих Ca^{2+} -активность, достоверно снижен в 2,7 раза по сравнению с группой «Интактные» (табл. 8). В группе «Гипоксия + AAV-BDNF-EGFP» данный показатель был достоверно выше по сравнению с группой «Гипоксия» и составил $65,14 \pm 5,27\%$.

Таблица 8.

Основные параметры спонтанной кальциевой активности в первичных культурах гиппокампа в постгипоксический период (по Митрошина с соавт., 2018; Mitroshina et al., 2018)

Параметр	«Интактные»	«Гипоксия»	«Гипоксия+AAV-Syn-BDNF-EGFP»
Количество работающих клеток, %	$97,66 \pm 1,47\%$	$35,58 \pm 5,46\%^*$	$65,14 \pm 5,27\%^*\#$
Длительность Ca^{2+} осцилляций, с	$6,23 \pm 0,16$	$7,17 \pm 0,28^*$	$5,87 \pm 0,9$
Частота Ca^{2+} осцилляций, осц/мин	$6,9 \pm 0,31$	$1,24 \pm 0,134^*$	$5,84 \pm 0,28^*\#$

* - статистически значимые отличия по сравнению с группой «Интактные», #

- статистически значимые отличия по сравнению с группой «Гипоксия», $p < 0,05$ (ANOVA)

Примеры записей кальциевой активности приведены на рис. 52.

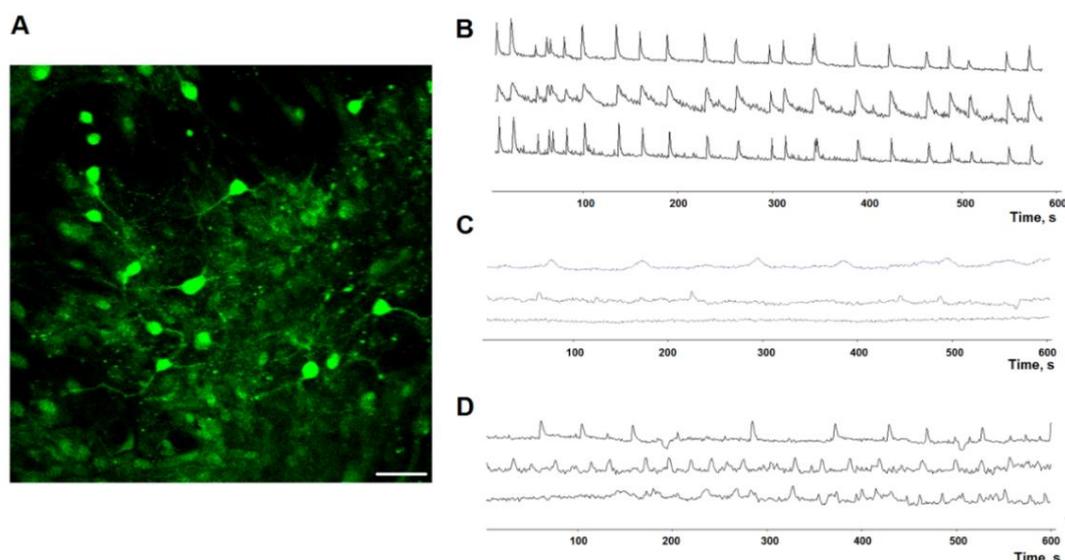


Рисунок 52. Ca^{2+} -активность в первичных культурах гиппокампа на 7-е сутки постгипоксического периода. (A) Пример флуоресцентного изображения культуры, окрашенной Oregon green 488 BAPTA. Масштабная линейка 20 мкм. (B-D) Репрезентативные записи Ca^{2+} активности, (B) интактные; (C) гипоксия; (D) гипоксия + AAV-BDNF-EGFP (Mitroshina et al., 2018a)

Кроме того, гипоксия достоверно снижала частоту возникновения Ca^{2+} событий в первичных культурах гиппокампа в 5,7 раза по сравнению с «Интактной» группой, $p < 0,05$, ANOVA. Использование вирусного вектора AAV-BDNF-EGFP сохраняло частоту возникновения Ca^{2+} на достоверно более высоком уровне, чем в группе «Гипоксия» (табл. 8).

Таким образом, данные о спонтанной биоэлектрической и кальциевой активности показали, что гиперэкспрессия BDNF, индуцированная AAV-Syn-BDNF-EGFP, способствует поддержанию функциональной активности клеток в первичных культурах гиппокампа, подвергшихся острой гипоксии.

3.2.3. Роль BDNF в сохранении функциональной целостности нейронных сетей при моделировании β -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 развития болезни Альцгеймера (Zhang et al., 2018; Nucera et al., 2018), что также позволяет предположить возможную роль BDNF в поддержании синаптической передачи и функционирования нейронных сетей при БА.

3.2.3.1. Морфофункциональные особенности нейрон-глиальных сетей гиппокампа в экспериментальных моделях β -амилоидоза *in vitro*

Нами было апробировано несколько экспериментальных моделей болезни Альцгеймера *in vitro*. Первой является модель с использованием клеток гиппокампа, полученных от эмбрионов (E18) мышей линии 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 по сравнению с контрольными культурами (рис. 53).

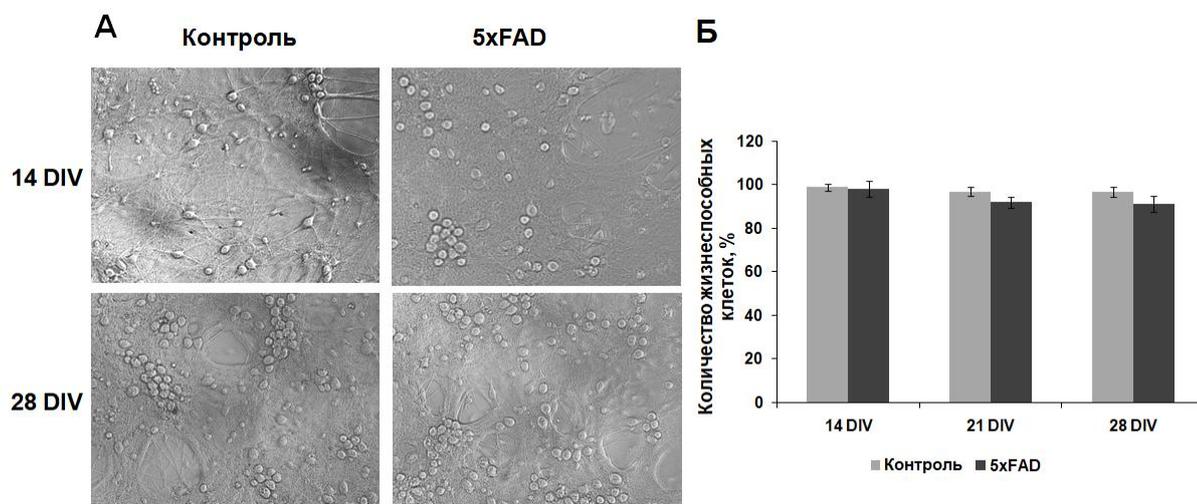


Рисунок 53. А- Репрезентативные микрофотографии первичных культур гиппокампа, полученных от мышей дикого типа и мышей линии 5xFAD, В – анализ жизнеспособности первичных культур клеток гиппокампа, полученных от мышей дикого типа и мышей линии 5xFAD (Mitroshina et al., 2020b)

Проведено исследование накопления β -амилоида в культурах нервных клеток мышей линии 5xFAD. Было показано, что как в первичных культурах нейронов коры головного мозга мышей линии 5xFAD, так и контрольных культурах C57Bl/6 происходит эндогенный синтез β -амилоида, который определяется интранейронально. На всех исследованных сроках развития культур (14, 17, 21, 28 DIV) не выявлено различий в уровне экспрессии β -амилоида (рис. 54). Можно предположить, что это связано с тем, что усиление продукции эндогенного амилоида в мозге мышей данной линии происходит на более поздних сроках. Согласно многочисленным литературным данным, амилоидные бляшки формируются в мозге мышей линии 5xFAD в возрасте более 8 месяцев, хотя первые когнитивные нарушения отмечены в 4-месячном возрасте (Bilkei-Gorzo, 2014).

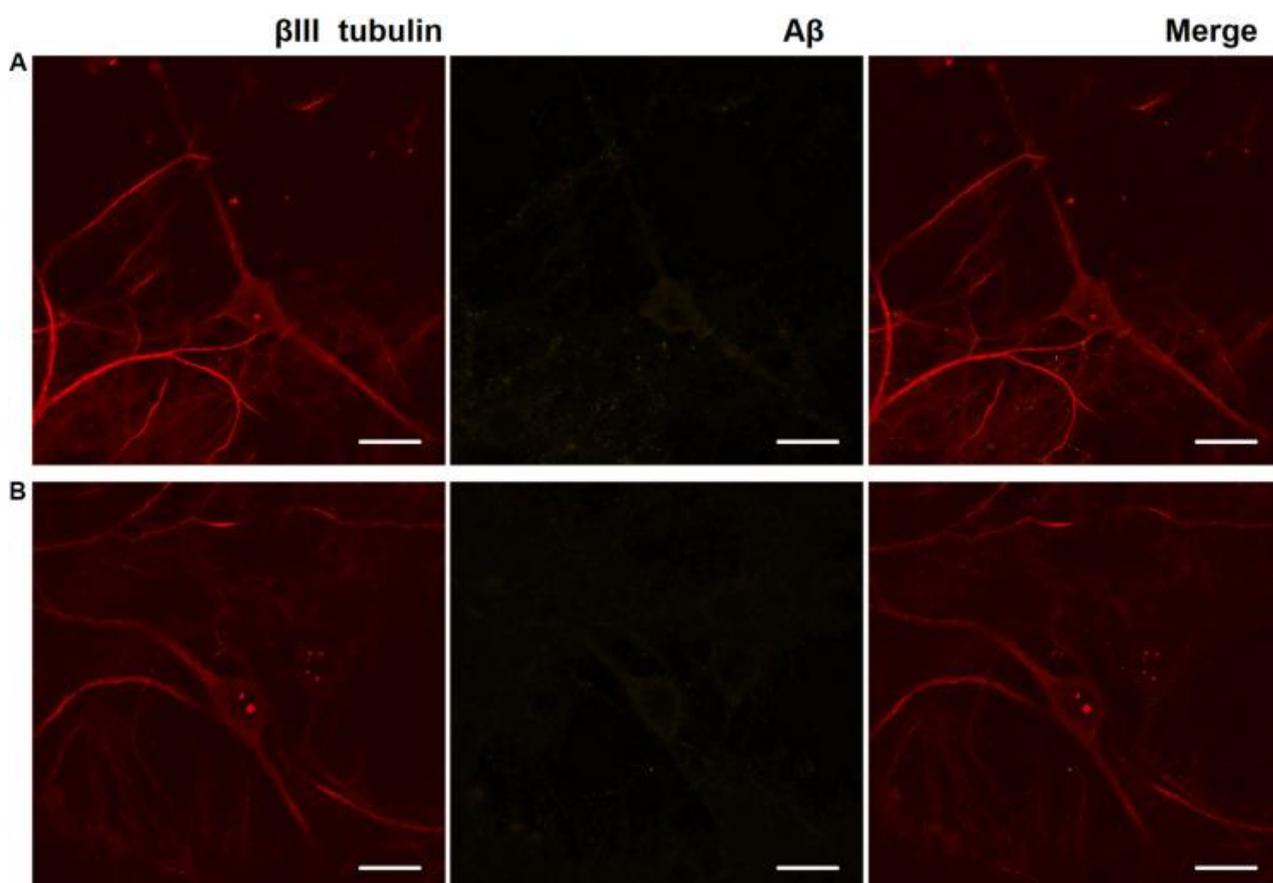


Рисунок 54. Иммуноцитохимическое маркирование A β в первичных культурах клеток гиппокампа на 28 DIV. Красный канал – β III Tubulin, желтый канал – A β . А – первичные культуры, полученные от мышей c57BL/6, В – первичные культуры, полученные от мышей 5xFAD. Масштабная шкала – 20 мкм (Mitroshina et al., 2020b)

Однако, несмотря на отсутствие морфологических изменений и повышенного накопления β -амилоида 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 (21 DIV «Контроль» $78,2 \pm 10,02\%$ и «5xFAD» $44,3 \pm 7,02\%$, 28 DIV «Контроль» $65 \pm 4,6\%$, «5xFAD» $35,5 \pm 7,91\%$), а также снижении частоты (21 DIV «Контроль» $-0,97 \pm 0,07$, 5xFAD $0,58 \pm 0,11$ осц/мин; 21 DIV «Контроль»

1,21±0,12, 5xFAD 0,62±0,19 осц/мин) и увеличении длительности кальциевых событий (табл. 9)

Таблица 9.

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

День культивирования	Контроль (дикий тип)			5xFAD		
	Активные клетки, %	Частота Ca ²⁺ событий, осц./мин	Длительность Ca ²⁺ событий, с	Активные клетки, %	Частота Ca ²⁺ событий, осц./мин	Длительность Ca ²⁺ событий, с
14 DIV	81,09±4,38	0,69±0,05	12,3±0,87	60,2±10,1 2	0,57±0,09	14,02±1,94
21 DIV	78,2±10,02	0,97±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±0,23	9,45±0,76	35,5±7,91 *	0,72±0,18 *	15,02±2,1*

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

Полученные нами 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 выявить механизмы реорганизации нейронных сетей на самых ранних этапах семейной формы БА. Однако с целью исследования влияния амилоидопатии данную экспериментальную модель использовать невозможно.

Также нами адаптирована *in vitro* модель β -амилоидопатии, основанная на аппликации в культуральную среду синтетического A β 1-42. Были протестированы два протокола моделирования амилоидопатии *in vitro*, основанные на острой однократной и хронической аппликации фибриллярной формы A β 1-42. Оценка жизнеспособности культур показала, что только

хроническое введение Аβ приводит к достоверному снижению процента жизнеспособных клеток и выраженному угнетению кальциевой активности в исследуемый период (рис. 55), поэтому для исследования влияния гиперэкспрессии BDNF на функционирование нейронных сетей при БА была выбрана именно эта модель.

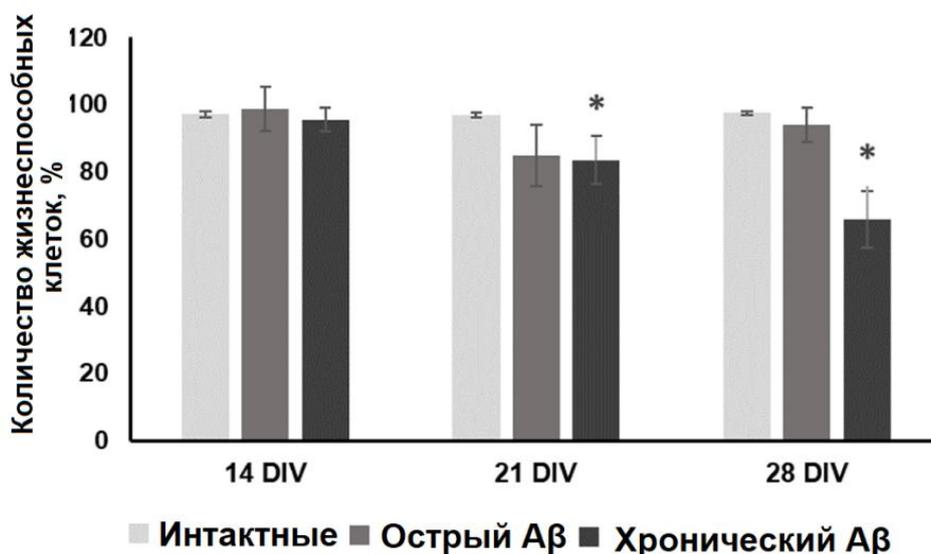


Рисунок 55. Анализ жизнеспособности первичных культур клеток гиппокампа на фоне применения экзогенного β-амилоида, * $p < 0.05$, ANOVA

Иммуногистохимически показано формирование конгломератов амилоида при хронической, но не при острой аппликации Аβ (рис. 56).

Анализ кальциевой активности выявил, что однократная аппликация Аβ не оказывает выраженного воздействия на кальциевую активность нейрон-глиальных сетей. Достоверного изменения числа активных клеток и частоты возникновения кальциевых событий не зарегистрировано на протяжении всего периода наблюдения. На 14 DIV отмечается снижение длительности кальциевых осцилляций («Интактные» - $12,9 \pm 1,13$ с, «однократный Аβ» - $9,16 \pm 1,13$ с, которое нормализуется уже к 21 дню культивирования. При хроническом введении Аβ наблюдается значимое ($p < 0,01$, ANOVA) угнетение кальциевой активности, регистрирующееся начиная с 21 дня культивирования, что согласуется с данными полученными при оценке

жизнеспособности. При подсчете количества клеток, проявляющих кальциевую активность, достоверные отличия выявляются на 21 и 28 сутки культивирования (21DIV Интактные - $80,05 \pm 3,40\%$, хронический А β - $29,01 \pm 16,38\%$, 28DIV Интактные - $68,70 \pm 9,53\%$, хронический А β - $17,18 \pm 9,48\%$. На 28 DIV также зарегистрировано резкое снижение частоты кальциевых осцилляций (Интактные $2,49 \pm 0,34$, “А β ” $0,15 \pm 0,01$ осцилляции/мин) и увеличение их длительности (Интактные $6,2 \pm 0,23$ с, хронический А β $13,24 \pm 2,37$ с).

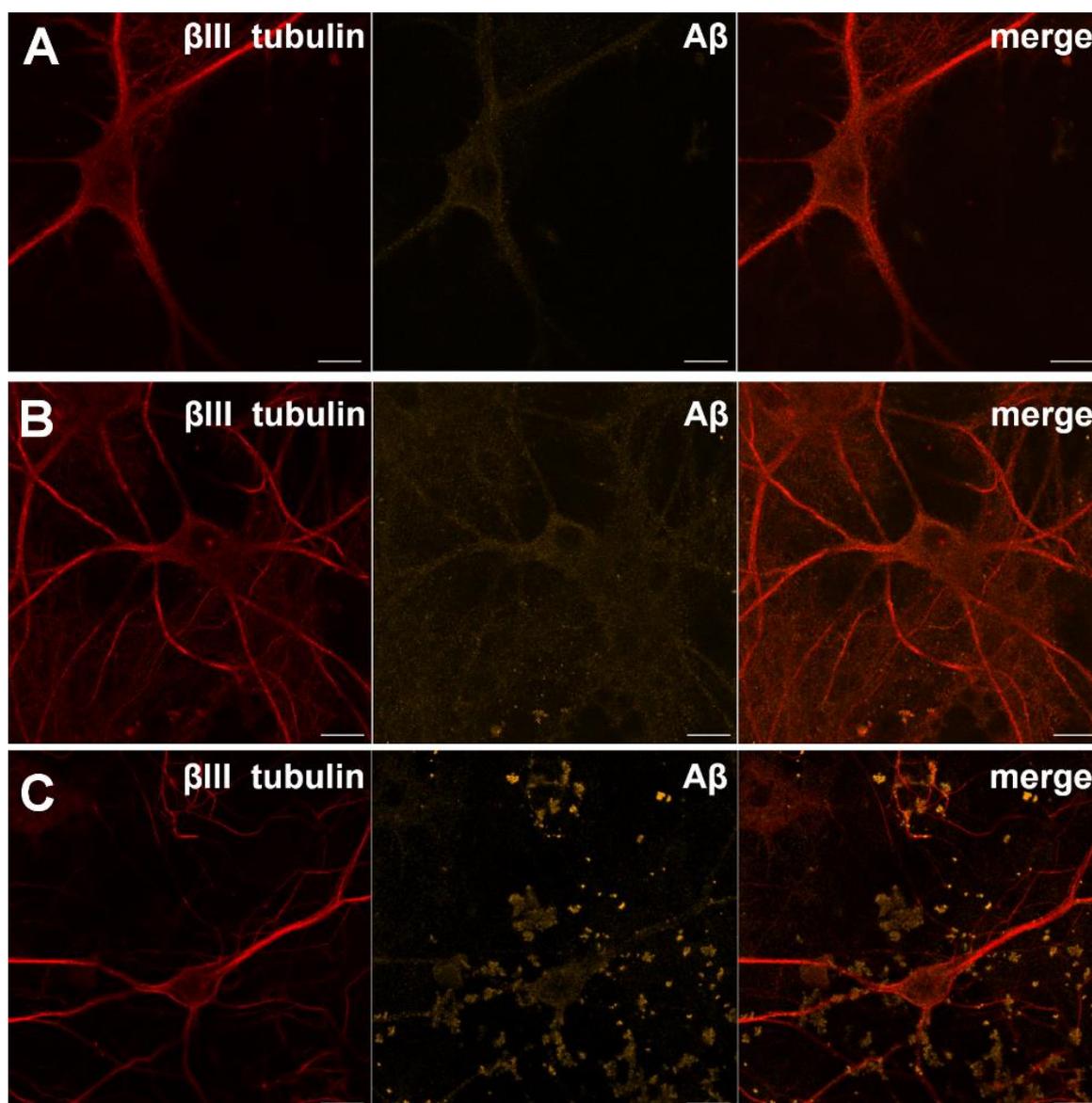


Рисунок 56. Иммуноцитохимическое маркирование А β в первичных культурах клеток гиппокампа на 28 DIV. Красный канал – β III тубулин, желтый канал – β -амилоид. А – интактные культуры, В – первичные культуры с однократной аппликацией А β , С – первичные культуры с хронической аппликацией А β (Mitroshina et al., 2020b)

Для дальнейшего исследования роли гиперэкспрессии BDNF мы выбрали модель хронического использования бета-амилоида, как вызывающую наиболее выраженные нейродегенеративные изменения.

3.2.3.2. Влияние гиперэкспрессии BDNF на морфо-функциональную активность нейрон-глиальных сетей первичных культур гиппокампа при моделировании β -амилоидоза *in vitro*

Схема эксперимента представлена на рис. 57. Для оценки влияния самого векторного конструкта был использован вектор AAV-syn-EGFP, несущий только флуоресцентный белок и не несущий ген BDNF. В качестве положительного контроля применялась хроническая аппликация рекомбинантного белка в культуральную среду ежедневно в концентрации 1 нг/мл с 10 DIV при каждой смене среды.

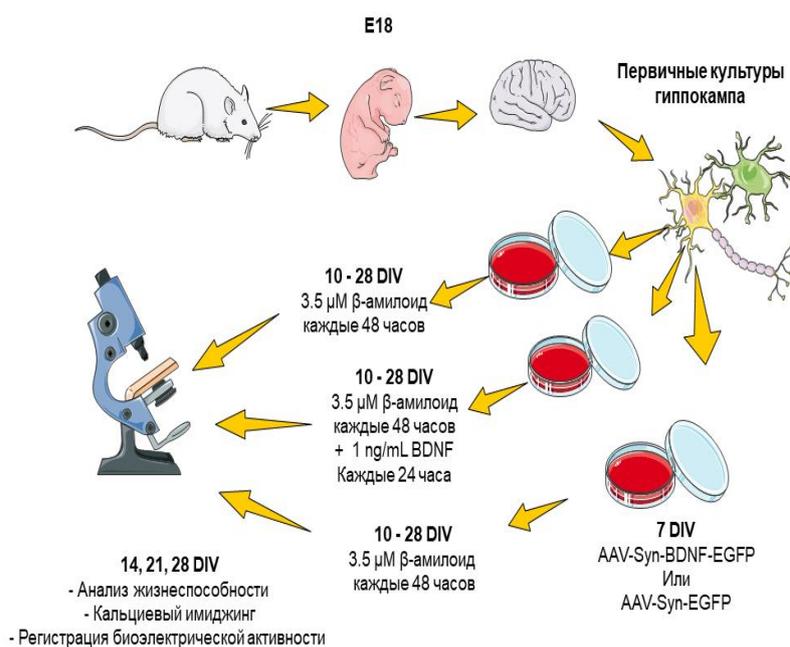


Рисунок 57. Схема эксперимента по исследованию влияния BDNF на морфофункциональное состояние нейрон-глиальных сетей первичных культур клеток гиппокампа *in vitro*

Продemonстрировано нейропротекторное действие нейротрофического фактора головного мозга BDNF при нейродегенеративных процессах, индуцированных β -амилоидом. Применение BDNF как в форме рекомбинантного белка, так и его гиперэкспрессия с помощью аденовирусного вектора поддерживает жизнеспособность клеток (рис. 58А)

Достоверное снижение жизнеспособности нервных клеток при моделировании хронического β -амилоидоза наблюдалось с 21 DIV. Как хроническая аппликация рекомбинантного BDNF, так и его гиперэкспрессия, позволяет поддерживать количество жизнеспособных клеток («Интakтная» - $89,36 \pm 2,06\%$, «A β » $71,40 \pm 5,08\%$, «A β +BDNF» $78,83 \pm 5,82\%$, «A β +AAV-syn-BDNF» $78,57 \pm 3,26\%$, «A β +AAV-syn-EGFP» $70,25 \pm 2,16\%$). На 28 DIV жизнеспособность в группе «A β » снизилась до $64,13 \pm 3,38\%$, а группах с применением BDNF количество жизнеспособных клеток было достоверно выше ($76,96 \pm 2,20\%$ и $72,01 \pm 2,95\%$ соответственно).

Анализ спонтанной кальциевой активности выявил вызванное хронической аппликацией A β достоверное снижение частоты возникновения Ca²⁺ осцилляций и увеличения их длительности к 21 DIV (рис. 58). При этом в группах «A β +BDNF» и «A β +AAV-Syn-BDNF» частота осцилляций была выше чем в группе «A β » (14 DIV - $3,06 \pm 0,029$ осц/мин, $1,94 \pm 0,17$ и $0,41 \pm 0,09$ 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. Контрольный вирус AAV-syn-EGFP не оказывал влияния на жизнеспособность и кальциевую активность клеток первичных культур гиппокампа.

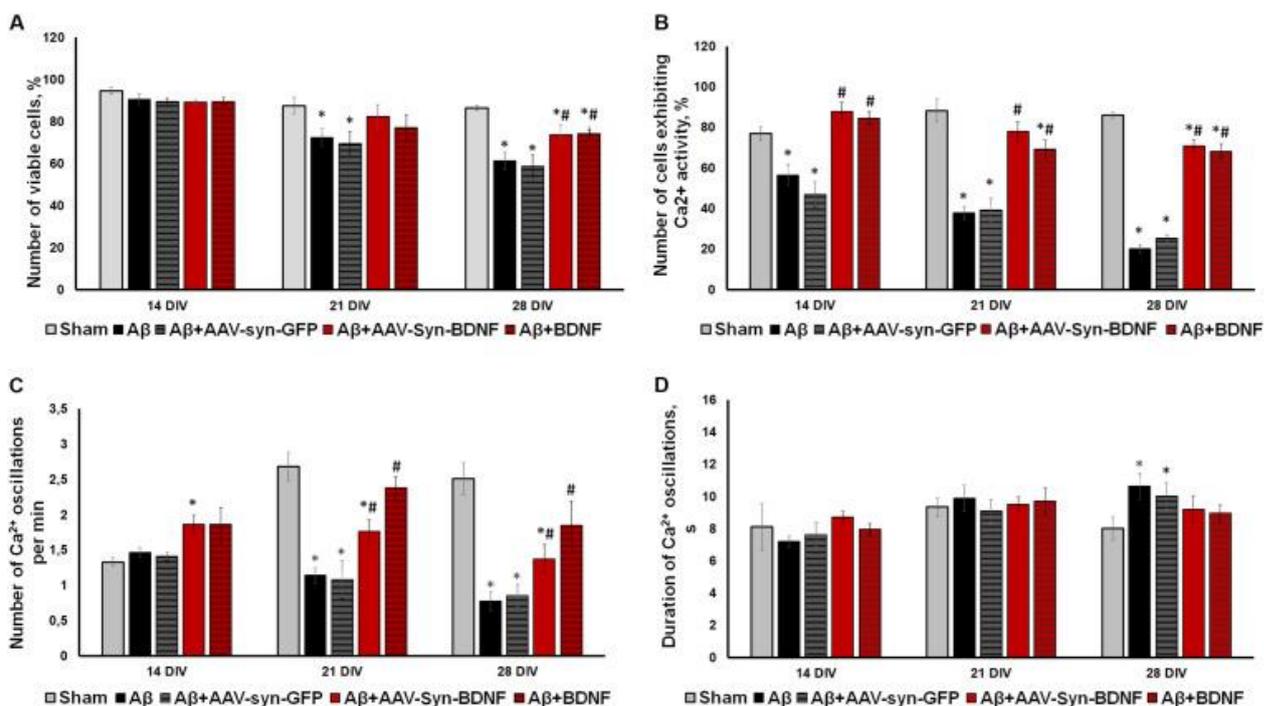


Рисунок 58. А - Анализ жизнеспособности клеток в первичных культурах клеток гиппокампа при экзогенном введении рекомбинантного Aβ и BDNF. (B–D) Основные параметры спонтанной кальциевой активности в первичных культурах клеток гиппокампа при хроническом экзогенном воздействии Aβ и BDNF в процессе развития *in vitro*. (B) Доля клеток, проявляющих Ca²⁺ активность; (C) число колебаний Ca²⁺ в минуту; (D) длительность Ca²⁺ событий, с. * - различия достоверны по сравнению с «Интактные», # по сравнению с «Aβ», $p < 0,05$, ANOVA (Mitroshina et al., 2020b)

Далее был выполнен анализ основных параметров связности, характеризующих воздействие гиперэкспрессии BDNF на кальциевую динамику в нейрон-глиальных сетях при моделировании амилоидоза. Построение корреляционных графов показало, что на 21 DIV при хронической аппликации β-амилоида практически отсутствуют взаимосвязанные сигналы между отдаленными клетками (рис. 59). При хроническом применении рекомбинантного BDNF в группе «βA + BDNF» уровень скоррелированности коллективной кальциевой динамики остался на уровне интактных культур и был достоверно выше по сравнению с группой «βA» (все клетки в культуре

0,61 [0,58; 0,66], соседние клетки 0,74 [0,72; 0,79]) (рис. 60). В группе « β A+AAV-BDNF-eGFP» отмечается снижение скоррелированности сетевой активности относительно уровня интактной группы, однако он сохранялся на достоверно более высоком уровне, чем в группе « β A» (все клетки в культуре 0,47 [0,46; 0,55], соседние клетки 0,58 [0,55; 0,6]).

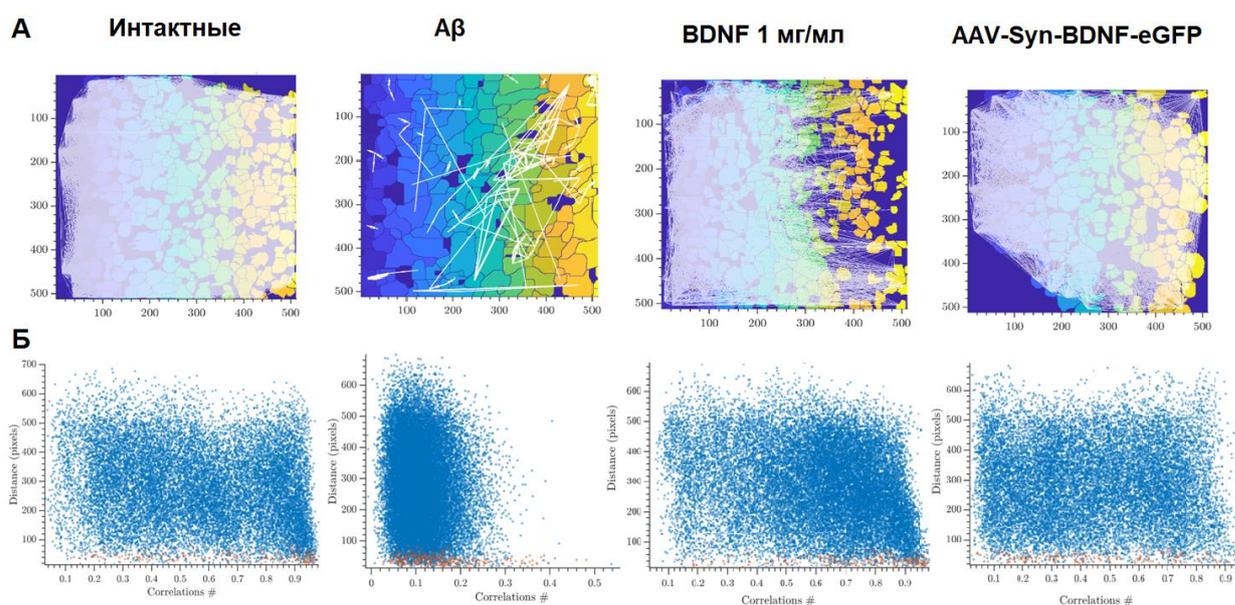


Рисунок 59. А - Репрезентативные примеры изменения корреляционных сетей при хронической аппликации β -амилоида, 21 DIV: белыми линиями (ребра графа) соединены клетки, уровень корреляции активности которых $\geq 0,3$. Б - Зависимость корреляции спонтанных кальциевых осцилляций от расстояния между клетками, красными точками показаны соседние клетки, контактирующие сомами, синими точками – удаленные друг от друга пары клеток

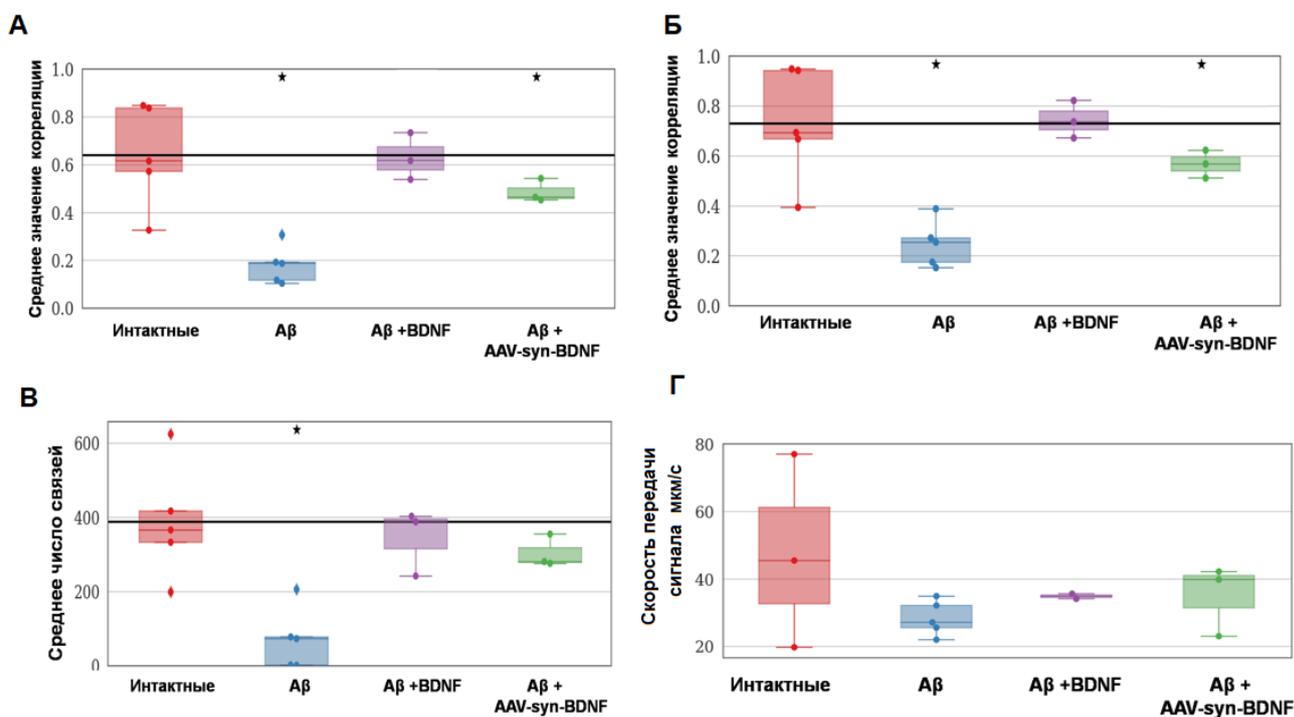


Рисунок 60. Основные параметры, характеризующие коллективную кальциевую динамику в первичных культурах гиппокампа при хронической аппликации β -амилоида. А - Средняя корреляция событий между всеми клетками, Б - Средняя корреляция кальциевых сигналов между соседними клетками, В - Среднее число высокоскоррелированных связей на клетку, Г - Средняя скорость распространения информационной задержки сигнала, 21 DIV, * - различия с интактной группой достоверны, $p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллеса

Таким образом, нами было продемонстрировано нейропротекторное действие нейротрофического фактора головного мозга BDNF при нейродегенеративных процессах, индуцированных β -амилоидом. Как хроническое применение рекомбинантного BDNF, так и трансдукция первичных культур гиппокампа аденовирусным вирусным вектором, содержащим ген BDNF, позволяло предотвратить нарушения функциональной сетевой кальциевой активности при моделировании амилоидоза *in vitro*. Эффект, оказываемые BDNF при обеих исследуемых формах применения сопоставимы по эффективности. Трансдукция

контрольным вирусным вектором AAV-syn-EGFP не оказывала воздействия на первичные культуры клеток гиппокампа.

Далее нами было выполнено исследование влияния гиперэкспрессии BDNF на спонтанную биоэлектрическую активность первичных культур гиппокампа при моделировании амилоидоза как ключевого звена болезни Альцгеймера. Показано, что формирование амилоидных конгломератов приводит к нарушению формирования нейросетевой активности при развитии первичных культур гиппокампа. Это проявляется в достоверном снижении количества сетевых пачек импульсов и числа спайков в них по сравнению с контрольными культурами. Построение сетевых графов выявило упрощение пространственной структуры нейронной сети и уменьшение количества ключевых активных элементов сети - хаббов, снижение числа связей, соединяющих элементы сети (рис. 61, 62). Уже на 14 DIV в группе с хронической аппликацией β -амилоида отмечено достоверное снижение числа спайков в пачке («Интактные» - $382,7 \pm 56,9$, « β -амилоид» - $149,1 \pm 42,2$, $p < 0,05$, repeated ANOVA, табл.1). К 21 дню также отмечается достоверное снижение числа малых сетевых пачек («Интактные» - $217,5 \pm 35,8$, « β -амилоид» - $74,3 \pm 20,8$, $p < 0,05$, repeated ANOVA) (табл. 10).

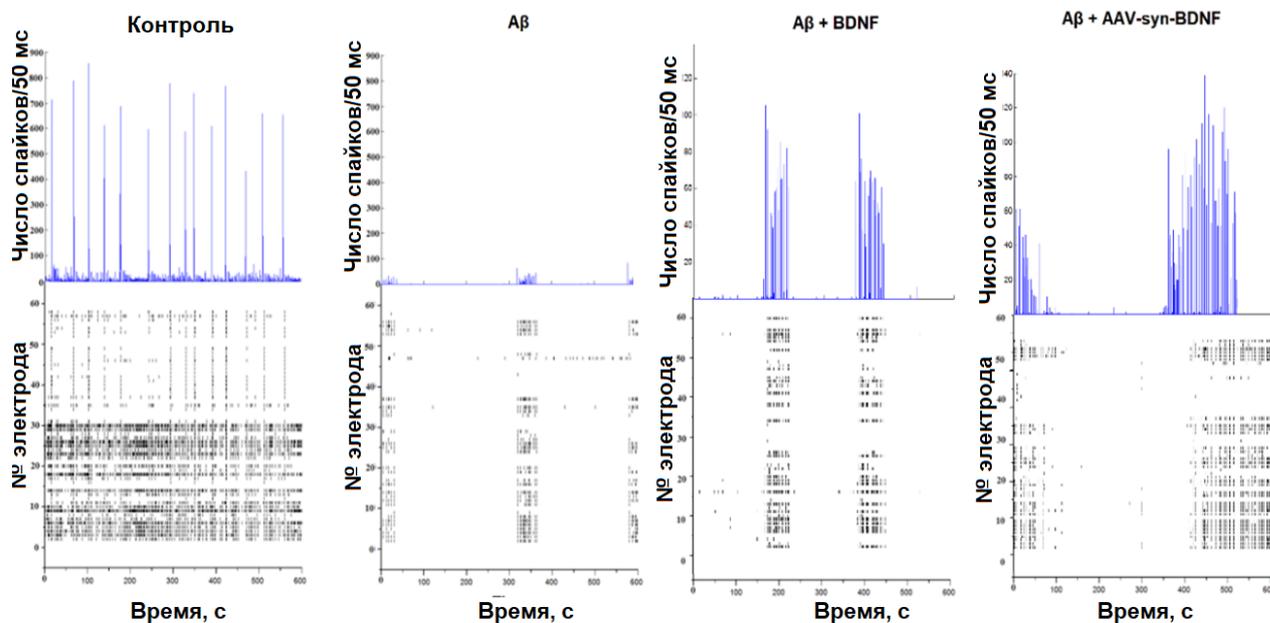


Рисунок 61. Количество спайков за 50 мс (сверху) и характерные растровые диаграммы спонтанной биоэлектрической активности первичных культур клеток гиппокампа на фоне хронического применения β -амилоида, 21 DIV (Mitroshina et al., 2020b)

Применение BDNF позволяло частично предотвратить снижение уровня спонтанной биоэлектрической активности. Количество малых сетевых пачек на 21 DIV в группе «A β +BDNF» ($131,8 \pm 23,54$) было достоверно выше, чем в группе « β -амилоид» ($74,3 \pm 20,8$). Количество спайков в пачке в группах «A β +BDNF» и «A β +AAV-syn-BDNF» не отличалось от показателей интактных культур.

Таблица 10

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

А. Количество малых сетевых пачек/5 мин

День культивирования	Интактные	A β	A β +BDNF	A β +AAV-syn-BDNF
14 DIV	163,2 \pm 28,5	112,8 \pm 31,92	142,1 \pm 32,21	97,6 \pm 35,43
21 DIV	217,5 \pm 35,8	74,3 \pm 20,8*	131,8 \pm 23,54*#	117,9 \pm 24,29*
28 DIV	253,7 \pm 41,3	50,1 \pm 14,71*	175,5 \pm 35,2#	147,3 \pm 42,3*#

Б. Количество спайков в малой сетевой пачке

День культивирования	Интактные	A β	A β +BDNF	A β +AAV-syn-BDNF
14 DIV	382,7 \pm 56,9	149,1 \pm 42,2*	163 \pm 31,48*	172 \pm 51,2*
21 DIV	189,5 \pm 34,7	68,1 \pm 13,2*	157 \pm 40,2#	164 \pm 38,4#
28 DIV	238,5 \pm 24,6	136,1 \pm 31,9*	187,2 \pm 39,6#	200,4 \pm 47,2#

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

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

* - значения достоверны относительно группы «Интактные»; # - значения достоверны относительно группы «A β », § - значения достоверны относительно 3 суток постгипоксического периода, $p < 0.05$, repeated ANOVA (Mitroshina et al., 2020b).

Согласно классической концепции, сетевую пачку должно составлять не менее четырех спайков, одновременно регистрируемых с разных электродов за 50 мс (Wagenaar et al., 2006; Pimashkin et al., 2011; Mitroshina et al., 2022). Однако для более детального анализа сложной функциональной структуры нейронной сети мы выделили события, в которые одновременно вовлекается преобладающую часть функционально активных клеток. В связи с этим все сетевые пачки были условно разделены на малые (от 4 до 100 спайков за 50 мс) и большие (101 или более спайков за 50 мс) (Mishchenko et al., 2019). Было обнаружено, что β -амилоид практически полностью подавляет формирование больших пачек в культурах гиппокампа на ранних этапах развития культур (табл.6 В, рис. 61). В интактной группе культур большие сетевые пачки регистрировались начиная с 14 DIV. В культурах с добавлением А β большие сетевые пачки на 14 и 21 DIV полностью отсутствовали, и были зарегистрированы только на 28 DIV (табл 10 В). При применении нейротрофического фактора головного мозга как в виде рекомбинантного белка, так и в форме вирусного вектора, большие сетевые пачки регистрировались в культурах на 21 DIV.

Выявлено, что хроническая β -амилоидопатия приводит к нарушению формирования внутренней структуры нейронной сети уже на 14 DIV. Наблюдается уменьшение числа связей между элементами сети в 5 раз (табл. 11). Нарушение формирования сетевой активности усугубляется по мере культивирования нервных клеток при хроническом применении β -амилоида, на 21 день культивирования практически отсутствуют активные центры - хабы, не отмечается элементов, формирующих 10 и более связей с соседними, к 28 DIV 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. Количество хабов и число связей, образованных хабами, в культурах групп «А β +BDNF» и «А β +AAV-Syn-BDNF-eGFP» на протяжении

всего срока культивирования не отличалось от параметров интактных культур (табл. 11, рис. 62).

Таблица 11.

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

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

* - различия достоверны относительно группы “Интактные” $p < 0.05$; # - относительно группы “A β ”, $p < 0.05$, repeated ANOVA (Mitroshina et al., 2020b)

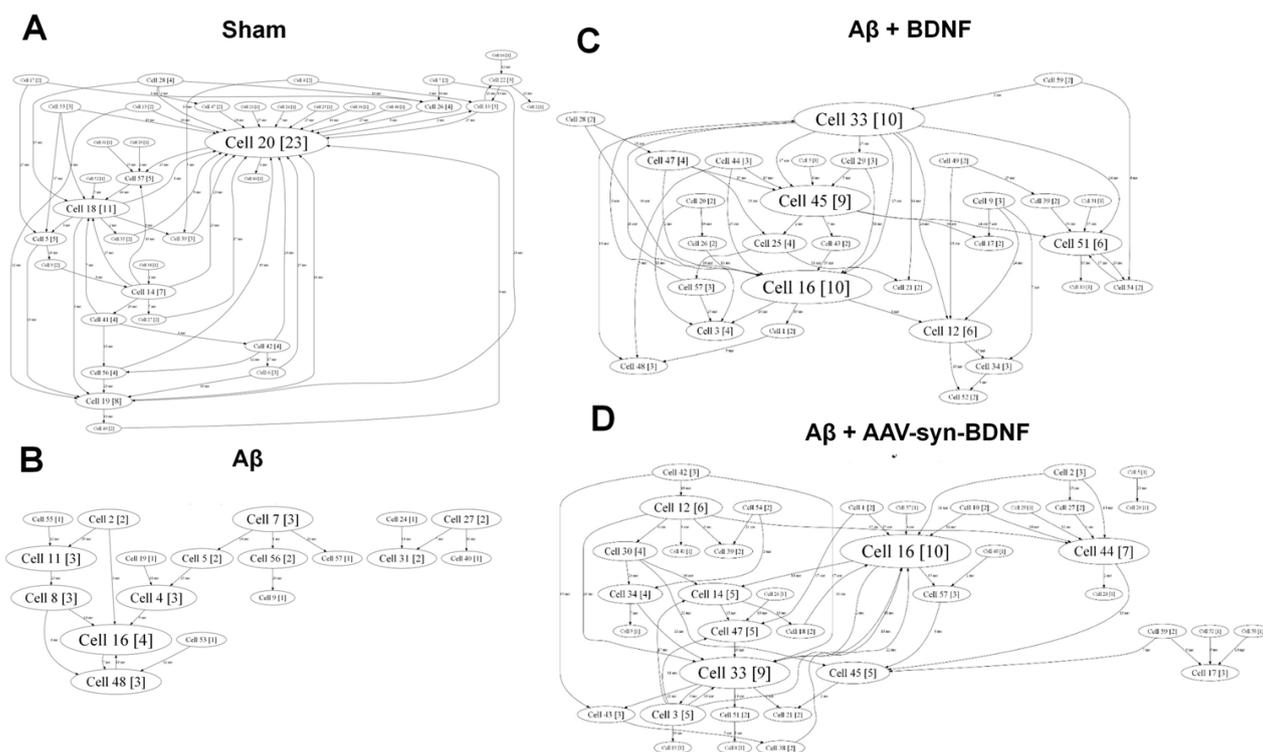


Рисунок 62. Репрезентативное графическое отображение структуры сети первичных культур гиппокампа на 21 DIV (A) – интактная культура; (B) – культура с хронической аппликацией β -амилоида; (C) – хроническая аппликация рекомбинантного BDNF; (D) – гиперэкспрессия BDNF при применении аденовирусного конструкта, полученное с помощью метода кросс-корреляционных графов

Заключение по разделу 3.2

Имеющиеся на сегодняшний день работы, посвященные изучению нейропротекторных эффектов вирусных векторов, содержащих гены нейротрофических факторов, акцентируют внимание преимущественно на параметрах жизнеспособности клеток, объеме ишемического очага (Su, 2011), либо посвящены исследованию индукции нейрогенеза во взрослом мозге (Yu et al., 2013). При этом вопрос функциональной полноценности нервных клеток после воздействия повреждающих факторов оставался не исследованным.

При моделировании острой гипоксии нами показано, что применение AAV-Syn-BDNF-EGFP позволяет не только предотвратить гибель клеток, но и

сохранить основные параметры биоэлектрической активности (число малых сетевых пачек импульсов и количество спайков в пачке), а также функциональную архитектуру нейронных сетей на достаточно высоком уровне вплоть до 7 суток после моделирования гипоксии. Сравнение эффектов, оказываемых гиперэкспрессией BDNF и хроническим применением рекомбинантного BDNF показало сходное влияние обоих способов применения нейротрофина.

В настоящее время существует несколько работ, демонстрирующих, что применение вирусных конструкторов, несущих ген BDNF, стимулируют рост отростков нервных клеток (Ziemlińska et al., 2014; Gao et al., 2016). Эти данные получены на модели травмы спинного мозга и свидетельствуют, что применение генной терапии с BDNF значительно интенсифицирует рост аксонов, как при применении скаффолдов и клеточной терапии, так и просто при инъекции вирусного препарата. Можно предположить, что сходные процессы лежат в основе нейропротекторного действия гиперэкспрессии BDNF при гипоксическом повреждении. Вероятно, AAV-Syn-BDNF-EGFP может индуцировать формирование новых синапсов и восстановление функциональной структуры сети.

Исследование влияния BDNF на нейрон-глиальные сети при моделировании нейродегенеративных процессах на примере модели амилоидоза *in vitro* также продемонстрировала важную роль BDNF в коррекции функциональных изменений активности нейрон-глиальных сетей. Изменения спонтанной активности биоэлектрической нейронной сети при БА изучены на сегодня очень слабо. Имеющиеся данные в основном получены методом patch-clamp и описывают особенности синаптической передачи в отдельных нейронах и синаптических окончаниях (Mondragón-Rodríguez et al., 2018; Lasala et al., 2019), а исследования с использованием многоканальной электроэнцефалографии лишь косвенно описывают активность нейронной сети в моделях БА (Ahnaou et al., 2017). Поэтому полученные нами электрофизиологические данные, характеризующие сетевую активность и

функциональную архитектуру нейронных сетей в модели БА, являются уникальными и представляют большой интерес и могут рассматриваться как фундаментальная основа для дальнейшего изучения активности нейронов при БА. Недавно опубликованное исследование, основанное на записях мультиэлектродных матриц, показало, что одно применение олигомеров Аβ первоначально приводило к активации с последующим дальнейшим (через 12–24 ч) подавлением и десинхронизацией активности нейронной сети, что в конечном итоге приводило к ее разрушению (Gao et al., 2019). В нашей работе мы изучали более пролонгированные эффекты, вызываемые амилоидом, на активность нейронной сети и выявили значительное снижение. Наши результаты согласуются с предыдущими данными экспериментов *in vivo* и исследований, проведенных на срезах мозга, полученных от различных животных моделей БА, что указывает на то, что ранние доклинические стадии БА характеризуются гиперактивацией нейронной активности, тогда как более поздние стадии характеризуются ее подавлением (de Haan et al., 2017; Hegglund et al., 2019).

В используемой нами модели амилоидопатии, основанной на хроническом применении синтетического Аβ42, BDNF показал выраженный нейропротекторный эффект. Применение как рекомбинантного белка BDNF, так и индукция гиперэкспрессии BDNF вектором AAV частично предотвращало эти нейродегенеративные явления, вызванные амилоидопатией. BDNF поддерживал жизнеспособность клеток и спонтанную активность биоэлектрических и кальциевых сетей в первичных культурах гиппокампа. Внутренняя функциональная структура нейронных сетей, включая количество хабов и связей между активными элементами в сети, также частично сохранилась, что позволяет рассматривать увеличение экспрессии BDNF в нейронах с помощью вирусных векторов как перспективный подход к коррекции нейродегенеративных изменений функционирования нейронных сетей.

3.3. Влияние модуляции системы фактора, индуцируемого гипоксией на адаптацию нервных клеток к действию повреждающих факторов

3.3.1. Влияние стабилизации комплекса HIF-1 на морфофункциональное состояние нейрон-глиальных сетей при моделировании гипоксии *in vitro*

Поскольку нами была выявлена взаимосвязь системы нейротрофических факторов и системы транскрипционного фактора, индуцируемых гипоксией, мы исследовали влияние стабилизации комплекса HIF-1 на резистентность нейрон-глиальных сетей к гипоксическому повреждению. Концентрация субъединицы HIF-1a контролируется ферментами семейства пролил-4-гидроксилазного домена PHD, активность которых зависит от концентрации кислорода. В условиях гипоксии, а также в присутствии хелаторов железа HIF-1a не утилизируется с помощью PHD, он накапливается и перемещается в ядро, где в результате димеризации с субъединицей HIF-1b образует активный транскрипционный фактор HIF-1 (Gorres and Raines, 2010). Регуляция активности системы HIF-1 с помощью ингибиторов PHD вызывает большой интерес как новый подход к нейропротекции посредством индукции зависимых от HIF-1 механизмов.

Нами было выполнено исследование влияние Нейроадапта на жизнеспособность клеток первичных культур гиппокампа в нормальных условиях для выявления возможного токсического воздействия соединения на нервные клетки. Однократное внесение ингибитора проводили на 14 день развития культуры *in vitro* (рис. 63). Оценка жизнеспособности клеток проводилась через 7 дней после однократного добавления ингибитора PHD. В качестве контроля использовался растворитель активного вещества ДМСО (15 мкМ).

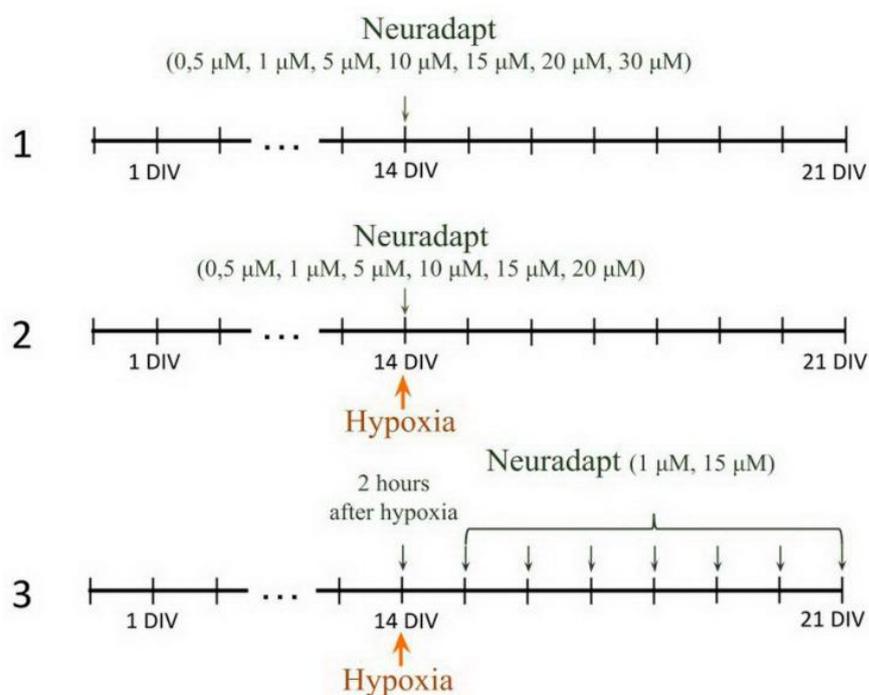


Рисунок 63. Схема исследования влияния ингибирования PHD на устойчивость нейрон-глиальных сетей к повреждающему действию гипоксии *in vitro* (Savyuk et al., 2020)

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* (табл. 12).

Таблица 12.

Оценка жизнеспособности клеток первичных культур гиппокампа на 7 сутки после аппликации ингибитора PHD.

Группа	Жизнеспособность, %
Интактные	91,25±0,75
Контроль (ДМСО)	89,71±1,26
Ингибитор PHD 0,5 μM	93,02±1,65
Ингибитор PHD 1 μM	93,40±1,31
Ингибитор PHD 2 μM	92,49±1,54
Ингибитор PHD 5 μM	90,01±1,55
Ингибитор PHD 10 μM	90,86±1,80

Ингибитор PHD 15 μ M	92,15 \pm 1,78
Ингибитор PHD 20 μ M	89,95 \pm 1,23
Ингибитор PHD 30 μ M	81,06 \pm 2,37*

* - достоверность различий по сравнению с интактной группой, $p < 0,05$, ANOVA, N=5 (Savyuk et al., 2020)

Для исследования влияния Нейроадапта на устойчивость нервных клеток к действию гипоксии 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» на уровне значений интактных культур (табл. 13). При аппликации ингибитора PHD через 2 часа после гипоксии и далее ежедневно жизнеспособность нервных клеток гиппокампа была достоверно выше показателей группы «Гипоксия», однако ниже, чем в группе «Интактная».

Таблица 13.

Анализ жизнеспособности клеток в диссоциированных культурах

гиппокампа в постгипоксический период

Группа	Жизнеспособность, %	Группа	Жизнеспособность, %
Интактные	91,24 \pm 0,75	Гипоксия	73,11 \pm 1,76*
Растворитель (ДМСО)	89,71 \pm 1,26	Гипоксия + ДМСО	81,29 \pm 3,82*
Гипоксия + Нейроадапт 0,5 μ M	91,21 \pm 1,97 [#]	Гипоксия + Нейроадапт 10 μ M	89,37 \pm 2,37 [#]
Гипоксия + Нейроадапт 1 μ M	89,55 \pm 1,75 [#]	Гипоксия + Нейроадапт 15 μ M	92,67 \pm 0,49 [#]

Гипоксия + Нейроадапт 5 μМ	90,43±1,73 [#]	Гипоксия + Нейроадапт 20 μМ	92,78±1,13 [#]
Гипоксия + Нейроадапт 1 μМ через 2 часа после	80,85±1,41*, #	Гипоксия + Нейроадапт 15 μМ через 2 часа после	80,70±1,19*, #

* - достоверность различий по сравнению с интактной группой; # - достоверность различий по сравнению с группой “Гипоксия”, $p < 0,05$, ANOVA, post-hoc критерий Бонферрони, N=6 (Savyuk et al., 2020)

Для оценки влияния активности HIF-1 на процессы реструктуризации нейронглиальных сетей был выполнен кальциевый имиджинг. 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. 64). При аппликации ингибитора RHD 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 RHD в концентрации 15 мкМ как во время моделирования гипоксии, так и в постгипоксическом периоде наблюдается поддержание нормальной длительности кальциевых осцилляций.

Анализ сетевых характеристик кальциевой активности показал, что применение блокатора Нейроадапт в концентрации 15 мкМ во время моделирования гипоксии позволяет сохранить все показатели, характеризующих связанность сети достоверно выше, чем в группе «Гипоксия» (рис. 64, 65). Однако, при применении ингибитора RHD 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».

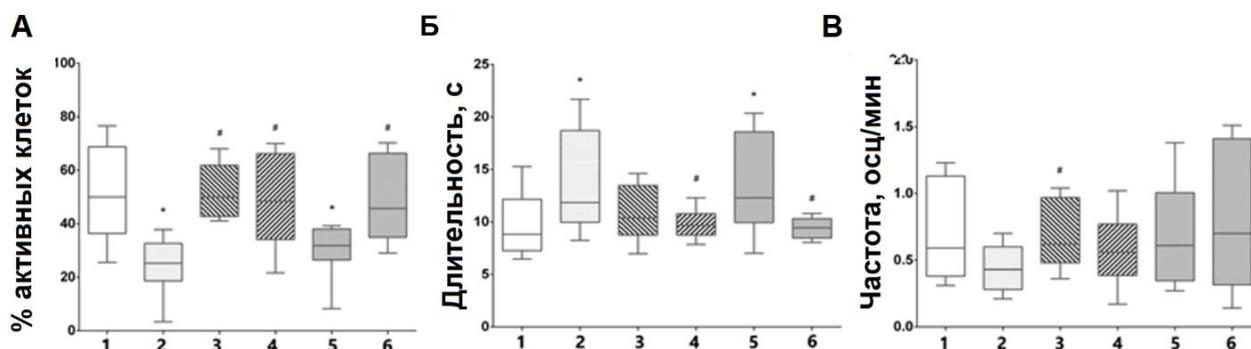


Рисунок 64. Основные параметры кальциевой активности первичных культур гиппокампа на 7 сутки после моделирования гипоксии *in vitro*. А – Доля клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность, Б – Длительность кальциевых осцилляций, В – Частота кальциевых осцилляций. 1 – «Интактные», 2 – «Гипоксия», 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 интактной группой; # - достоверность различий по сравнению с группой «Гипоксия», $p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллеса (по Savyuk et al., 2020, 2021)

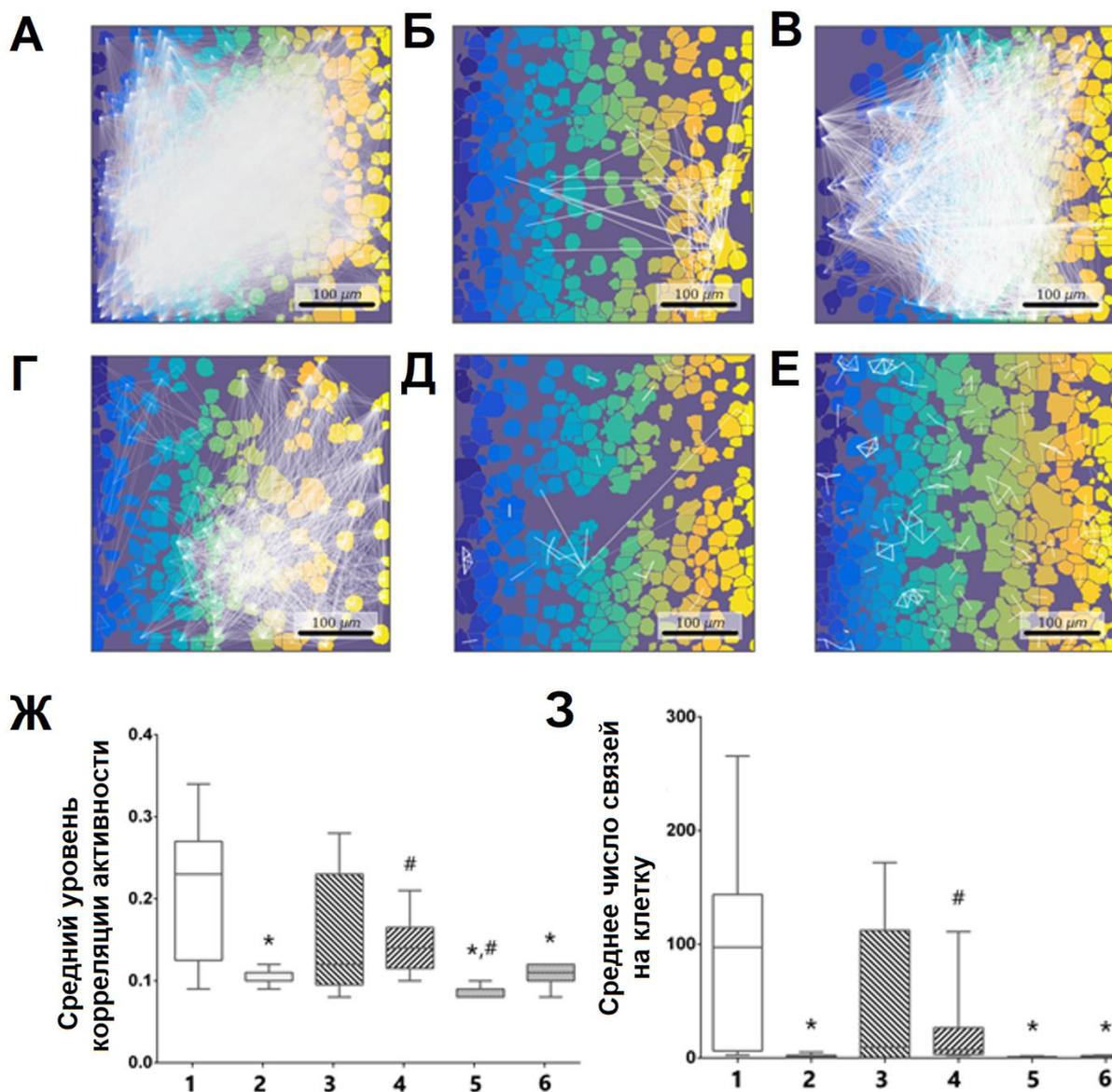


Рисунок 65. А -Е - Репрезентативные примеры изменения корреляционных сетей при хронической аппликации β -амилоида, 21 DIV: белыми линиями (ребра графа) соединены клетки, уровень корреляции активности которых $\geq 0,3$. А – «Интактные», Б – «Гипоксия», В – «Гипоксия + Нейроадапт 1 мкМ», Г – «Гипоксия + 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», 5 – «Гипоксия + Нейроадапт 1 мкМ через 2 часа», 6 – «Гипоксия + Нейроадапт 15 мкМ через 2 часа», * - достоверность различий по сравнению с интактной группой; # - достоверность различий по сравнению с группой «Гипоксия», $p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллеса (по Savyuk et al., 2020, 2021)

В том числе, показано, что при ингибировании PHD с помощью Нейроадапта (1 μM) во время и сразу после моделирования гипоксии число функциональных связей в расчете на 1 клетку составило 9,54 [$0,46 \pm 61,51$], Нейроадапта (15 μM) - 7,30 [$3,27 \pm 16,58$], что достоверно (в 35 и 31,7 раза соответственно) выше, чем в группе «Гипоксия» (рис. 63 З). Наглядно функционально значимые взаимодействия между клетками представлены на рис. 63 А-Е в виде ориентированных графов. Кроме того, аппликация Нейроадапта в концентрации 15 μM позволяла поддерживать уровень корреляции сигнала соседних клеток на достоверно более высоком уровне, чем в группе «Гипоксия» ($0,14 [0,12 \pm 0,14]$).

Таким образом, нами показано, что стабилизация фактора HIF-1 с помощью соединения Нейроадапт позволяет не только сохранить жизнеспособность нервных клеток при моделировании острой гипоксии *in vitro*, но и поддерживать функциональную активность нервных клеток. Применение Нейроадапта непосредственно при моделировании гипоксии позволяло сохранить ключевые сетевые характеристики функциональной кальциевой активности первичных культур нервных клеток гиппокампа, применение в постгипоксическом периоде позволяет сохранить жизнеспособность большого количества элементов нейрон-глиальной сети при потере синхронизации их функциональной кальциевой активности.

3.3.2. Влияние стабилизации комплекса HIF-1 на морфофункциональное состояние нейрон-глиальных сетей при моделировании нейродегенерации *in vitro*

Для исследования влияния стабилизации комплекса HIF-1 α при амилоидопатиях на функциональную нейросетевую активность мы использовали модель с хроническим внесением рекомбинантного β -амилоида в культуральную среду, описанную в разделе 3.2.3.1. Схема эксперимента представлена на рис. 66. Внесение β -амилоида в первичные культуры клеток

гиппокампа выполнялось начиная с 10 дня культивирования в концентрации 3,5 μM при каждой смене среды. Аппликацию Нейроадапта проводили в концентрации 15 μM начиная с 14 дня культивирования при каждой смене среды. Данный срок начала аппликации исследуемого соединения выбран, поскольку начиная с 14 DIV отмечались изменения спонтанной кальциевой активности (раздел 3.2.3.1).

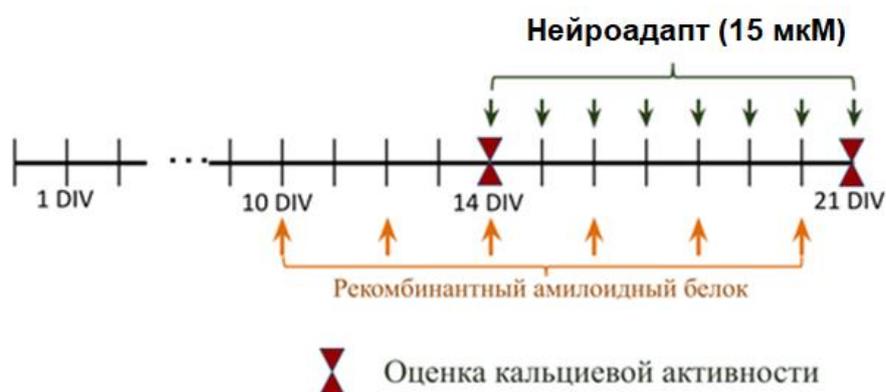


Рисунок 66. Схема исследования влияния ингибирования PND на устойчивость нейрон-глиальных сетей при моделировании β -амилоидоза *in vitro*

При применении Нейроадапта уже на следующие сутки (15 DIV) отмечено сохранение частоты возникновения кальциевых осцилляций ($1,80 \pm 0,22$ осц/мин) (Рис. 67). На 21 DIV число активных клеток ($83,75 \pm 8,13$ %), длительность ($9,44 \pm 0,82$) и частота кальциевых осцилляций ($1,91 \pm 0,12$) также не отличаются от параметров интактной группы и была достоверно выше соответствующих показателей группы «A β ».

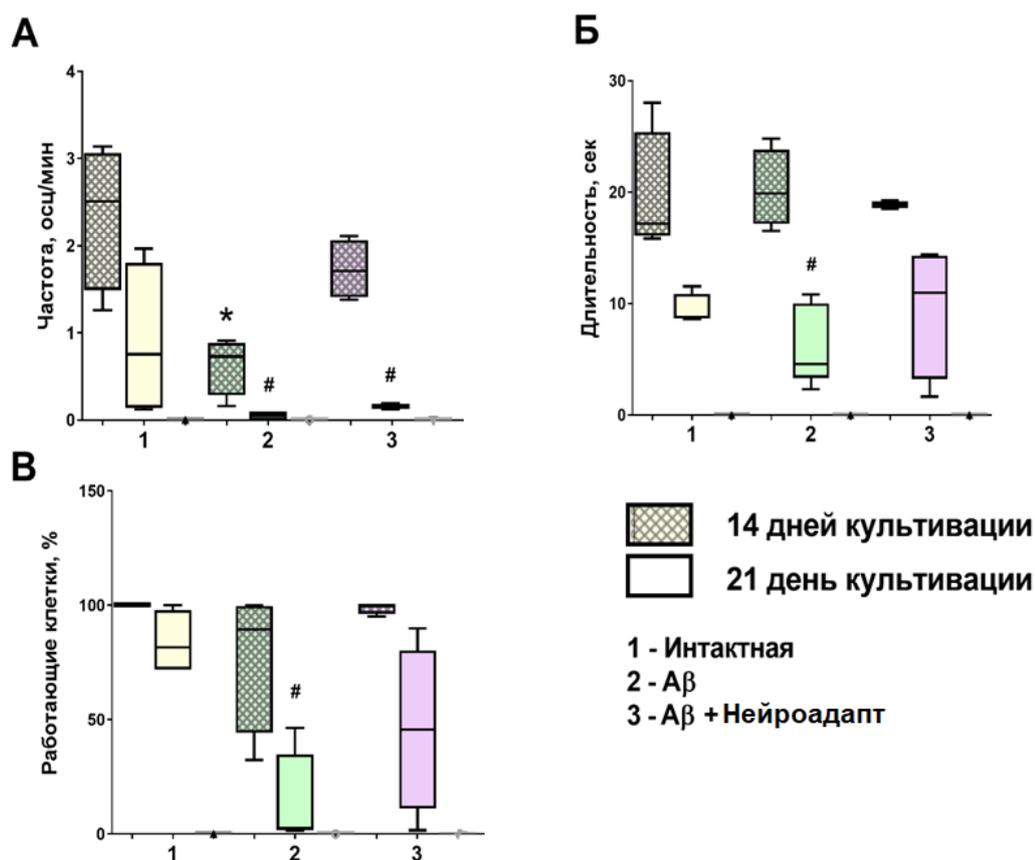


Рисунок 67. Основные параметры кальциевой активности первичных культур клеток гиппокампа при моделировании β -амилоидоза. А – Частота кальциевых осцилляций; Б - Длительность кальциевых осцилляций; В - Клетки, проявляющие спонтанную кальциевую активность. * - достоверность различий по сравнению с интактной группой, # - достоверность различий по сравнению с группой «A β », $p < 0,05$ по критерий Краскела-Уоллеса

Анализ сетевых характеристик кальциевой активности также показал, что стабилизация комплекса NIF-1 положительно влияет на функциональную активность нейрон-глиальных сетей при моделировании β -амилоидоза. Выраженное снижение всех сетевых характеристик в группе «A β » относительно интактной группы наблюдается на 21DIV. В группе «A β + Нейроадапт» уровень корреляции кальциевой активности и число функциональных связей между клетками не отличались от показателей интактных культур (рис. 68).

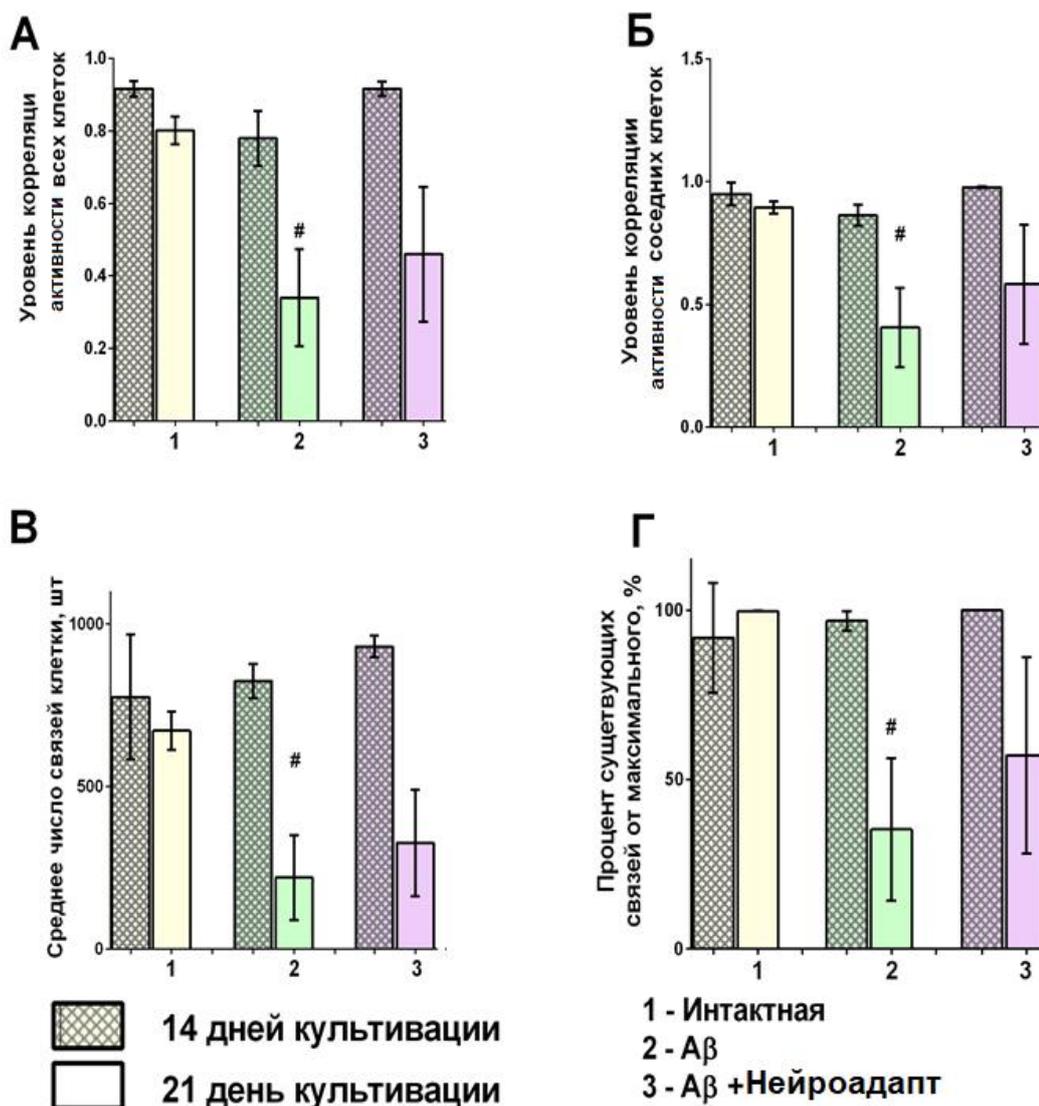


Рисунок 68. Основные параметры, характеризующие связность сети в первичных культурах клеток гиппокампа. А - Средний уровень корреляции Ca^{2+} активности всех клеток; Б - Средний уровень корреляции Ca^{2+} активности соседних клеток; В - Среднее число функциональных связей на одну клетку; Г - Процент скоррелированных связей от общего числа возможных связей, * - достоверность различий по сравнению с интактной группой; # - достоверность различий по сравнению с группой «Аβ», $p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллеса

Визуализация функциональной архитектуры сети представлена на рис. 69. По представленным графам и облакам точек, характеризующим уровень корреляции между парами клеток наглядно видны изменения активности в граффе «Аβ». Достоверно снижается уровень корреляции активности между

как соседними, так и удаленными клетками, снижается число функционально значимых связей на клетку. Применение ингибитора PHD начиная с 14 DIV (Рис. 69 Ж - З) частично сохраняет количество связей между клетками и визуально «расширяет» облако связанных клеток, сдвигая его ближе к уровню интактной группы.

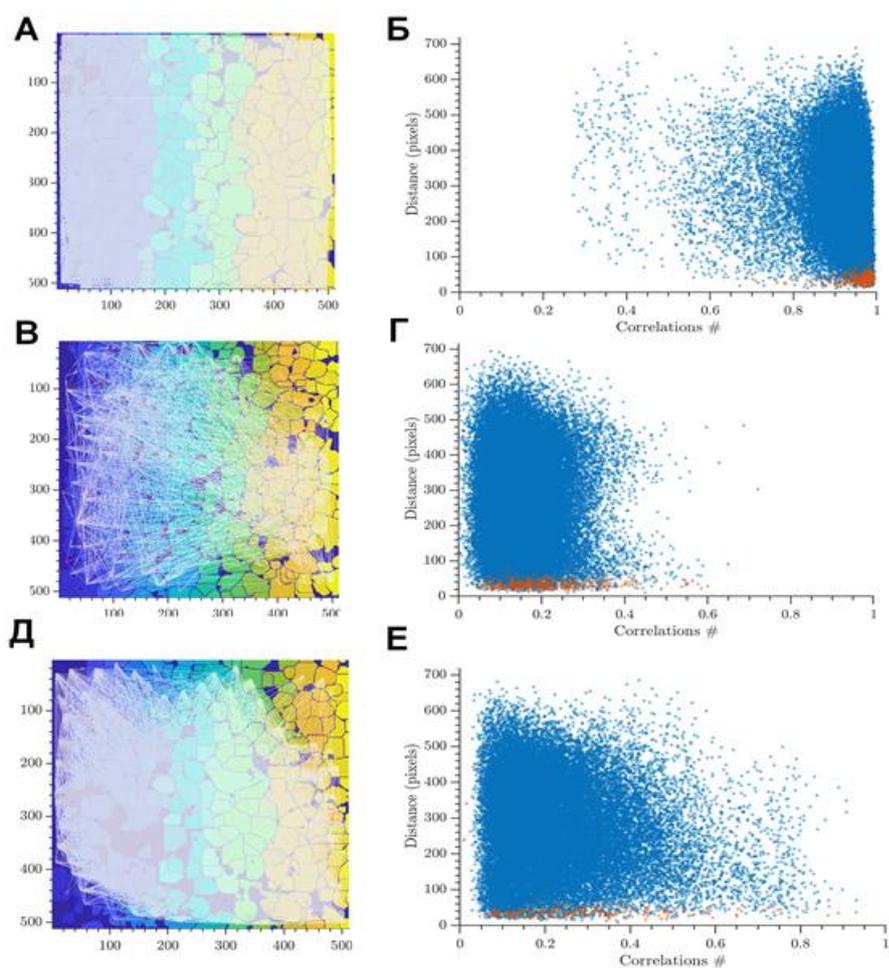


Рисунок 69. Анализ кальциевой активности нейрон-глиальных сетей на 21 день культивации. А, В, Д - Репрезентативные примеры графов корреляционной сети с порогом $> 0,3$ (А - Интактная, В - А β , Д - А β + Нейроадапт); Б, Г, Е - Зависимость корреляций спонтанных кальциевых осцилляций от расстояния между клетками (Б - Интактная, Г - А β , Е - А β + Нейроадапт)

Стабилизация фактора HIF-1 с помощью Нейроадапта позволяет частично сохранить функциональную сетевую активность при аппликации после развития первых изменения кальциевой активности при моделировании БА (4 сутки после начала применения β -амилоида), но не оказывает значимого эффекта при аппликации одновременно с началом аппликации А β .

Заключение по разделу 3.3.

Открытие фактора HIF-1 как ключевого компонента системы адаптации клетки к гипоксическому повреждению вызвало большой интерес к разработке методов увеличения продукции или стабилизации комплекса HIF-1 для защиты клетки. Одним из перспективных подходов является фармакологическое ингибирование фермента PHD, отвечающего за деградацию субъединицы HIF-1 α , с целью коррекции последствий ишемического инсульта (Davis et al., 2018; Singh et al., 2020). Однако активация HIF-1 после гипоксического или ишемического повреждения при использовании ингибиторов PHD остается дискуссионным подходом и может как способствовать адаптации нервных клеток, так и напротив усугублять повреждения в зависимости от тяжести, продолжительности инсульта, а также длительности активации HIF (Chen et al., 2018).

Наша работа свидетельствует о том, что использование Нейроадапта - селективного ингибитора нейронального подтипа PHD2 - позволяет сохранять жизнеспособность клеток не только при превентивном применении, но и при использовании в постгипоксическом периоде. Также стабилизация комплекса HIF-1 с помощью Нейроадапта позволяла поддерживать высокий уровень метаболической кальциевой активности нейрон-глиальных сетей клеток гиппокампа. Следует отметить, что даже при сохранении таких параметров, как число активных клеток и частота кальциевых осцилляций, могут быть нарушены функциональные взаимосвязи между клетками и утрачена сетевая связность, что мы наблюдаем при применении ингибитора в постгипоксическом периоде. Однако можно предположить, что подобные

изменения могут носить обратимый характер, и быть связаны с временным снижением синаптической активности (Fedorovich et al., 2017), что требует дальнейшего изучения.

Поскольку гипоксия является важным патогенетическим звеном и причиной гибели нейронов при различных нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, Паркинсона и др. (Hwang et al., 2019; Solis et al., 2020; Calabrò et al., 2021), представляется чрезвычайно важным исследование роли HIF-1 при развитии нейродегенеративных процессов. В настоящее время данных о роли фактора, индуцированного гипоксией, в развитии данных заболеваний имеется крайне мало. В работе (Schubert et al., 2009) показано, что вызванная бета-амилоидом активация астроцитов приводит к длительному снижению экспрессии HIF-1 α и снижению скорости гликолиза. При этом поддержание уровня HIF-1 α позволяло снизить активацию глиальных клеток и гликолитические изменения. Имеются данные о том, что снижение уровня HIF-1 α в головном мозге у пациентов с БА связано со снижением регуляции транспортеров глюкозы GLUT-1 и GLUT-3 по сравнению с контрольной группой людей того же возраста, что приводит к ухудшению поглощения и метаболизма глюкозы и нейрональной дегенерации (Ashok et al., 2017).

Наше исследование продемонстрировано, что стабилизация комплекса HIF-1 α оказывает нейропротекторное действие на нейросетевую кальциевую активность и поддерживает жизнеспособность нервных клеток. Известно, что HIF-1 α может уменьшать токсическое действие A β , ингибирует гиперфосфорилирование тау и способствует активации микроглии, но с другой стороны он усиливает процессинг предшественника амилоида APP и следовательно образование A β , поскольку активирует β / γ -секретазы и подавляет α -секретазы, инактивирует микроглию и снижает их активность, что способствует патогенезу БА (Baik et al., 2019; Wang et al., 2021). Полученные нами новые данные о роли HIF-1 в поддержании активности

нейрон-глиальных сетей открывают перспективу для дальнейшего исследования возможной роли фактора HIF-1 в развитии БА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования убедительно продемонстрировали, что нейротрофические факторы BDNF и GDNF обладают выраженным нейропротекторным действием при моделировании повреждающих факторов ишемии. Обнаружено, что при моделировании изолированных факторов ишемического повреждения эффективность их применения отличается. Это обусловлено различиями в молекулярно-клеточных механизмах действия каждого из исследуемых нейротрофических факторов. Полученные данные свидетельствуют, что BDNF оказывает наиболее выраженный защитный эффект при моделировании гипоксии и полного 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 молекулярно-клеточных механизмов действия нейротрофических факторов BDNF и GDNF. Исследована роль ключевых представителей нейронального киннома, 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 реализации действия BDNF значимую роль играет так же и MAPK/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 IKK β , напротив, участвует преимущественно в реализации защитного действия BDNF. Вероятным механизмом этого действия является участие этой киназы в активации комплекса транскрипционного фактора NF- κ B (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 мРНК 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-1а.

Схема предполагаемого взаимодействия исследуемых биоактивных молекул представлена на рис. 70.

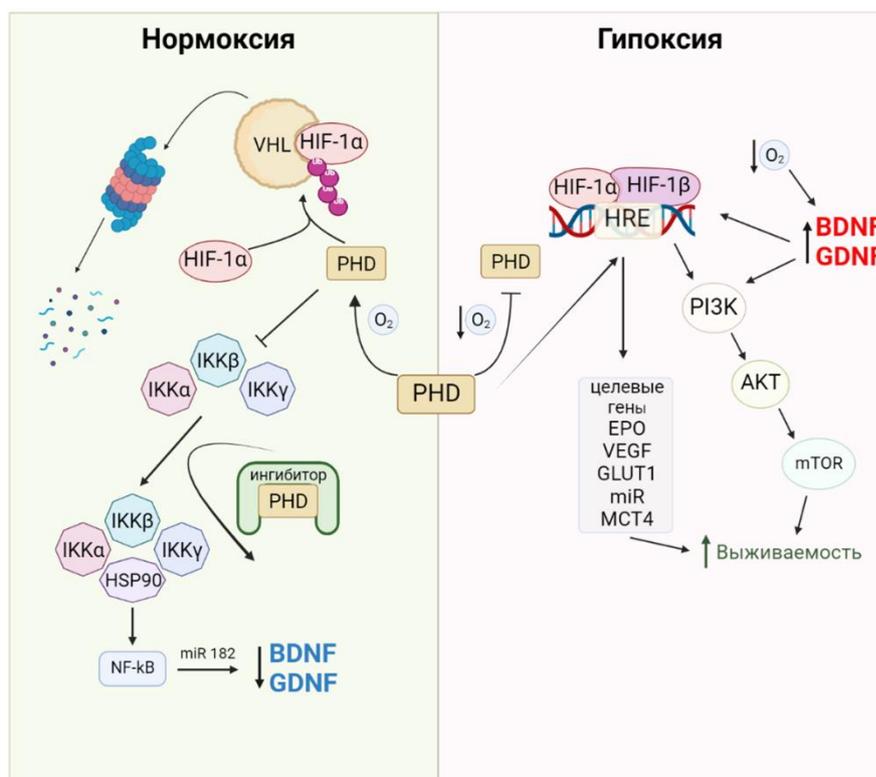


Рисунок 70. Схема молекулярных каскадов, обуславливающих взаимодействие системы нейротрофических факторов и HIF-1

Поскольку BDNF наиболее эффективно поддерживал жизнеспособность нервных клеток первичных культур гиппокампа при моделировании гипоксии

и ишемия-подобных условий, 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 высокий потенциал применения исследуемого нейротрофического фактора в качестве агента для генной терапии нейродегенеративных процессов в ЦНС.

На заключительном этапе работы показано, что стабилизация комплекса NIF-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 IKK β 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 мРНК BDNF, а также снижает уровень экспрессии рецептора TrkB. Аппликация BDNF (1нг/мл) приводит к снижению экспрессии мРНК 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 мРНК 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 нейрон-глиальной сети, но не коллективную синхронизированную кальциевую динамику.

Список цитированной литературы

1. Агаджанян Н.А. Функции организма в условиях гипоксии и гиперкапнии. Н.А. Агаджанян, А.И. Ефимов М: Медицина, 1986. 272с.
2. Ведунова М.В., Тимашев П.С., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Королева А.В, Чичков Б.Н., и др. (2016а). Формирование нейронных сетей на трехмерных матриксах, полученных методом лазерной микростереолитографии. Клеточные Технологии В Биологии И Медицине, 138–144.
3. Ведунова М.В., Шишкина Т.В., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Астраханова Т.А., Пимашкин А.С. и др. (2016b). Нейропротективное и антигипоксическое действие глиального нейротрофического фактора (GDNF) при моделировании гипоксии в культурах диссоциированных клеток гиппокампа. Клеточные технологии в биологии и медицине, 33–39.
4. Гладков А.А., Ведунова М.В., Коротченко С.А., Захаров Ю.Н., Балашова А.Н., Мухина И.В. (2011). Развитие пространственно-временной структуры нейронной сети гиппокампа. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, 243-248.
5. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. Мозговой нейротрофический фактор и его низкомолекулярные миметики. (2017). Фармакокинетика и фармакодинамика, 3–1.
6. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина, 2001. 327 с.
7. Лукьянова Л.Д. Сигнальные механизмы гипоксии. М: РАН, 2019. 215 с.
8. Лукьянова Л.Д., Дубченко А.М., Чернобаева Г.Н. Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция. М., 1999.
9. Митрошина, Е. В., Мищенко, Т. А., Шишкина, Т. В., Ведунова, М. В. (2019). Роль нейротрофических факторов BDNF И GDNF в адаптации нервной системы к действию факторов ишемии. Клеточные Технологии В Биологии И Медицине, 121–127.

10. Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Шишкина Т.В., Ведунова М.В. (2018). Антиоксидантные свойства глиального нейротрофического фактора головного мозга. Бюллетень Экспериментальной Биологии И Медицины 166, 257–260.
11. Мищенко, Т. А., Митрошина, Е. В., Шишкина, Т. В., Астраханова, Т. А., Прохорова, М. В., Ведунова, М. В. (2018). Применение методики прижизненного детектирования экспрессии мРНК в сочетании с кальциевым имиджингом для исследования нейросетевой активности *in vitro*. Биологические Мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии, 104–114. Doi: 10.7868/S0233475518020020.
12. Сосудистые заболевания головного мозга: Руководство для врачей. Под ред. Е.И. Гусева. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 688 с
13. Широкова, О., Фрумкина, Л., Ведунова, М., Митрошина, Е., Захаров, Ю., Хаспеков, Л., с соавт. (2013). Морфофункциональные закономерности развития нейронных сетей в диссоциированных культурах клеток гиппокампа. Современные Технологии В Медицине 5, 6–13.
14. Abdel-latif, R. G., Rifaai, R. A., and Amin, E. F. (2020). Empagliflozin alleviates neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury through HIF-1 α /VEGF signaling pathway. Arch Pharm Res 43, 514–525. doi: 10.1007/s12272-020-01237-y.
15. Abe, H., Kajitani, N., Okada-Tsuchioka, M., Omori, W., Yatsumoto, M., and Takebayashi, M. (2019). Antidepressant amitriptyline-induced matrix metalloproteinase-9 activation is mediated by Src family tyrosine kinase, which leads to glial cell line-derived neurotrophic factor mRNA expression in rat astroglial cells. Neuropsychopharmacol Rep 39, 156–163. doi: 10.1002/npr2.12055.
16. Abe, H., Semba, H., and Takeda, N. (2017). The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. J Atheroscler Thromb 24, 884–894. doi: 10.5551/jat.RV17009.

17. Agatonovic-Kustrin, S., and Beresford, R. (2000). Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J Pharm Biomed Anal* 22, 717–727. doi: 10.1016/S0731-7085(99)00272-1.
18. Ahmad, A., Patel, V., Xiao, J., and Khan, M. M. (2020). The Role of Neurovascular System in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 57, 4373–4393. doi: 10.1007/s12035-020-02023-z.
19. Ahnaou, A., Moechars, D., Raeymaekers, L., Biermans, R., Manyakov, N. v., Bottelbergs, A., et al. (2017). Emergence of early alterations in network oscillations and functional connectivity in a tau seeding mouse model of Alzheimer's disease pathology. *Sci Rep* 7, 14189. doi: 10.1038/s41598-017-13839-6.
20. Airavaara, M., Pletnikova, O., Doyle, M. E., Zhang, Y. E., Troncoso, J. C., and Liu, Q.-R. (2011). Identification of Novel GDNF Isoforms and cis-Antisense GDNFOS Gene and Their Regulation in Human Middle Temporal Gyrus of Alzheimer Disease. *Journal of Biological Chemistry* 286, 45093–45102. doi: 10.1074/jbc.M111.310250.
21. Akakura, N., Kobayashi, M., Horiuchi, I., Suzuki, A., Wang, J., Chen, J., et al. (2001). Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res* 61, 6548–54.
22. Aleyasin, H., Karuppagounder, S. S., Kumar, A., Sleiman, S., Basso, M., Ma, T., et al. (2015). Antihelminthic Benzimidazoles Are Novel HIF Activators That Prevent Oxidative Neuronal Death via Binding to Tubulin. *Antioxid Redox Signal* 22, 121–134. doi: 10.1089/ars.2013.5595.
23. Almeida, R. D., Manadas, B. J., Melo, C. v, Gomes, J. R., Mendes, C. S., Grãos, M. M., et al. (2005). Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ* 12, 1329–1343. doi: 10.1038/sj.cdd.4401662.
24. Alvarez, X. A., Alvarez, I., Iglesias, O., Crespo, I., Figueroa, J., Aleixandre, M., et al. (2016). Synergistic Increase of Serum BDNF in Alzheimer

Patients Treated with Cerebrolysin and Donepezil: Association with Cognitive Improvement in ApoE4 Cases. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, pyw024. doi: 10.1093/ijnp/pyw024.

25. Aly, A. E.-E., Harmon, B. T., Padegimas, L., Sesenoglu-Laird, O., Cooper, M. J., and Waszczak, B. L. (2019). Intranasal Delivery of pGDNF DNA Nanoparticles Provides Neuroprotection in the Rat 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol* 56, 688–701. doi: 10.1007/s12035-018-1109-6.

26. An, W. G., Kanekal, M., Simon, M. C., Maltepe, E., Blagosklonny, M. v., and Neckers, L. M. (1998). Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 α . *Nature* 392, 405–408. doi: 10.1038/32925.

27. Angelopoulou, E., and Piperi, C. (2019). Beneficial Effects of Fingolimod in Alzheimer's Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Neuromolecular Med* 21, 227–238. doi: 10.1007/s12017-019-08558-2.

28. Angelucci, F., Čechová, K., Průša, R., and Hort, J. (2019). Amyloid beta soluble forms and plasminogen activation system in Alzheimer's disease: Consequences on extracellular maturation of brain-derived neurotrophic factor and therapeutic implications. *CNS Neurosci Ther* 25, 303–313. doi: 10.1111/cns.13082.

29. Arancibia, S., Silhol, M., Moulière, F., Meffre, J., Höllinger, I., Maurice, T., et al. (2008). Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. *Neurobiol Dis* 31, 316–326. doi: 10.1016/j.nbd.2008.05.012.

30. Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., and Haydon, P. G. (1998). Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience* 10, 2129–2142. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00221.x.

31. Arora, S., Kanekiyo, T., and Singh, J. (2022). Functionalized nanoparticles for brain targeted BDNF gene therapy to rescue Alzheimer's disease pathology in transgenic mouse model. *Int J Biol Macromol* 208, 901–911. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.203.

32. Ashok, B. S., Ajith, T. A., and Sivanesan, S. (2017). Hypoxia-inducible factors as neuroprotective agent in Alzheimer's disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 44, 327–334. doi: 10.1111/1440-1681.12717.
33. Astrakhanova, T. A., Urazov, M. D., Usenko, A. V., Mitroshina, E. V., Mishchenko, T. A., Schelchkova, N. A., et al. (2018). BDNF-Mediated Regulation of the Brain Mitochondria Functional State in Hypoxia. *Sovremennye tehnologii v medicine* 10, 88. doi: 10.17691/stm2018.10.3.10.
34. Azevedo, P. N., Zanirati, G., Venturin, G. T., Schu, G. G., Durán–Carabali, L. E., Odorcyk, F. K., et al. (2020). Long-term changes in metabolic brain network drive memory impairments in rats following neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Learn Mem* 171, 107207. doi: 10.1016/j.nlm.2020.107207.
35. B. Marcu, K., Otero, M., Olivotto, E., Maria Borzi, R., and B. Goldring, M. (2010). NF- κ B Signaling: Multiple Angles to Target OA. *Curr Drug Targets* 11, 599–613. doi: 10.2174/138945010791011938.
36. Baik, S. H., Kang, S., Lee, W., Choi, H., Chung, S., Kim, J.-I., et al. (2019). A Breakdown in Metabolic Reprogramming Causes Microglia Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Cell Metab* 30, 493-507.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2019.06.005.
37. Balu, D. T., Pantazopoulos, H., Huang, C. C. Y., Muszynski, K., Harvey, T. L., Uno, Y., et al. (2019). Neurotoxic astrocytes express the d-serine synthesizing enzyme, serine racemase, in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 130, 104511. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104511.
38. Banerjee, P. S., Lagerlöf, O., and Hart, G. W. (2016). Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Mol Aspects Med* 51, 1–15. doi: 10.1016/j.mam.2016.05.005.
39. Bao, F., Kang, X., Xie, Q., and Wu, J. (2018). HIF α /PKM2 and PI3K/AKT pathways involved in the protection by dexmedetomidine against isoflurane or bupivacaine induced apoptosis in hippocampal neuronal HT22 cells. *Exp Ther Med*. doi: 10.3892/etm.2018.6956.

40. Barage, S. H., and Sonawane, K. D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* 52, 1–18. doi: 10.1016/j.npep.2015.06.008.
41. Baranova, O., Miranda, L. F., Pichiule, P., Dragatsis, I., Johnson, R. S., and Chavez, J. C. (2007). Neuron-Specific Inactivation of the Hypoxia Inducible Factor 1 Increases Brain Injury in a Mouse Model of Transient Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Neuroscience* 27, 6320–6332. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0449-07.2007.
42. Barreto, G., White, R. E., Ouyang, Y., Xu, L., and Giffard, R. G. (2011). Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 11, 164–73. doi: 10.2174/187152411796011303.
43. Barros, L. F., San Martín, A., Ruminot, I., Sandoval, P. Y., Fernández-Moncada, I., Baeza-Lehnert, F., et al. (2017). Near-critical GLUT1 and Neurodegeneration. *J Neurosci Res* 95, 2267–2274. doi: 10.1002/jnr.23998.
44. Barry, S. M., and McGinty, J. F. (2017). Role of Src Family Kinases in BDNF-Mediated Suppression of Cocaine-Seeking and Prevention of Cocaine-Induced ERK, GluN2A, and GluN2B Dephosphorylation in the Prelimbic Cortex. *Neuropsychopharmacology* 42, 1972–1980. doi: 10.1038/npp.2017.114.
45. Barteczek, P., Li, L., Ernst, A.-S., Böhler, L.-I., Marti, H. H., and Kunze, R. (2017). Neuronal HIF-1 α and HIF-2 α deficiency improves neuronal survival and sensorimotor function in the early acute phase after ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 37, 291–306. doi: 10.1177/0271678X15624933.
46. Bathina, S., and Das, U. N. (2015). Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Archives of Medical Science* 6, 1164–1178. doi: 10.5114/aoms.2015.56342.
47. Bazargani, N., and Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat Neurosci* 19, 182–189. doi: 10.1038/nn.4201.
48. Becker, K., Siegert, S., Toliat, M. R., Du, J., Casper, R., Dolmans, G. H., et al. (2016). Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies and Network

Analysis-Based Integration with Gene Expression Data Identify New Suggestive Loci and Unravel a Wnt-Centric Network Associated with Dupuytren's Disease. *PLoS One* 11, e0158101. doi: 10.1371/journal.pone.0158101.

49. Behrendt, T., Bielitzki, R., Behrens, M., Herold, F., and Schega, L. (2022). Effects of Intermittent Hypoxia–Hyperoxia on Performance- and Health-Related Outcomes in Humans: A Systematic Review. *Sports Med Open* 8, 70. doi: 10.1186/s40798-022-00450-x.

50. Bédot, Y., Mossiat, C., Giroud, M., Prigent-Tessier, A., and Marie, C. (2011). Circulating and Brain BDNF Levels in Stroke Rats. Relevance to Clinical Studies. *PLoS One* 6, e29405. doi: 10.1371/journal.pone.0029405.

51. Beker, M., Caglayan, A. B., Beker, M. C., Altunay, S., Karacay, R., Dalay, A., et al. (2020). Lentivirally administered glial cell line-derived neurotrophic factor promotes post-ischemic neurological recovery, brain remodeling and contralesional pyramidal tract plasticity by regulating axonal growth inhibitors and guidance proteins. *Exp Neurol* 331, 113364. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113364.

52. Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P. J. (2011). Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metab* 14, 724–738. doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.016.

53. Benarroch, E. E. (2015). Brain-derived neurotrophic factor: Regulation, effects, and potential clinical relevance. *Neurology* 84, 1693–1704. doi: 10.1212/WNL.0000000000001507.

54. Berdugo-Vega, G., Arias-Gil, G., López-Fernández, A., Artegiani, B., Wasielewska, J. M., Lee, C.-C., et al. (2020). Increasing neurogenesis refines hippocampal activity rejuvenating navigational learning strategies and contextual memory throughout life. *Nat Commun* 11, 135. doi: 10.1038/s41467-019-14026-z.

55. Bergeron, M., Gidday, J. M., Yu, A. Y., Semenza, G. L., Ferriero, D. M., and Sharp, F. R. (2000). Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol* 48, 285–296. doi: 10.1002/1531-8249(200009)48:3<285::AID-ANA2>3.0.CO;2-8.

56. Berne, R. M. *Physiology*. R. M. Berne, M. N. Levy, B.M. Koeppen, B. A. Stanton. 4 edition. USA: Mosby, 1998. 1131.
57. Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J. L., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pilati, E., et al. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7, 613–620. doi: 10.1038/nn1246.
58. Bilkei-Gorzo, A. (2014). Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* 142, 244–257. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.12.009.
59. Black, S., Kraemer, K., Shah, A., Simpson, G., Scogin, F., and Smith, A. (2018). Diabetes, Depression, and Cognition: a Recursive Cycle of Cognitive Dysfunction and Glycemic Dysregulation. *Curr Diab Rep* 18, 118. doi: 10.1007/s11892-018-1079-0.
60. Blennerhassett, M. G., and Lourenssen, S. R. (2022). Obligatory Activation of SRC and JNK by GDNF for Survival and Axonal Outgrowth of Postnatal Intestinal Neurons. *Cell Mol Neurobiol* 42, 1569–1583. doi: 10.1007/s10571-021-01048-9.
61. Bock, D. E., Poole, S. M., and Joseph, M. (2014). Does branding impact student recruitment: a critical evaluation. *Journal of Marketing for Higher Education* 24, 11–21. doi: 10.1080/08841241.2014.908454.
62. Bonini, L., Ferrari, P. F., and Fogassi, L. (2013). Neurophysiological bases underlying the organization of intentional actions and the understanding of others' intention. *Conscious Cogn* 22, 1095–1104. doi: 10.1016/j.con-cog.2013.03.001.
63. Bose, T. (2017). Role of Immunological Memory Cells as a Therapeutic Target in Multiple Sclerosis. *Brain Sci* 7, 148. doi: 10.3390/brainsci7110148.
64. Bourdenx, M., Koulakiotis, N. S., Sanoudou, D., Bezard, E., Dehay, B., and Tsaibopoulos, A. (2017). Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and

synucleinopathies. *Prog Neurobiol* 155, 171–193. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.07.003.

65. Braak, H., and Braak, E. (1995). Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* 16, 271–278. doi: 10.1016/0197-4580(95)00021-6.

66. Braak, H., and del Tredici, K. (2015). The preclinical phase of the pathological process underlying sporadic Alzheimer's disease. *Brain* 138, 2814–2833. doi: 10.1093/brain/awv236.

67. Braun, S. M. G., and Jessberger, S. (2014). Review: Adult neurogenesis and its role in neuropsychiatric disease, brain repair and normal brain function. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40, 3–12. doi: 10.1111/nan.12107.

68. Broughton, B. R. S., Reutens, D. C., and Sobey, C. G. (2009). Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. *Stroke* 40. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.531632.

69. Bruick, R. K. (2000). Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 9082–9087. doi: 10.1073/pnas.97.16.9082.

70. Bukke, V. N., Villani, R., Archana, M., Wawrzyniak, A., Balawender, K., Orkisz, S., et al. (2020). The Glucose Metabolic Pathway as A Potential Target for Therapeutics: Crucial Role of Glycosylation in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 21, 7739. doi: 10.3390/ijms21207739.

71. Burtscher, J., Maglione, V., di Pardo, A., Millet, G. P., Schwarzer, C., and Zangrandi, L. (2021). A Rationale for Hypoxic and Chemical Conditioning in Huntington's Disease. *Int J Mol Sci* 22, 582. doi: 10.3390/ijms22020582.

72. Burtscher, J., Mallet, R. T., Burtscher, M., and Millet, G. P. (2021). Hypoxia and brain aging: Neurodegeneration or neuroprotection? *Ageing Res Rev* 68, 101343. doi: 10.1016/j.arr.2021.101343.

73. Bussiere, R., Lacampagne, A., Reiken, S., Liu, X., Scheuerman, V., Zalk, R., et al. (2017). Amyloid β production is regulated by β 2-adrenergic signaling-mediated post-translational modifications of the ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry* 292, 10153–10168. doi: 10.1074/jbc.M116.743070.
74. Cai, Y., Shinar, R., Zhou, Z., and Shinar, J. (2008). Multianalyte sensor array based on an organic light emitting diode platform. *Sens Actuators B Chem* 134, 727–735. doi: 10.1016/j.snb.2008.06.019.
75. Calabrò, M., Rinaldi, C., Santoro, G., and Crisafulli, C. (2021). The biological pathways of Alzheimer disease: a review. *AIMS Neurosci* 8, 86–132. doi: 10.3934/Neuroscience.2021005.
76. Calissano, P., Matrone, C., and Amadoro, G. (2009). Apoptosis and in vitro Alzheimer's disease neuronal models. *Commun Integr Biol* 2, 163–169. doi: 10.4161/cib.7704.
77. Callens, M., Kraskovskaya, N., Derevtsova, K., Annaert, W., Bultynck, G., Bezprozvanny, I., et al. (2021). The role of Bcl-2 proteins in modulating neuronal Ca^{2+} signaling in health and in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1868, 118997. doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.118997.
78. Caltabiano, R., Torrisi, A., Condorelli, D., Albanese, V., and Lanzafame, S. (2010). High levels of connexin 43 mRNA in high grade astrocytomas. Study of 32 cases with in situ hybridization. *Acta Histochem* 112, 529–535. doi: 10.1016/j.acthis.2009.05.008.
79. Calvo-Rodriguez, M., and Bacskai, B. J. (2021). Mitochondria and Calcium in Alzheimer's Disease: From Cell Signaling to Neuronal Cell Death. *Trends Neurosci* 44, 136–151. doi: 10.1016/j.tins.2020.10.004.
80. Carreño, F. R., Walch, J. D., Dutta, M., Nedungadi, T. P., and Cunningham, J. T. (2011). Brain-Derived Neurotrophic Factor-Tyrosine Kinase B Pathway Mediates NMDA Receptor NR2B Subunit Phosphorylation in the Supraoptic Nuclei Following Progressive Dehydration. *J Neuroendocrinol* 23, 894–905. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02209.x.

81. Carrica, L., Li, L., Newville, J., Kenton, J., Gustus, K., Brigman, J., et al. (2019). Genetic inactivation of hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1 α) in adult hippocampal progenitors impairs neurogenesis and pattern discrimination learning. *Neurobiol Learn Mem* 157, 79–85. doi: 10.1016/j.nlm.2018.12.002.
82. Chai, X., Kong, W., Liu, L., Yu, W., Zhang, Z., and Sun, Y. (2014). A viral vector expressing hypoxia-inducible factor 1 alpha inhibits hippocampal neuronal apoptosis. *Neural Regen Res* 9, 1145. doi: 10.4103/1673-5374.135317.
83. Chakroborty, S., Briggs, C., Miller, M. B., Goussakov, I., Schneider, C., Kim, J., et al. (2012). Stabilizing ER Ca²⁺ Channel Function as an Early Preventative Strategy for Alzheimer's Disease. *PLoS One* 7, e52056. doi: 10.1371/journal.pone.0052056.
84. Chang, C.-H., Su, C.-L., and Gean, P.-W. (2018). Mechanism underlying NMDA blockade-induced inhibition of aggression in post-weaning socially isolated mice. *Neuropharmacology* 143, 95–105. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.09.019.
85. Chao, A.-C., Chen, C.-H., Wu, M.-H., Hou, B.-Y., and Yang, D.-I. (2020). Roles of Id1/HIF-1 and CDK5/HIF-1 in cell cycle reentry induced by amyloid-beta peptide in post-mitotic cortical neuron. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1867, 118628. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.118628.
86. Charles, A. C., Merrill, J. E., Dirksen, E. R., and Sandersont, M. J. (1991). Intercellular signaling in glial cells: Calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6, 983–992. doi: 10.1016/0896-6273(91)90238-U.
87. Charvériat, M., Naus, C. C., Leybaert, L., Sáez, J. C., and Giaume, C. (2017). Connexin-Dependent Neuroglial Networking as a New Therapeutic Target. *Front Cell Neurosci* 11. doi: 10.3389/fncel.2017.00174.
88. Cheeran, B., Talelli, P., Mori, F., Koch, G., Suppa, A., Edwards, M., et al. (2008). A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene

(BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS. *J Physiol* 586, 5717–5725. doi: 10.1113/jphysiol.2008.159905.

89. CHEN, A., XIONG, L.-J., TONG, Y., and MAO, M. (2013). The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed Rep* 1, 167–176. doi: 10.3892/br.2012.48.

90. Chen, K., Cheng, P., Wang, H., Gao, S., Li, X., Deng, Z., et al. (2018). Lactate transport facilitates neurite outgrowth. *Biosci Rep* 38. doi: 10.1042/BSR20180157.

91. Chen, N., Chen, X., Huang, R., Zeng, H., Gong, J., Meng, W., et al. (2009). BCL-xL Is a Target Gene Regulated by Hypoxia-inducible Factor-1 α . *Journal of Biological Chemistry* 284, 10004–10012. doi: 10.1074/jbc.M805997200.

92. Chen, S.-D., Wu, C.-L., Hwang, W.-C., and Yang, D.-I. (2017). More Insight into BDNF against Neurodegeneration: Anti-Apoptosis, Anti-Oxidation, and Suppression of Autophagy. *Int J Mol Sci* 18, 545. doi: 10.3390/ijms18030545.

93. Chen, Z., Lai, T.-C., Jan, Y.-H., Lin, F.-M., Wang, W.-C., Xiao, H., et al. (2013). Hypoxia-responsive miRNAs target argonaute 1 to promote angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 123, 1057–1067. doi: 10.1172/JCI65344.

94. Cheng, S.-C., Quintin, J., Cramer, R. A., Shepardson, K. M., Saeed, S., Kumar, V., et al. (2014). mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* (1979) 345. doi: 10.1126/science.1250684.

95. Chiang, P.-L., Chen, H.-L., Lu, C.-H., Chen, Y.-S., Chou, K.-H., Hsu, T.-W., et al. (2018). Interaction of systemic oxidative stress and mesial temporal network degeneration in Parkinson's disease with and without cognitive impairment. *J Neuroinflammation* 15, 281. doi: 10.1186/s12974-018-1317-z.

96. Chiha, W., Bartlett, C. A., Petratos, S., Fitzgerald, M., and Harvey, A. R. (2020). Intravitreal application of AAV-BDNF or mutant AAV-CRMP2 protects retinal ganglion cells and stabilizes axons and myelin after partial optic nerve injury. *Exp Neurol* 326, 113167. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.113167.

97. Chikuma, M., Masuda, S., Kobayashi, T., Nagao, M., and Sasaki, R. (2000). Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney,

brain, and uterus. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 279, E1242–E1248. doi: 10.1152/ajpendo.2000.279.6.E1242.

98. Chinnery, P. F. *Neuroscience for Neurologists*. P. F. Chinnery. Imperial College Press, 2006. 467 p.

99. Chinnery, P., Majamaa, K., Thorburn, D., and Turnbull, D. (2003). “Treatment for mitochondrial myopathy,” in *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, ed. P. Chinnery (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd). doi: 10.1002/14651858.CD004426.

100. Chiu, H. -Y., Lee, H. -T., Lee, K. -H., Zhao, Y., Hsu, C. Y., and Shyu, W. C. (2020). Mechanisms of ischaemic neural progenitor proliferation: a regulatory role of the HIF-1 α -CBX7 pathway. *Neuropathol Appl Neurobiol* 46, 391–405. doi: 10.1111/nan.12585.

101. Chiu, K.-M., Lin, T.-Y., Lee, M.-Y., Lu, C.-W., Wang, M.-J., and Wang, S.-J. (2019). Dexmedetomidine protects neurons from kainic acid-induced excitotoxicity by activating BDNF signaling. *Neurochem Int* 129, 104493. doi: 10.1016/j.neuint.2019.104493.

102. Cho, S., Cho, M., Kim, J., Kaeberlein, M., Lee, S. J., and Suh, Y. (2015). Syringaresinol protects against hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocytes injury and death by destabilization of HIF-1 α in a FOXO3-dependent mechanism. *Oncotarget* 6, 43–55. doi: 10.18632/oncotarget.2723.

103. Choi, S. H., Kim, Y. H., Hebisch, M., Sliwinski, C., Lee, S., D’Avanzo, C., et al. (2014). A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer’s disease. *Nature* 515, 274–278. doi: 10.1038/nature13800.

104. Choi, Y., Kang, S. G., and Kam, K.-Y. (2015). Changes in the BDNF-immunopositive cell population of neocortical layers I and II/III after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1605, 76–82. doi: 10.1016/j.brainres.2015.02.007.

105. Claus, L., Philippot, C., Griemsmann, S., Timmermann, A., Jabs, R., Henneberger, C., et al. (2016). Barreloid Borders and Neuronal Activity Shape Pansial Gap Junction-Coupled Networks in the Mouse Thalamus. *Cerebral Cortex*. doi: 10.1093/cercor/bhw368.

106. Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., et al. (2003). Storage and Release of ATP from Astrocytes in Culture. *Journal of Biological Chemistry* 278, 1354–1362. doi: 10.1074/jbc.M209454200.
107. Cohen, J. R., and D’Esposito, M. (2016). The Segregation and Integration of Distinct Brain Networks and Their Relationship to Cognition. *Journal of Neuroscience* 36, 12083–12094. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2965-15.2016.
108. Collignon, F., Wetjen, N. M., Cohen-Gadol, A. A., Cascino, G. D., Parisi, J., Meyer, F. B., et al. (2006). Altered expression of connexin subtypes in mesial temporal lobe epilepsy in humans. *J Neurosurg* 105, 77–87. doi: 10.3171/jns.2006.105.1.77.
109. Colucci-D’Amato, L., Speranza, L., and Volpicelli, F. (2020). Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *Int J Mol Sci* 21, 7777. doi: 10.3390/ijms21207777.
110. Conway, J. A., Ince, S., Black, S., and Kramer, E. R. (2020). GDNF/RET signaling in dopamine neurons in vivo. *Cell Tissue Res* 382, 135–146. doi: 10.1007/s00441-020-03268-9.
111. Conway, J., and Kramer, E. (2022). Is activation of GDNF/RET signaling the answer for successful treatment of Parkinson’s disease? A discussion of data from the culture dish to the clinic. *Neural Regen Res* 17, 1462. doi: 10.4103/1673-5374.327330.
112. Cook, D. J., Nguyen, C., Chun, H. N., L Llorente, I., Chiu, A. S., Machnicki, M., et al. (2017). Hydrogel-delivered brain-derived neurotrophic factor promotes tissue repair and recovery after stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 37, 1030–1045. doi: 10.1177/0271678X16649964.
113. Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S., and Smith, S. J. (1990). Glutamate Induces Calcium Waves in Cultured Astrocytes: Long-Range Glial Signaling. *Science* (1979) 247, 470–473. doi: 10.1126/science.1967852.

114. Correia, S. C., and Moreira, P. I. (2022). Oxygen Sensing and Signaling in Alzheimer's Disease: A Breathtaking Story! *Cell Mol Neurobiol* 42, 3–21. doi: 10.1007/s10571-021-01148-6.
115. Criscuolo, C., Fabiani, C., Bonadonna, C., Origlia, N., and Domenici, L. (2015). BDNF prevents amyloid-dependent impairment of LTP in the entorhinal cortex by attenuating p38 MAPK phosphorylation. *Neurobiol Aging* 36, 1303–1309. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.11.016.
116. Cunha (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*. doi: 10.3389/neuro.02.001.2010.
117. Curcio, M., Salazar, I. L., Inácio, A. R., Duarte, E. P., Canzoniero, L. M. T., and Duarte, C. B. (2015). Brain ischemia downregulates the neuroprotective GDNF-Ret signaling by a calpain-dependent mechanism in cultured hippocampal neurons. *Cell Death Dis* 6, e1645–e1645. doi: 10.1038/cddis.2014.578.
118. Damier, P., Hirsch, E. C., Zhang, P., Agid, Y., and Javoy-Agid, F. (1993). Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52, 1–6. doi: 10.1016/0306-4522(93)90175-F.
119. Dani, J. W., Chernjavsky, A., and Smith, S. J. (1992). Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8, 429–440. doi: 10.1016/0896-6273(92)90271-E.
120. Davis, C. K., and G.K., R. (2020). Postischemic supplementation of folic acid improves neuronal survival and regeneration in vitro. *Nutrition Research* 75, 1–14. doi: 10.1016/j.nutres.2019.12.007.
121. Davis, C. K., Nampoothiri, S. S., and Rajanikant, G. K. (2018). Folic Acid Exerts Post-Ischemic Neuroprotection In Vitro Through HIF-1 α Stabilization. *Mol Neurobiol* 55, 8328–8345. doi: 10.1007/s12035-018-0982-3.
122. de Haan, W., van Straaten, E. C. W., Gouw, A. A., and Stam, C. J. (2017). Altering neuronal excitability to preserve network connectivity in a computational model of Alzheimer's disease. *PLoS Comput Biol* 13, e1005707. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005707.

123. de la Rosa, A., Olaso-Gonzalez, G., Arc-Chagnaud, C., Millan, F., Salvador-Pascual, A., García-Lucerga, C., et al. (2020). Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *J Sport Health Sci* 9, 394–404. doi: 10.1016/j.jshs.2020.01.004.
124. de Leo, M. E., Borrello, S., Passantino, M., Palazzotti, B., Mordente, A., Daniele, A., et al. (1998). Oxidative stress and overexpression of manganese superoxide dismutase in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 250, 173–176. doi: 10.1016/S0304-3940(98)00469-8.
125. de Vico Fallani, F., Richiardi, J., Chavez, M., and Achard, S. (2014). Graph analysis of functional brain networks: practical issues in translational neuroscience. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369, 20130521. doi: 10.1098/rstb.2013.0521.
126. Dekeyster, E., Geeraerts, E., Buyens, T., van den Haute, C., Baekelandt, V., de Groef, L., et al. (2015). Tackling Glaucoma from within the Brain: An Unfortunate Interplay of BDNF and TrkB. *PLoS One* 10, e0142067. doi: 10.1371/journal.pone.0142067.
127. Dengler, V. L., Galbraith, M. D., and Espinosa, J. M. (2014). Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49, 1–15. doi: 10.3109/10409238.2013.838205.
128. DeVience, S. J., Lu, X., Proctor, J., Rangghran, P., Melhem, E. R., Gullapalli, R., et al. (2017). Metabolic imaging of energy metabolism in traumatic brain injury using hyperpolarized [1-13C]pyruvate. *Sci Rep* 7, 1907. doi: 10.1038/s41598-017-01736-x.
129. Dillen, Y., Kemps, H., Gervois, P., Wolfs, E., and Bronckaers, A. (2020). Adult Neurogenesis in the Subventricular Zone and Its Regulation After Ischemic Stroke: Implications for Therapeutic Approaches. *Transl Stroke Res* 11, 60–79. doi: 10.1007/s12975-019-00717-8.
130. Dinkova-Kostova, A. T., and Talalay, P. (2008). Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res*. doi: 10.1002/mnfr.200700195.

131. Dorfman, V. B., Pasquini, L., Riudavets, M., López-Costa, J. J., Villegas, A., Troncoso, J. C., et al. (2010). Differential cerebral deposition of IDE and NEP in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31, 1743–1757. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.09.016.
132. Du, J., Feng, L., Yang, F., and Lu, B. (2000). Activity- and Ca²⁺-Dependent Modulation of Surface Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Receptors in Hippocampal Neurons. *Journal of Cell Biology* 150, 1423–1434. doi: 10.1083/jcb.150.6.1423.
133. Duarte, E. P., Curcio, M., Canzoniero, L. M., and Duarte, C. B. (2012). Neuroprotection by GDNF in the ischemic brain. *Growth Factors* 30, 242–257. doi: 10.3109/08977194.2012.691478.
134. Ebrahim, N., James, V., Rizvanov, A. A., and Mukhamedshina, Y. (2020). Genetic Modification of Mesenchymal Stem Cells for Neurological Disease Therapy: What Effects Does it Have on Phenotype/Cell Behavior, Determining Their Effectiveness? *Mol Diagn Ther* 24, 683–702. doi: 10.1007/s40291-020-00491-6.
135. Espadas-Alvarez, A. J., Bannon, M. J., Orozco-Barrios, C. E., Escobedo-Sanchez, L., Ayala-Davila, J., Reyes-Corona, D., et al. (2017). Regulation of human GDNF gene expression in nigral dopaminergic neurons using a new doxycycline-regulated NTS-polyplex nanoparticle system. *Nanomedicine* 13, 1363–1375. doi: 10.1016/j.nano.2017.02.006.
136. Esposito, L. (2006). Reduction in Mitochondrial Superoxide Dismutase Modulates Alzheimer's Disease-Like Pathology and Accelerates the Onset of Behavioral Changes in Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience* 26, 5167–5179. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0482-06.2006.
137. Evin, G., and Weidemann, A. (2002). Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A β amyloid peptides. *Peptides (N.Y.)* 23, 1285–1297. doi: 10.1016/S0196-9781(02)00063-3.

138. Fakhoury, M. (2018). Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy. *Curr Neuropharmacol* 16, 508–518. doi: 10.2174/1570159X15666170720095240.
139. Fang, W.-L., Zhao, D.-Q., Wang, F., Li, M., Fan, S.-N., Liao, W., et al. (2017). Neurotrophin® alleviates hippocampal neuron damage through a HIF-1 α /MAPK pathway. *CNS Neurosci Ther* 23, 428–437. doi: 10.1111/cns.12689.
140. Fang, Y., Lu, J., Wang, X., Wu, H., Mei, S., Zheng, J., et al. (2020). HIF-1 α Mediates TRAIL-Induced Neuronal Apoptosis via Regulating DcR1 Expression Following Traumatic Brain Injury. *Front Cell Neurosci* 14. doi: 10.3389/fncel.2020.00192.
141. Fedorovich, S., Hofmeijer, J., van Putten, M. J. A. M., and le Feber, J. (2017). Reduced Synaptic Vesicle Recycling during Hypoxia in Cultured Cortical Neurons. *Front Cell Neurosci* 11. doi: 10.3389/fncel.2017.00032.
142. Fernandez-Fernandez, S., Almeida, A., and Bolaños, J. P. (2012). Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochemical Journal* 443, 3–11. doi: 10.1042/BJ20111943.
143. Ferrini, F., Salio, C., Boggio, E. M., and Merighi, A. (2021). Interplay of BDNF and GDNF in the Mature Spinal Somatosensory System and Its Potential Therapeutic Relevance. *Curr Neuropharmacol* 19, 1225–1245. doi: 10.2174/1570159X18666201116143422.
144. Fon, D., Al-Abboodi, A., Chan, P. P. Y., Zhou, K., Crack, P., Finkelstein, D. I., et al. (2014). Effects of GDNF-Loaded Injectable Gelatin-Based Hydrogels on Endogenous Neural Progenitor Cell Migration. *Adv Healthc Mater* 3, 761–774. doi: 10.1002/adhm.201300287.
145. Fonseca, C. G., Green, C. R., and Nicholson, L. F. B. (2002). Upregulation in astrocytic connexin 43 gap junction levels may exacerbate generalized seizures in mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 929, 105–116. doi: 10.1016/S0006-8993(01)03289-9.

146. Forman, M. S., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M.-Y. (2004). Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med* 10, 1055–1063. doi: 10.1038/nm1113.
147. Gaidin, S. G., Turovskaya, M. v., Gavrish, M. S., Babaev, A. A., Mal'tseva, V. N., Blinova, E. v., et al. (2020). The selective BDNF overexpression in neurons protects neuroglial networks against OGD and glutamate-induced excitotoxicity. *International Journal of Neuroscience* 130, 363–383. doi: 10.1080/00207454.2019.1691205.
148. Galimberti, D., and Scarpini, E. (2017). Pioglitazone for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 26, 97–101. doi: 10.1080/13543784.2017.1265504.
149. Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Borthellette, P., Blackwell, C., et al. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523–527. doi: 10.1038/373523a0.
150. Gan, Y., Ji, X., Hu, X., Luo, Y., Zhang, L., Li, P., et al. (2012). Transgenic Overexpression of Peroxiredoxin-2 Attenuates Ischemic Neuronal Injury Via Suppression of a Redox-Sensitive Pro-Death Signaling Pathway. *Antioxid Redox Signal* 17, 719–732. doi: 10.1089/ars.2011.4298.
151. Gao, F., Gao, K., He, C., Liu, M., Wan, H., and Wang, P. (2019). Multi-site dynamic recording for A β oligomers-induced Alzheimer's disease in vitro based on neuronal network chip. *Biosens Bioelectron* 133, 183–191. doi: 10.1016/j.bios.2019.03.025.
152. Gao, M., Lu, P., Lynam, D., Bednark, B., Campana, W. M., Sakamoto, J., et al. (2016). BDNF gene delivery within and beyond templated agarose multi-channel guidance scaffolds enhances peripheral nerve regeneration. *J Neural Eng* 13, 066011. doi: 10.1088/1741-2560/13/6/066011.

153. Garzon, D., Yu, G., and Fahnstock, M. (2004). A new brain-derived neurotrophic factor transcript and decrease in brain-derived neurotrophic factor transcripts 1, 2 and 3 in Alzheimer's disease parietal cortex. *J Neurochem* 82, 1058–1064. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01030.x.
154. Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., and Rouach, N. (2010). Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11, 87–99. doi: 10.1038/nrn2757.
155. Girotra, P., Behl, T., Sehgal, A., Singh, S., and Bungau, S. (2022). Investigation of the Molecular Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience* 72, 173–186. doi: 10.1007/s12031-021-01824-8.
156. Goemaere, J., and Knoop, B. (2012). Peroxiredoxin distribution in the mouse brain with emphasis on neuronal populations affected in neurodegenerative disorders. *J Comp Neurol* 520, 258–280. doi: 10.1002/cne.22689.
157. González-Reyes, R. E., Nava-Mesa, M. O., Vargas-Sánchez, K., Ariza-Salamanca, D., and Mora-Muñoz, L. (2017). Involvement of Astrocytes in Alzheimer's Disease from a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective. *Front Mol Neurosci* 10. doi: 10.3389/fnmol.2017.00427.
158. Gordan, M. L., Jungwirth, B., Ohl, F., Kellermann, K., Kochs, E. F., and Blobner, M. (2012). Evaluation of neurobehavioral deficits following different severities of cerebral ischemia in rats: A comparison between the modified hole board test and the Morris water maze test. *Behavioural Brain Research* 235, 7–20. doi: 10.1016/j.bbr.2012.07.027.
159. Gorres, K. L., and Raines, R. T. (2010). Prolyl 4-hydroxylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45, 106–124. doi: 10.3109/10409231003627991.
160. Greicius, M. D., Krasnow, B., Reiss, A. L., and Menon, V. (2003). Functional connectivity in the resting brain: A network analysis of the default mode hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 253–258. doi: 10.1073/pnas.0135058100.

161. Gruneberg, D., Montellano, F. A., Plaschke, K., Li, L., Marti, H. H., and Kunze, R. (2016). Neuronal prolyl-4-hydroxylase 2 deficiency improves cognitive abilities in a murine model of cerebral hypoperfusion. *Exp Neurol* 286, 93–106. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.10.001.

162. Gu, G.-J., Li, Y.-P., Peng, Z.-Y., Xu, J.-J., Kang, Z.-M., Xu, W.-G., et al. (2008). Mechanism of ischemic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning involves upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α and erythropoietin in rats. *J Appl Physiol* 104, 1185–1191. doi: 10.1152/jappphysiol.00323.2007.

163. Guo, C., Yang, Z.-H., Zhang, S., Chai, R., Xue, H., Zhang, Y.-H., et al. (2017). Intranasal Lactoferrin Enhances α -Secretase-Dependent Amyloid Precursor Protein Processing via the ERK1/2-CREB and HIF-1 α Pathways in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Neuropsychopharmacology* 42, 2504–2515. doi: 10.1038/npp.2017.8.

164. Guo, C., Zhang, Y.-X., Wang, T., Zhong, M.-L., Yang, Z.-H., Hao, L.-J., et al. (2015). Intranasal deferoxamine attenuates synapse loss via up-regulating the P38/HIF-1 α pathway on the brain of APP/PS1 transgenic mice. *Front Aging Neurosci* 7. doi: 10.3389/fnagi.2015.00104.

165. Habib, N., McCabe, C., Medina, S., Varshavsky, M., Kitsberg, D., Dvir-Szternfeld, R., et al. (2020). Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. *Nat Neurosci* 23, 701–706. doi: 10.1038/s41593-020-0624-8.

166. Ham, M. I., Bettencourt, L. M., McDaniel, F. D., and Gross, G. W. (2008). Spontaneous coordinated activity in cultured networks: Analysis of multiple ignition sites, primary circuits, and burst phase delay distributions. *J Comput Neurosci* 24, 346–357. doi: 10.1007/s10827-007-0059-1.

167. Hambali, A., Kumar, J., Hashim, N. F. M., Maniam, S., Mehat, M. Z., Cheema, M. S., et al. (2021). Hypoxia-Induced Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Potential Neuroprotective Effects of *Centella asiatica*. *Front Physiol* 12. doi: 10.3389/fphys.2021.712317.

168. HAN, K., JIA, N., LI, J., YANG, L., and MIN, L.-Q. (2013). Chronic caffeine treatment reverses memory impairment and the expression of brain BDNF

and TrkB in the PS1/APP double transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Med Rep* 8, 737–740. doi: 10.3892/mmr.2013.1601.

169. Harris, J. J., Jolivet, R., and Attwell, D. (2012). Synaptic Energy Use and Supply. *Neuron* 75, 762–777. doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.019.

170. Harris, N. M., Ritzel, R., Mancini, N. S., Jiang, Y., Yi, X., Manickam, D. S., et al. (2016). Nano-particle delivery of brain derived neurotrophic factor after focal cerebral ischemia reduces tissue injury and enhances behavioral recovery. *Pharmacol Biochem Behav* 150–151, 48–56. doi: 10.1016/j.pbb.2016.09.003.

171. Hasan, Md., and Berdichevsky, Y. (2016). Neural Circuits on a Chip. *Micromachines (Basel)* 7, 157. doi: 10.3390/mi7090157.

172. Heggland, I., Kvello, P., and Witter, M. P. (2019). Electrophysiological Characterization of Networks and Single Cells in the Hippocampal Region of a Transgenic Rat Model of Alzheimer's Disease. *eNeuro* 6, ENEURO.0448-17.2019. doi: 10.1523/ENEURO.0448-17.2019.

173. Helan, M., Aravamudan, B., Hartman, W. R., Thompson, M. A., Johnson, B. D., Pabelick, C. M., et al. (2014). BDNF secretion by human pulmonary artery endothelial cells in response to hypoxia. *J Mol Cell Cardiol* 68, 89–97. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.006.

174. Henry, M. S., Passmore, A. P., Todd, S., McGuinness, B., Craig, D., and Johnston, J. A. (2013). The development of effective biomarkers for Alzheimer's disease: a review. *Int J Geriatr Psychiatry* 28, 331–340. doi: 10.1002/gps.3829.

175. Hertz, L. (2008). Bioenergetics of cerebral ischemia: A cellular perspective. *Neuropharmacology* 55, 289–309. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.05.023.

176. Holla, V. v., Prasad, S., and Pal, P. K. (2022). "Neurological effects of respiratory dysfunction," in, 309–329. doi: 10.1016/B978-0-323-91532-8.00001-X.

177. Hollands, C., Tobin, M. K., Hsu, M., Musaraca, K., Yu, T.-S., Mishra, R., et al. (2017). Depletion of adult neurogenesis exacerbates cognitive deficits in

Alzheimer's disease by compromising hippocampal inhibition. *Mol Neurodegener* 12, 64. doi: 10.1186/s13024-017-0207-7.

178. Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., and Giaume, C. (2008). Gap Junction-Mediated Astrocytic Networks in the Mouse Barrel Cortex. *Journal of Neuroscience* 28, 5207–5217. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5100-07.2008.

179. HOUADES, V., ROUACH, N., EZAN, P., KIRCHHOFF, F., KOU-LAKOFF, A., and GIAUME, C. (2006). Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain. *Neuron Glia Biol* 2, 3–14. doi: 10.1017/S1740925X06000081.

180. Huang, E. J., and Reichardt, L. F. (2003). Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annu Rev Biochem* 72, 609–642. doi: 10.1146/an-nurev.biochem.72.121801.161629.

181. Huang, W., Bai, X., Stopper, L., Catalin, B., Cartarozzi, L. P., Scheller, A., et al. (2018). During Development NG2 Glial Cells of the Spinal Cord are Restricted to the Oligodendrocyte Lineage, but Generate Astrocytes upon Acute Injury. *Neuroscience* 385, 154–165. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.06.015.

182. Huang, W., Meng, F., Cao, J., Liu, X., Zhang, J., and Li, M. (2017). Neuroprotective Role of Exogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor in Hypoxia–Hypoglycemia-Induced Hippocampal Neuron Injury via Regulating Trkb/MiR134 Signaling. *Journal of Molecular Neuroscience* 62, 35–42. doi: 10.1007/s12031-017-0907-z.

183. Hwang, S.-R., Hwang, S.-W., Chen, J.-C., and Hwang, J.-H. (2019). Association of periodic limb movements during sleep and Parkinson disease. *Medicine* 98, e18444. doi: 10.1097/MD.00000000000018444.

184. Hyder, F., Rothman, D. L., and Bennett, M. R. (2013). Cortical energy demands of signaling and nonsignaling components in brain are conserved across mammalian species and activity levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 3549–3554. doi: 10.1073/pnas.1214912110.

185. Ibáñez, C. F., and Andressoo, J.-O. (2017). Biology of GDNF and its receptors — Relevance for disorders of the central nervous system. *Neurobiol Dis* 97, 80–89. doi: 10.1016/j.nbd.2016.01.021.

186. Ibrahim, A. M., Chauhan, L., Bhardwaj, A., Sharma, A., Fayaz, F., Kumar, B., et al. (2022). Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neurodegenerative Disorders. *Biomedicines* 10, 1143. doi: 10.3390/BIOMEDICINES10051143.
187. Idrisova, K., Rizvanov, A., Zeinalova, A., Masgutova, G., Bogov, A., Allegrucci, C., et al. (2022). Application of neurotrophic and proangiogenic factors as therapy after peripheral nervous system injury. *Neural Regen Res* 17, 1240. doi: 10.4103/1673-5374.327329.
188. Ilchibaeva, T. v., Kondaurova, E. M., Tsybko, A. S., Kozhemyakina, R. v., Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2015). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor (proBDNF) in genetically defined fear-induced aggression. *Behavioural Brain Research* 290, 45–50. doi: 10.1016/j.bbr.2015.04.041.
189. Ilchibaeva, T. v., Tsybko, A. S., Kozhemyakina, R. v., Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2016). Glial cell line-derived neurotrophic factor in genetically defined fear-induced aggression. *European Journal of Neuroscience* 44, 2467–2473. doi: 10.1111/ejn.13365.
190. Irala, D., Bonafina, A., Fontanet, P. A., Alsina, F. C., Paratcha, G., and Ledda, F. (2016). GDNF/GFR α 1 complex promotes development of hippocampal dendritic arbors and spines via NCAM. *Development*. doi: 10.1242/dev.140350.
191. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., et al. (2001). HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing. *Science* (1979) 292, 464–468. doi: 10.1126/science.1059817.
192. Iwai, M., Stetler, R. A., Xing, J., Hu, X., Gao, Y., Zhang, W., et al. (2010). Enhanced Oligodendrogenesis and Recovery of Neurological Function by Erythropoietin After Neonatal Hypoxic/Ischemic Brain Injury. *Stroke* 41, 1032–1037. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.570325.
193. Iwasaki, Y., Negishi, T., Inoue, M., Tashiro, T., Tabira, T., and Kimura, N. (2012). Sendai virus vector-mediated brain-derived neurotrophic factor expression ameliorates memory deficits and synaptic degeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 90, 981–989. doi: 10.1002/jnr.22830.

194. Iwase, T., Jung, C. G., Bae, H., Zhang, M., and Soliven, B. (2005). Glial cell line-derived neurotrophic factor-induced signaling in Schwann cells. *J Neurochem* 94, 1488–1499. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03290.x.
195. Iyalomhe, O., Swierczek, S., Enwerem, N., Chen, Y., Adedeji, M. O., Allard, J., et al. (2017). The Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Mild Cognitive Impairment. *Cell Mol Neurobiol* 37, 969–977. doi: 10.1007/s10571-016-0440-6.
196. Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., et al. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 14, 535–562. doi: 10.1016/j.jalz.2018.02.018.
197. Jeon, G. W., Sheldon, R. A., and Ferriero, D. M. (2019). Hypoxia-inducible factor: role in cell survival in superoxide dismutase overexpressing mice after neonatal hypoxia-ischemia. *Korean J Pediatr* 62, 444–449. doi: 10.3345/kjp.2019.00850.
198. Jerónimo-Santos, A., Vaz, S. H., Parreira, S., Rapaz-Lérias, S., Caetano, A. P., Buée-Scherrer, V., et al. (2015). Dysregulation of TrkB Receptors and BDNF Function by Amyloid- β Peptide is Mediated by Calpain. *Cerebral Cortex* 25, 3107–3121. doi: 10.1093/cercor/bhu105.
199. Jezierski, A., Rennie, K., Zurakowski, B., Ribocco-Lutkiewicz, M., Haukenfrers, J., Ajji, A., et al. (2014). Neuroprotective Effects of GDNF-expressing Human Amniotic Fluid Cells. *Stem Cell Rev Rep* 10, 251–268. doi: 10.1007/s12015-013-9484-x.
200. Jiao, S.-S., Shen, L.-L., Zhu, C., Bu, X.-L., Liu, Y.-H., Liu, C.-H., et al. (2016). Brain-derived neurotrophic factor protects against tau-related neurodegeneration of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 6, e907–e907. doi: 10.1038/tp.2016.186.
201. Johnstone, A. F. M., Gross, G. W., Weiss, D. G., Schroeder, O. H.-U., Gramowski, A., and Shafer, T. J. (2010). Microelectrode arrays: A physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century. *Neurotoxicology* 31, 331–350. doi: 10.1016/j.neuro.2010.04.001.

202. Joosten, E. A. J., and Houweling, D. A. (2004). Local acute application of BDNF in the lesioned spinal cord anti-inflammatory and anti-oxidant effects. *Neuroreport* 15, 1163–1166. doi: 10.1097/00001756-200405190-00016.
203. Josiane Budni, Tatiani Bellettini-Santos, Francielle Mina, Michelle Lima Garcez, and Alexandra Ioppi Zugno (2015). The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis* 6, 331. doi: 10.14336/AD.2015.0825.
204. Josiane, Tatiani, Francielle, Michelle, and Alexandra (2015). The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis* 6, 331. doi: 10.14336/AD.2015.0825.
205. Jung, J. E., Kim, G. S., Narasimhan, P., Song, Y. S., and Chan, P. H. (2009). Regulation of Mn-Superoxide Dismutase Activity and Neuroprotection by STAT3 in Mice after Cerebral Ischemia. *Journal of Neuroscience* 29, 7003–7014. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1110-09.2009.
206. Kang, J., Jiang, L., Goldman, S. A., and Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1, 683–692. doi: 10.1038/3684.
207. Kartalou, G.-I., Salgueiro-Pereira, A. R., Endres, T., Lesnikova, A., Casarotto, P., Pousinha, P., et al. (2020). Anti-Inflammatory Treatment with FTY720 Starting after Onset of Symptoms Reverses Synaptic Deficits in an AD Mouse Model. *Int J Mol Sci* 21, 8957. doi: 10.3390/ijms21238957.
208. Katsu-Jiménez, Y., Loría, F., Corona, J. C., and Díaz-Nido, J. (2016). Gene Transfer of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) Prevents Neurodegeneration Triggered by FXN Deficiency. *Molecular Therapy* 24, 877–889. doi: 10.1038/mt.2016.32.
209. Kawabori, M., and Yenari, M. (2015). Inflammatory Responses in Brain Ischemia. *Curr Med Chem* 22, 1258–1277. doi: 10.2174/0929867322666150209154036.

210. Kearon, J. E., Kocherry, S. C., Zoumboulakis, D., Rivera, D., Lourensen, S. R., and Blennerhassett, M. G. (2021). GDNF requires HIF-1 α and RET activation for suppression of programmed cell death of enteric neurons by metabolic challenge. *Molecular and Cellular Neuroscience* 115, 103655. doi: 10.1016/j.mcn.2021.103655.
211. Kempermann, G. (2008). The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends Neurosci* 31, 163–169. doi: 10.1016/j.tins.2008.01.002.
212. KHACHATURIAN, Z. S. (2006). Calcium Hypothesis of Alzheimer's Disease and Brain Aging. *Ann N Y Acad Sci* 747, 1–11. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb44398.x.
213. Khlistunova, I., Biernat, J., Wang, Y., Pickhardt, M., von Bergen, M., Gazova, Z., et al. (2006). Inducible Expression of Tau Repeat Domain in Cell Models of Tauopathy. *Journal of Biological Chemistry* 281, 1205–1214. doi: 10.1074/jbc.M507753200.
214. Kim, C., Park, J.-M., Song, Y., Kim, S., and Moon, J. (2019). HIF1 α -mediated AIMP3 suppression delays stem cell aging via the induction of autophagy. *Aging Cell* 18, e12909. doi: 10.1111/accel.12909.
215. Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Harada, C., and Harada, T. (2016). Neuroprotection, Growth Factors and BDNF-TrkB Signalling in Retinal Degeneration. *Int J Mol Sci* 17, 1584. doi: 10.3390/ijms17091584.
216. Kitano, T., Nisimaru, N., Shibata, E., Iwasaka, H., Noguchi, T., and Yamada, K. (2002). Lactate utilization as an energy substrate in ischemic preconditioned rat brain slices. *Life Sci* 72, 557–564. doi: 10.1016/S0024-3205(02)02251-8.
217. Klug, M., Hill, R. A., Choy, K. H. C., Kyrios, M., Hannan, A. J., and van den Buuse, M. (2012). Long-term behavioral and NMDA receptor effects of young-adult corticosterone treatment in BDNF heterozygous mice. *Neurobiol Dis* 46, 722–731. doi: 10.1016/j.nbd.2012.03.015.
218. Kotliarova, A., and Sidorova, Y. A. (2021). Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Family Ligands, Players at the Interface of Neuroinflammation

and Neuroprotection: Focus Onto the Glia. *Front Cell Neurosci* 15. doi: 10.3389/fncel.2021.679034.

219. Krick, S., Eul, B. G., Hänze, J., Savai, R., Grimminger, F., Seeger, W., et al. (2005). Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Hypoxia-Induced Apoptosis of Primary Alveolar Epithelial Type II Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 395–403. doi: 10.1165/rcmb.2004-0314OC.

220. Kuebler, E. S., Tauskela, J. S., Aylsworth, A., Zhao, X., and Thivierge, J.-P. (2016). Burst predicting neurons survive an in vitro glutamate injury model of cerebral ischemia. *Sci Rep* 5, 17718. doi: 10.1038/srep17718.

221. Kuehn, B. M. (2020). In Alzheimer Research, Glucose Metabolism Moves to Center Stage. *JAMA* 323, 297. doi: 10.1001/jama.2019.20939.

222. Kuipers, S. D., Trentani, A., Tiron, A., Mao, X., Kuhl, D., and Bramham, C. R. (2016). BDNF-induced LTP is associated with rapid Arc/Arg3.1-dependent enhancement in adult hippocampal neurogenesis. *Sci Rep* 6, 21222. doi: 10.1038/srep21222.

223. Kumari, P., Roy, K., Wadhwa, M., Chauhan, G., Alam, S., Kishore, K., et al. (2020). Fear memory is impaired in hypobaric hypoxia: Role of synaptic plasticity and neuro-modulators in limbic region. *Life Sci* 254, 117555. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117555.

224. Kustikova, V., Krivonosov, M., Pimashkin, A., Denisov, P., Zaikin, A., Ivanchenko, M., et al. (2018). “CalciumCV: Computer Vision Software for Calcium Signaling in Astrocytes,” in, 168–179. doi: 10.1007/978-3-030-11027-7_17.

225. Lagali, P., Corcoran, C., and Picketts, D. (2010). Hippocampus development and function: role of epigenetic factors and implications for cognitive disease. *Clin Genet* 78, 321–333. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01503.x.

226. Lambert, C. M., Roy, M., Robitaille, G. A., Richard, D. E., and Bonnet, S. (2010). HIF-1 inhibition decreases systemic vascular remodelling diseases by promoting apoptosis through a hexokinase 2-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 88, 196–204. doi: 10.1093/cvr/cvq152.

227. Lane, C. A., Hardy, J., and Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 25, 59–70. doi: 10.1111/ene.13439.
228. Lane, C. A., Parker, T. D., Cash, D. M., Macpherson, K., Donnachie, E., Murray-Smith, H., et al. (2017). Study protocol: Insight 46 – a neuroscience sub-study of the MRC National Survey of Health and Development. *BMC Neurol* 17, 75. doi: 10.1186/s12883-017-0846-x.
229. Lasala, M., Fabiani, C., Corradi, J., Antollini, S., and Bouzat, C. (2019). Molecular Modulation of Human $\alpha 7$ Nicotinic Receptor by Amyloid- β Peptides. *Front Cell Neurosci* 13. doi: 10.3389/fncel.2019.00037.
230. Lauretti, E., and Praticò, D. (2020). Alzheimer's disease: phenotypic approaches using disease models and the targeting of tau protein. *Expert Opin Ther Targets* 24, 319–330. doi: 10.1080/14728222.2020.1737012.
231. le Feber, J., Erkamp, N., van Putten, M. J. A. M., and Hofmeijer, J. (2017). Loss and recovery of functional connectivity in cultured cortical networks exposed to hypoxia. *J Neurophysiol* 118, 394–403. doi: 10.1152/jn.00098.2017.
232. Lee, C.-K., Weindruch, R., and Prolla, T. A. (2000). Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet* 25, 294–297. doi: 10.1038/77046.
233. Lee, J.-C., Tae, H.-J., Kim, I. H., Cho, J. H., Lee, T.-K., Park, J. H., et al. (2017). Roles of HIF-1 α , VEGF, and NF- κ B in Ischemic Preconditioning-Mediated Neuroprotection of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons Against a Subsequent Transient Cerebral Ischemia. *Mol Neurobiol* 54, 6984–6998. doi: 10.1007/s12035-016-0219-2.
234. Lee, N. M., Chae, S. A., and Lee, H. J. (2017). Effects of neural stem cell media on hypoxic injury in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res* 1677, 20–25. doi: 10.1016/j.brainres.2017.09.018.
235. Lee, N. T., Ahmedy, F., Mohamad Hashim, N., Yin, K. N., and Chin, K. L. (2021). Brain-Derived Neurotrophic Factor Polymorphism and Aphasia after Stroke. *Behavioural Neurology* 2021, 1–7. doi: 10.1155/2021/8887012.
236. Leszek, J., Mikhaylenko, E. v., Belousov, D. M., Koutsouraki, E., Szczechowiak, K., Kobusiak-Prokopowicz, M., et al. (2020). The Links between

Cardiovascular Diseases and Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol* 19, 152–169. doi: 10.2174/1570159X18666200729093724.

237. Levine, A. J. (1997). p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* 88, 323–331. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81871-1.

238. Leybaert, L., and Sanderson, M. J. (2012). Intercellular Ca²⁺ Waves: Mechanisms and Function. *Physiol Rev* 92, 1359–1392. doi: 10.1152/physrev.00029.2011.

239. Leyhe, T., Stransky, E., Eschweiler, G. W., Buchkremer, G., and Laske, C. (2008). Increase of BDNF serum concentration during donepezil treatment of patients with early Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 258, 124–128. doi: 10.1007/s00406-007-0764-9.

240. Li, B., Chohan, M. O., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2007). Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta Neuropathol* 113, 501–511. doi: 10.1007/s00401-007-0207-8.

241. Li, H.-L., Zaghoul, N., Ahmed, I., Omelchenko, A., Firestein, B. L., Huang, H., et al. (2019a). Caffeine inhibits hypoxia-induced nuclear accumulation in HIF-1 α and promotes neonatal neuronal survival. *Exp Neurol* 317, 66–77. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.01.014.

242. Li, J., Tao, T., Xu, J., Liu, Z., Zou, Z., and Jin, M. (2020a). HIF 1 α attenuates neuronal apoptosis by upregulating EPO expression following cerebral ischemia reperfusion injury in a rat MCAO model. *Int J Mol Med*. doi: 10.3892/ijmm.2020.4480.

243. Li, L., Candelario, K. M., Thomas, K., Wang, R., Wright, K., Messier, A., et al. (2014). Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) Is Required for Neural Stem Cell Maintenance and Vascular Stability in the Adult Mouse SVZ. *Journal of Neuroscience* 34, 16713–16719. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4590-13.2014.

244. Li, L., Saliba, P., Reischl, S., Marti, H. H., and Kunze, R. (2016). Neuronal deficiency of HIF prolyl 4-hydroxylase 2 in mice improves ischemic stroke recovery in an HIF dependent manner. *Neurobiol Dis* 91, 221–235. doi: 10.1016/j.nbd.2016.03.018.

245. Li, L., Tan, H., Zou, Z., Gong, J., Zhou, J., Peng, N., et al. (2020b). Preventing necroptosis by scavenging ROS production alleviates heat stress-induced intestinal injury. *International Journal of Hyperthermia* 37, 517–530. doi: 10.1080/02656736.2020.1763483.
246. Li, Q., Cao, Z., and Zhao, S. (2022). The Emerging Portrait of Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Family Receptor Alpha (GFR α) in Cancers. *Int J Med Sci* 19, 659–668. doi: 10.7150/ijms.64133.
247. Li, S., Zhao, Y., Wang, Z., Wang, J., Liu, C., and Sun, D. (2019b). Transplantation of Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Preconditioned with Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Gene Alleviates Renal Fibrosis. *Cell Transplant* 28, 65–78. doi: 10.1177/0963689718815850.
248. Li, W. E. I., Ochalski, P. A. Y., Hertzberg, E. L., and Nagy, J. I. (1998). Immunorecognition, ultrastructure and phosphorylation status of astrocytic gap junctions and connexin43 in rat brain after cerebral focal ischaemia. *European Journal of Neuroscience* 10, 2444–2463. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00253.x.
249. Li, Y., Huang, L., Ma, Q., Concepcion, K., Song, M., Zhang, P., et al. (2018). Repression of the Glucocorticoid Receptor Aggravates Acute Ischemic Brain Injuries in Adult Mice. *Int J Mol Sci* 19, 2428. doi: 10.3390/ijms19082428.
250. Liao, L., Zhang, X. D., Li, J., Zhang, Z. W., Yang, C. C., Rao, C. L., et al. (2017). Pioglitazone attenuates lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors, modulates NF- κ B/IL-6/STAT3, CREB/BDNF pathways and central serotonergic neurotransmission in mice. *Int Immunopharmacol* 49, 178–186. doi: 10.1016/j.intimp.2017.05.036.
251. Lin, C.-Y., Hung, S.-Y., Chen, H.-T., Tsou, H.-K., Fong, Y.-C., Wang, S.-W., et al. (2014). Brain-derived neurotrophic factor increases vascular endothelial growth factor expression and enhances angiogenesis in human chondrosarcoma cells. *Biochem Pharmacol* 91, 522–533. doi: 10.1016/j.bcp.2014.08.008.

252. Liu, H., Zhong, L., Zhang, Y., Liu, X., and Li, J. (2018). Rutin attenuates cerebral ischemia–reperfusion injury in ovariectomized rats via estrogen-receptor-mediated BDNF–TrkB and NGF–TrkA signaling. *Biochemistry and Cell Biology* 96, 672–681. doi: 10.1139/bcb-2017-0209.
253. Liu, Q., Zerbinatti, C. v., Zhang, J., Hoe, H.-S., Wang, B., Cole, S. L., et al. (2007). Amyloid Precursor Protein Regulates Brain Apolipoprotein E and Cholesterol Metabolism through Lipoprotein Receptor LRP1. *Neuron* 56, 66–78. doi: 10.1016/j.neuron.2007.08.008.
254. Liu, S., Sandner, B., Schackel, T., Nicholson, L., Chtarto, A., Tenenbaum, L., et al. (2017). Regulated viral BDNF delivery in combination with Schwann cells promotes axonal regeneration through capillary alginate hydrogels after spinal cord injury. *Acta Biomater* 60, 167–180. doi: 10.1016/j.actbio.2017.07.024.
255. Liu, X.-H., Yu, E. Z., Li, Y.-Y., and Kagan, E. (2006). HIF-1 α has an anti-apoptotic effect in human airway epithelium that is mediated via Mcl-1 gene expression. *J Cell Biochem* 97, 755–765. doi: 10.1002/jcb.20683.
256. Liu, Y., Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., and Gong, C.-X. (2008). Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Lett* 582, 359–364. doi: 10.1016/j.febslet.2007.12.035.
257. Liu, Y., Wang, S., Luo, S., Li, Z., Liang, F., Zhu, Y., et al. (2016). Intravenous PEP-1-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett* 617, 150–155. doi: 10.1016/j.neulet.2016.02.017.
258. Liu, Y., Yang, S., Cai, E., Lin, L., Zeng, P., Nie, B., et al. (2020). Functions of lactate in the brain of rat with intracerebral hemorrhage evaluated with MRI/MRS and in vitro approaches. *CNS Neurosci Ther* 26, 1031–1044. doi: 10.1111/cns.13399.
259. Lloret, Esteve, Lloret, Cervera-Ferri, Lopez, Nepomuceno, et al. (2019). When Does Alzheimer’s Disease Really Start? The Role of Biomarkers. *Int J Mol Sci* 20, 5536. doi: 10.3390/ijms20225536.

260. Loginova, M. M., Novozhilova, M. O., Urazov, M. D., Yarkov, R. S., Krivonosov, M. I., Kravchenko, G. A., et al. (2022). Effects of SRC and IKK β Kinase Inhibition in Ischemic Factors Modeling In Vitro and In Vivo. *Applied Sciences* 12, 3469. doi: 10.3390/app12073469.
261. Lorigados Pedre, L., Gallardo, J., Morales Chacón, L., Vega García, A., Flores-Mendoza, M., Neri-Gómez, T., et al. (2018). Oxidative Stress in Patients with Drug Resistant Partial Complex Seizure. *Behavioral Sciences* 8, 59. doi: 10.3390/bs8060059.
262. Lu, B., Nagappan, G., and Lu, Y. (2014). “BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction,” in, 223–250. doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_9.
263. Lukyanova, L. D., and Kirova, Y. I. (2015). Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. *Front Neurosci* 9. doi: 10.3389/fnins.2015.00320.
264. Luo, C., Ouyang, M.-W., Fang, Y.-Y., Li, S.-J., Zhou, Q., Fan, J., et al. (2017). Dexmedetomidine Protects Mouse Brain from Ischemia-Reperfusion Injury via Inhibiting Neuronal Autophagy through Up-Regulating HIF-1 α . *Front Cell Neurosci* 11. doi: 10.3389/fncel.2017.00197.
265. Lyu, Z., Cao, J., Wang, J., and Lian, H. (2018). Protective effect of vitexin reduces sevoflurane-induced neuronal apoptosis through HIF-1 α , VEGF and p38 MAPK signaling pathway in in vitro and in newborn rats. *Exp Ther Med*. doi: 10.3892/etm.2018.5758.
266. Ma, Z., Stork, T., Bergles, D. E., and Freeman, M. R. (2016). Neuro-modulators signal through astrocytes to alter neural circuit activity and behaviour. *Nature* 539, 428–432. doi: 10.1038/nature20145.
267. Madan, E., Parker, T. M., Pelham, C. J., Palma, A. M., Peixoto, M. L., Nagane, M., et al. (2019). HIF-transcribed p53 chaperones HIF-1 α . *Nucleic Acids Res* 47, 10212–10234. doi: 10.1093/nar/gkz766.

268. Magesh, S., Chen, Y., and Hu, L. (2012). Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Med Res Rev* 32, 687–726. doi: 10.1002/med.21257.
269. Magistretti, P. J., and Allaman, I. (2018). Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nat Rev Neurosci* 19, 235–249. doi: 10.1038/nrn.2018.19.
270. Maida, C. D., Norrito, R. L., Daidone, M., Tuttolomondo, A., and Pinto, A. (2020). Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardio-embolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 21, 6454. doi: 10.3390/ijms21186454.
271. Mantzavinos, V., and Alexiou, A. (2017). Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Curr Alzheimer Res* 14. doi: 10.2174/1567205014666170203125942.
272. Martens, S., Hofmans, S., Declercq, W., Augustyns, K., and Vandena-beele, P. (2020). Inhibitors Targeting RIPK1/RIPK3: Old and New Drugs. *Trends Pharmacol Sci* 41, 209–224. doi: 10.1016/j.tips.2020.01.002.
273. Martin, J.-L., and Finsterwald, C. (2011). Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development. *Commun Integr Biol* 4, 14–16. doi: 10.4161/cib.13761.
274. Martinowich, K., Manji, H., and Lu, B. (2007). New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci* 10, 1089–1093. doi: 10.1038/nn1971.
275. Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., and Sharma, P. L. (2013). Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 698, 6–18. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.10.032.
276. Menrad, H., Werno, C., Schmid, T., Copanaki, E., Deller, T., Dehne, N., et al. (2010). Roles of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) versus HIF-2 α in the survival of hepatocellular tumor spheroids. *Hepatology* 51, 2183–2192. doi: 10.1002/hep.23597.

277. Merelli, A., Rodríguez, J. C. G., Folch, J., Regueiro, M. R., Camins, A., and Lazarowski, A. (2018). Understanding the Role of Hypoxia Inducible Factor During Neurodegeneration for New Therapeutics Opportunities. *Curr Neuropharmacol* 16, 1484–1498. doi: 10.2174/1570159X16666180110130253.

278. Milosevic, J., Maisel, M., Wegner, F., Leuchtenberger, J., Wenger, R. H., Gerlach, M., et al. (2007). Lack of Hypoxia-Inducible Factor-1 Impairs Mid-brain Neural Precursor Cells Involving Vascular Endothelial Growth Factor Signaling. *Journal of Neuroscience* 27, 412–421. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2482-06.2007.

279. Mishchenko, T. A., Mitroshina, E. v., Shishkina, T. v., and Vedunova, M. B. (2018). Antioxidant Properties of Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF). *Bull Exp Biol Med* 166, 293–296. doi: 10.1007/s10517-018-4335-z.

280. Mishchenko, T. A., Mitroshina, E. V., Usenko, A. v., Voronova, N. v., Astrakhanova, T. A., Shirokova, O. M., et al. (2019). Features of Neural Network Formation and Their Functions in Primary Hippocampal Cultures in the Context of Chronic TrkB Receptor System Influence. *Front Physiol* 9. doi: 10.3389/fphys.2018.01925.

281. Mishchenko, T. A., Vedunova, M. V., Mitroshina, E. V., Pimashkin, A. S., and Mukhina, I. V. (2015). Neurotropic Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor at Different Stages of Dissociated Hippocampal Cultures Development in vitro. *Sovremennye tehnologii v medicine* 7, 47–54. doi: 10.17691/stm2015.7.3.06.

282. Mitre, M., Mariga, A., and Chao, M. V. (2017). Neurotrophin signaling: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci* 131, 13–23. doi: 10.1042/CS20160044.

283. Mitroshina, E. V., Abogessimengane, B. Zh., Urazov, M. D., Hamraoui, I., Mishchenko, T. A., Astrakhanova, T. A., et al. (2017). Adaptive Role of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Cerebral Ischemia. *Sovremennye tehnologii v medicine* 9, 68. doi: 10.17691/stm2017.9.1.08.

284. Mitroshina, E. V., Epifanova, E. A., Mishchenko, T. A., Yarkov, R. S., Babaev, A. A., and Vedunova, M. V. (2018b). Application of the AAV-Syn-BDNF-

EGFP Virus Vector as a Neuroprotective Agent in Modeling Hypoxia in vitro. *Sovremennye tehnologii v medicine* 10, 47. doi: 10.17691/stm2018.10.2.05.

285. Mitroshina, E. v., Krivonosov, M. I., Burmistrov, D. E., Savyuk, M. O., Mishchenko, T. A., Ivanchenko, M. v., et al. (2020a). Signatures of the Consolidated Response of Astrocytes to Ischemic Factors In Vitro. *Int J Mol Sci* 21, 7952. doi: 10.3390/ijms21217952.

286. Mitroshina, E. v., Loginova, M. M., Savyuk, M. O., Krivonosov, M. I., Mishchenko, T. A., Tarabykin, V. S., et al. (2021). Neuroprotective Effect of Kinase Inhibition in Ischemic Factor Modeling In Vitro. *Int J Mol Sci* 22, 1885. doi: 10.3390/ijms22041885.

287. Mitroshina, E. v., Loginova, M. M., Yarkov, R. S., Urazov, M. D., Novozhilova, M. O., Krivonosov, M. I., et al. (2022). Inhibition of Neuronal Necroptosis Mediated by RIPK1 Provides Neuroprotective Effects on Hypoxia and Ischemia In Vitro and In Vivo. *Int J Mol Sci* 23, 735. doi: 10.3390/ijms23020735.

288. Mitroshina, E. v., Mishchenko, T. A., Loginova, M. M., Tarabykin, V. S., and Vedunova, M. v. (2020a). Identification of Kinome Representatives with Neuroprotective Activity. *Neurochemical Journal* 14, 394–407. doi: 10.1134/S1819712420040133.

289. Mitroshina, E. V., Mishchenko, T. A., Lukovnikova, L. B., And Vedunova, M. V. (2022). The Role Of Mct1 Transporters In The Implementation Of The Neuroprotective Effect Of Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor. *Opera Med Physiol* 91, 31–41.

290. Mitroshina, E. V., Savyuk, M. O., Ponimaskin, E., and Vedunova, M. V. (2021). Hypoxia-Inducible Factor (HIF) in Ischemic Stroke and Neurodegenerative Disease. *Front Cell Dev Biol* 9. doi: 10.3389/fcell.2021.703084.

291. Mitroshina, E. v., Yarkov, R. S., Mishchenko, T. A., Krut', V. G., Gavrish, M. S., Epifanova, E. A., et al. (2020b). Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Preserves the Functional Integrity of Neural Networks in the β -Amyloidopathy Model in vitro. *Front Cell Dev Biol* 8. doi: 10.3389/fcell.2020.00582.

292. Mitroshina, E., Mishchenko, T., Usenko, A., Epifanova, E., Yarkov, R., Gavrish, M., et al. (2018a). AAV-Syn-BDNF-EGFP Virus Construct Exerts Neuroprotective Action on the Hippocampal Neural Network during Hypoxia In Vitro. *Int J Mol Sci* 19, 2295. doi: 10.3390/ijms19082295.
293. Mitroshina, E. v., Mishchenko, T. A., Shirokova, O. M., Astrakhanova, T. A., Loginova, M. M., Epifanova, E. A., et al. (2019). Intracellular Neuroprotective Mechanisms in Neuron-Glial Networks Mediated by Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. *Oxid Med Cell Longev* 2019, 1–15. doi: 10.1155/2019/1036907.
294. Miyazaki, H., Okuma, Y., Nomura, J., Nagashima, K., and Nomura, Y. (2003). Age-Related Alterations in the Expression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in the Senescence-Accelerated Mouse Brain. *J Pharmacol Sci* 92, 28–34. doi: 10.1254/jphs.92.28.
295. Mizoguchi, Y., Kitamura, A., Wake, H., Ishibashi, H., Watanabe, M., Nishimaki, T., et al. (2006). BDNF occludes GABA B receptor-mediated inhibition of GABA release in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *European Journal of Neuroscience* 24, 2135–2144. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05092.x.
296. Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., and Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell* 7, 150–161. doi: 10.1016/j.stem.2010.07.007.
297. Molavi Pordanjani, S., and Jalal Hosseinimehr, S. (2016). The Role of NF- κ B Inhibitors in Cell Response to Radiation. *Curr Med Chem* 23, 3951–3963. doi: 10.2174/0929867323666160824162718.
298. Molnár, Z., Luhmann, H. J., and Kanold, P. O. (2020). Transient cortical circuits match spontaneous and sensory-driven activity during development. *Science* (1979) 370, eabb2153. doi: 10.1126/science.abb2153.
299. Mondragón-Rodríguez, S., Gu, N., Manseau, F., and Williams, S. (2018). Alzheimer's Transgenic Model Is Characterized by Very Early Brain Network Alterations and β -CTF Fragment Accumulation: Reversal by β -Secretase Inhibition. *Front Cell Neurosci* 12. doi: 10.3389/fncel.2018.00121.

300. Morgan, M. J., and Liu, Z. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 21, 103–115. doi: 10.1038/cr.2010.178.
301. Morishima, M., Fujita, T., Osagawa, S., Kubota, H., and Ono, K. (2021). Enhanced BDNF Actions Following Acute Hypoxia Facilitate HIF-1 α -Dependent Upregulation of Cav3-T-Type Ca²⁺ Channels in Rat Cardiomyocytes. *Membranes (Basel)* 11, 470. doi: 10.3390/membranes11070470.
302. Mothet, J.-P., Pollegioni, L., Ouanounou, G., Martineau, M., Fossier, P., and Baux, G. (2005). Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 5606–5611. doi: 10.1073/pnas.0408483102.
303. Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., et al. (2016). Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *Circulation* 133. doi: 10.1161/CIR.0000000000000350.
304. Mulligan, L. M. (2019). GDNF and the RET Receptor in Cancer: New Insights and Therapeutic Potential. *Front Physiol* 9. doi: 10.3389/fphys.2018.01873.
305. Mullins, A. E., Kam, K., Parekh, A., Bubu, O. M., Osorio, R. S., and Varga, A. W. (2020). Obstructive Sleep Apnea and Its Treatment in Aging: Effects on Alzheimer's disease Biomarkers, Cognition, Brain Structure and Neurophysiology. *Neurobiol Dis* 145, 105054. doi: 10.1016/j.nbd.2020.105054.
306. Nakamura, K., Martin, K. C., Jackson, J. K., Beppu, K., Woo, C.-W., and Thiele, C. J. (2006). Brain-Derived Neurotrophic Factor Activation of TrkB Induces Vascular Endothelial Growth Factor Expression via Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Neuroblastoma Cells. *Cancer Res* 66, 4249–4255. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2789.
307. Namura, S., Ooboshi, H., Liu, J., and Yenari, M. A. (2013). Neuroprotection after cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1278, 25–32. doi: 10.1111/nyas.12087.
308. Naumenko, V. S., Kulikov, A. V., Kondaurova, E. M., Tsybko, A. S., Kulikova, E. A., Krasnov, I. B., et al. (2015). Effect of actual long-term spaceflight

on BDNF, TrkB, p75, BAX and BCL-XL genes expression in mouse brain regions. *Neuroscience* 284, 730–736. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.10.045.

309. Nedergaard, M. (1994). Direct Signaling from Astrocytes to Neurons in Cultures of Mammalian Brain Cells. *Science* (1979) 263, 1768–1771. doi: 10.1126/science.8134839.

310. Nelson, O., Tu, H., Lei, T., Bentahir, M., de Strooper, B., and Bezprozvanny, I. (2007). Familial Alzheimer disease–linked mutations specifically disrupt Ca²⁺ leak function of presenilin 1. *Journal of Clinical Investigation* 117, 1230–1239. doi: 10.1172/JCI30447.

311. Newman, E. A., and Zahs, K. R. (1997). Calcium Waves in Retinal Glial Cells. *Science* (1979) 275, 844–847. doi: 10.1126/science.275.5301.844.

312. Nieto-Posadas, A., Flores-Martínez, E., Lorea-Hernández, J.-J., Rivera-Angulo, A.-J., Pérez-Ortega, J.-E., Bargas, J., et al. (2014). Change in network connectivity during fictive-gasping generation in hypoxia: prevention by a metabolic intermediate. *Front Physiol* 5. doi: 10.3389/fphys.2014.00265.

313. Noriega-Prieto, J. A., and Araque, A. (2021). Sensing and Regulating Synaptic Activity by Astrocytes at Tripartite Synapse. *Neurochem Res* 46, 2580–2585. doi: 10.1007/s11064-021-03317-x.

314. Nouri, F., Salehinejad, P., Nematollahi-mahani, S. N., Kamarul, T., Zarrindast, M. R., and Sharifi, A. M. (2016). Deferoxamine Preconditioning of Neural-Like Cells Derived from Human Wharton’s Jelly Mesenchymal Stem Cells as a Strategy to Promote Their Tolerance and Therapeutic Potential: An In Vitro Study. *Cell Mol Neurobiol* 36, 689–700. doi: 10.1007/s10571-015-0249-8.

315. Nucera, A., and Hachinski, V. (2018). Cerebrovascular and Alzheimer disease: fellow travelers or partners in crime? *J Neurochem* 144, 513–516. doi: 10.1111/jnc.14283.

316. Nussbaum, J. M., Seward, M. E., and Bloom, G. S. (2013). Alzheimer disease. *Prion* 7, 14–19. doi: 10.4161/pri.22118.

317. Oberheim, N. A., Goldman, S. A., and Nedergaard, M. (2012). “Heterogeneity of Astrocytic Form and Function,” in, 23–45. doi: 10.1007/978-1-61779-452-0_3.
318. Oberheim, N. A., Tian, G.-F., Han, X., Peng, W., Takano, T., Ransom, B., et al. (2008). Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J Neurosci* 28, 3264–76. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4980-07.2008.
319. Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., et al. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer’s Disease with Plaques and Tangles. *Neuron* 39, 409–421. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00434-3.
320. Oddo, S., Caccamo, A., Tran, L., Lambert, M. P., Glabe, C. G., Klein, W. L., et al. (2006). Temporal Profile of Amyloid- β (A β) Oligomerization in an in Vivo Model of Alzheimer Disease. *Journal of Biological Chemistry* 281, 1599–1604. doi: 10.1074/jbc.M507892200.
321. Ohnishi, H., Murata, Y., Okazawa, H., and Matozaki, T. (2011). Src family kinases: modulators of neurotransmitter receptor function and behavior. *Trends Neurosci* 34, 629–637. doi: 10.1016/j.tins.2011.09.005.
322. Olmez, I., and Ozyurt, H. (2012). Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochem Int* 60, 208–212. doi: 10.1016/j.neuint.2011.11.009.
323. Olney, J. W. (1994). Excitatory transmitter neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 15, 259–260. doi: 10.1016/0197-4580(94)90127-9.
324. Osorio, R. S., Gumb, T., Pirraglia, E., Varga, A. W., Lu, S. -e., Lim, J., et al. (2015). Sleep-disordered breathing advances cognitive decline in the elderly. *Neurology* 84, 1964–1971. doi: 10.1212/WNL.0000000000001566.
325. Ouyang, Y.-B., Voloboueva, L. A., Xu, L.-J., and Giffard, R. G. (2007). Selective Dysfunction of Hippocampal CA1 Astrocytes Contributes to Delayed Neuronal Damage after Transient Forebrain Ischemia. *Journal of Neuroscience* 27, 4253–4260. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0211-07.2007.

326. Pál, B. (2018). Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75, 2917–2949. doi: 10.1007/s00018-018-2837-5.
327. Palladino, M. A., Shah, A., Tyson, R., Horvath, J., Dugan, C., and Karpodinis, M. (2012). Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) is a candidate target gene of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in the testis. *Reproductive Biology and Endocrinology* 10, 104. doi: 10.1186/1477-7827-10-104.
328. Palomäki, S., Pietilä, M., Laitinen, S., Pesälä, J., Sormunen, R., Lehenkari, P., et al. (2013). HIF-1 α is upregulated in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 31, 1902–1909. doi: 10.1002/stem.1435.
329. Pamenter, M. E., Perkins, G. A., McGinness, A. K., Gu, X. Q., Ellisman, M. H., and Haddad, G. G. (2012). Autophagy and Apoptosis Are Differentially Induced in Neurons and Astrocytes Treated with an In Vitro Mimic of the Ischemic Penumbra. *PLoS One* 7, e51469. doi: 10.1371/journal.pone.0051469.
330. Panchision, D. M. (2009). The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J Cell Physiol* 220, 562–568. doi: 10.1002/jcp.21812.
331. Pannasch, U., and Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends Neurosci* 36, 405–417. doi: 10.1016/j.tins.2013.04.004.
332. Paratcha, G., Ledda, F., and Ibáñez, C. F. (2003). The Neural Cell Adhesion Molecule NCAM Is an Alternative Signaling Receptor for GDNF Family Ligands. *Cell* 113, 867–879. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00435-5.
333. Park, H., and Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14, 7–23. doi: 10.1038/nrn3379.
334. Parpura, V., Basarsky, T. A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S., and Haydon, P. G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte–neuron signalling. *Nature* 369, 744–747. doi: 10.1038/369744a0.

335. Parri, H. R., Gould, T. M., and Crunelli, V. (2001). Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 4, 803–812. doi: 10.1038/90507.
336. Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., et al. (2005). Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science* (1979) 310, 113–116. doi: 10.1126/science.1116916.
337. Pastorino, J. G., and Hoek, J. B. (2008). Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 40, 171–182. doi: 10.1007/s10863-008-9148-8.
338. Patapoutian, A., and Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 11, 272–280. doi: 10.1016/S0959-4388(00)00208-7.
339. Pathak, D., Shields, L. Y., Mendelsohn, B. A., Haddad, D., Lin, W., Gerencser, A. A., et al. (2015). The Role of Mitochondrially Derived ATP in Synaptic Vesicle Recycling. *Journal of Biological Chemistry* 290, 22325–22336. doi: 10.1074/jbc.M115.656405.
340. Petukhova, E. O., Mukhamedshina, Y. O., Salafutdinov, I. I., Garanina, E. E., Kaligin, M. S., Leushina, A. V., et al. (2019). Effects of Transplanted Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells Overexpressing GDNF on Spatial Memory and Hippocampal Synaptic Proteins in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *JAD* 69, 443–453. doi: 10.3233/jad-190150
341. Pellegrini-Giampietro, D. (1997). The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca²⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci* 20, 464–470. doi: 10.1016/S0166-2236(97)01100-4.
342. Pellerin, L., and Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 10625–10629. doi: 10.1073/pnas.91.22.10625.

343. Peña-Ortega, F. (2017). “Neural Network Reconfigurations: Changes of the Respiratory Network by Hypoxia as an Example,” in, 217–237. doi: 10.1007/978-3-319-62817-2_12.
344. Peng, S., Wu, J., Mufson, E. J., and Fahnstock, M. (2005). Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer’s disease. *J Neurochem* 93, 1412–1421. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03135.x.
345. Pereira-Caixeta, A. R., Guarnieri, L. O., Medeiros, D. C., Mendes, E. M. A. M., Ladeira, L. C. D., Pereira, M. T., et al. (2018). Inhibiting constitutive neurogenesis compromises long-term social recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 155, 92–103. doi: 10.1016/j.nlm.2018.06.014.
346. Phillips, H. S., Hains, J. M., Armanini, M., Laramee, G. R., Johnson, S. A., and Winslow, J. W. (1991). BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer’s disease. *Neuron* 7, 695–702. doi: 10.1016/0896-6273(91)90273-3.
347. Pimashkin, A., Kastalskiy, I., Simonov, A., Koryagina, E., Mukhina, I., and Kazantsev, V. (2011). Spiking Signatures of Spontaneous Activity Bursts in Hippocampal Cultures. *Front Comput Neurosci* 5. doi: 10.3389/fncom.2011.00046.
348. Pires Monteiro, S., Voogd, E., Muzzi, L., de Vecchis, G., Mossink, B., Levers, M., et al. (2021). Neuroprotective effect of hypoxic preconditioning and neuronal activation in a in vitro human model of the ischemic penumbra. *J Neural Eng* 18, 036016. doi: 10.1088/1741-2552/abe68a.
349. Pluta, R., Bogucka-Kocka, A., Ułamek-Kozioł, M., Bogucki, J., Januszewski, S., Kocki, J., et al. (2018a). Ischemic tau protein gene induction as an additional key factor driving development of Alzheimer’s phenotype changes in CA1 area of hippocampus in an ischemic model of Alzheimer’s disease. *Pharmacological Reports* 70, 881–884. doi: 10.1016/j.pharep.2018.03.004.
350. Pluta, R., Ułamek-Kozioł, M., Januszewski, S., and Czuczwar, S. J. (2018b). Tau Protein Dysfunction after Brain Ischemia. *Journal of Alzheimer’s Disease* 66, 429–437. doi: 10.3233/JAD-180772.

351. Poon, W. W., Carlos, A. J., Aguilar, B. L., Berchtold, N. C., Kawano, C. K., Zograbyan, V., et al. (2013). β -Amyloid (A β) Oligomers Impair Brain-derived Neurotrophic Factor Retrograde Trafficking by Down-regulating Ubiquitin C-terminal Hydrolase, UCH-L1. *Journal of Biological Chemistry* 288, 16937–16948. doi: 10.1074/jbc.M113.463711.
352. Porcher, C., Medina, I., and Gaiarsa, J.-L. (2018). Mechanism of BDNF Modulation in GABAergic Synaptic Transmission in Healthy and Disease Brains. *Front Cell Neurosci* 12. doi: 10.3389/fncel.2018.00273.
353. Purves, D. (1985). *Trace-element Contamination of the Environment*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
354. Qin, S., Yang, X., Xue, X., and Song, J. (2017). A One-Layer Recurrent Neural Network for Pseudoconvex Optimization Problems With Equality and Inequality Constraints. *IEEE Trans Cybern* 47, 3063–3074. doi: 10.1109/TCYB.2016.2567449.
355. Quiroga, R. Q., Nadasdy, Z., and Ben-Shaul, Y. (2004). Unsupervised Spike Detection and Sorting with Wavelets and Superparamagnetic Clustering. *Neural Comput* 16, 1661–1687. doi: 10.1162/089976604774201631.
356. Radak, D., Katsiki, N., Resanovic, I., Jovanovic, A., Sudar-Milovanovic, E., Zafirovic, S., et al. (2017). Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. *Curr Vasc Pharmacol* 15, 115–122. doi: 10.2174/1570161115666161104095522.
357. Rajan, K. B., Wilson, R. S., Weuve, J., Barnes, L. L., and Evans, D. A. (2015). Cognitive impairment 18 years before clinical diagnosis of Alzheimer disease dementia. *Neurology* 85, 898–904. doi: 10.1212/WNL.0000000000001774.
358. Ramamoorthy, P., Xu, G., and Shi, H. (2019). Expression of Hypoxia Inducible Factor 1alpha Is Protein Kinase A-dependent in Primary Cortical Astrocytes Exposed to Severe Hypoxia. *Neurochem Res* 44, 258–268. doi: 10.1007/s11064-018-2516-9.
359. Ramos-Cejudo, J., Gutiérrez-Fernández, M., Otero-Ortega, L., Rodríguez-Frutos, B., Fuentes, B., Vallejo-Cremades, M. T., et al. (2015). Brain-

Derived Neurotrophic Factor Administration Mediated Oligodendrocyte Differentiation and Myelin Formation in Subcortical Ischemic Stroke. *Stroke* 46, 221–228. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006692.

360. Ran, Q., Liang, H., Gu, M., Qi, W., Walter, C. A., Roberts, L. J., et al. (2004). Transgenic Mice Overexpressing Glutathione Peroxidase 4 Are Protected against Oxidative Stress-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 279, 55137–55146. doi: 10.1074/jbc.M410387200.

361. Randall, J., Mörtberg, E., Provuncher, G. K., Fournier, D. R., Duffy, D. C., Rubertsson, S., et al. (2013). Tau proteins in serum predict neurological outcome after hypoxic brain injury from cardiac arrest: Results of a pilot study. *Resuscitation* 84, 351–356. doi: 10.1016/j.resuscitation.2012.07.027.

362. Rangaraju, V., Calloway, N., and Ryan, T. A. (2014). Activity-Driven Local ATP Synthesis Is Required for Synaptic Function. *Cell* 156, 825–835. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.042.

363. Ranjan, A. K., and Gulati, A. (2022). Sovateltide Mediated Endothelin B Receptors Agonism and Curbing Neurological Disorders. *Int J Mol Sci* 23, 3146. doi: 10.3390/ijms23063146.

364. Ratan, R. R., Siddiq, A., Smirnova, N., Karpisheva, K., Haskew-Layton, R., McConoughey, S., et al. (2007). Harnessing hypoxic adaptation to prevent, treat, and repair stroke. *J Mol Med* 85, 1331–1338. doi: 10.1007/s00109-007-0283-1.

365. Regli, L., Anderson, R. E., and Meyer, F. B. (1995). Effects of Intermittent Reperfusion on Brain pHi, rCBF, and NADH During Rabbit Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 26, 1444–1452. doi: 10.1161/01.STR.26.8.1444.

366. Revilla, S., Ursulet, S., Álvarez-López, M. J., Castro-Freire, M., Perpiñá, U., García-Mesa, Y., et al. (2014). Lenti-GDNF Gene Therapy Protects Against Alzheimer's Disease-Like Neuropathology in 3xTg-AD Mice and MC65 Cells. *CNS Neurosci Ther* 20, 961–972. doi: 10.1111/cns.12312.

367. Rey, F., Balsari, A., Giallongo, T., Ottolenghi, S., di Giulio, A. M., Samaja, M., et al. (2019). Erythropoietin as a Neuroprotective Molecule: An Overview

of Its Therapeutic Potential in Neurodegenerative Diseases. *ASN Neuro* 11, 175909141987142. doi: 10.1177/1759091419871420.

368. Ries, M., and Sastre, M. (2016). Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front Aging Neurosci* 8. doi: 10.3389/fnagi.2016.00160.

369. Rodrigo, R., Fernandez-Gajardo, R., Gutierrez, R., Matamala, J., Carrasco, R., Miranda-Merchak, A., et al. (2013). Oxidative Stress and Pathophysiology of Ischemic Stroke: Novel Therapeutic Opportunities. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12, 698–714. doi: 10.2174/1871527311312050015.

370. Rodríguez-Arellano, J. J., Parpura, V., Zorec, R., and Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 323, 170–182. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.01.007.

371. Roe, J.-S., Kim, H., Lee, S.-M., Kim, S.-T., Cho, E.-J., and Youn, H.-D. (2006). p53 Stabilization and Transactivation by a von Hippel-Lindau Protein. *Mol Cell* 22, 395–405. doi: 10.1016/j.molcel.2006.04.006.

372. Rosafio, K., Castillo, X., Hirt, L., and Pellerin, L. (2016). Cell-specific modulation of monocarboxylate transporter expression contributes to the metabolic reprogramming taking place following cerebral ischemia. *Neuroscience* 317, 108–120. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.12.052.

373. Rossi, D. J., Brady, J. D., and Mohr, C. (2007). Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci* 10, 1377–1386. doi: 10.1038/nn2004.

374. Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J. D., Bonvento, G., and Giaume, C. (2011). Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 18442–18446. doi: 10.1073/pnas.1107386108.

375. Ryou, M., and Mallet, R. T. (2018). “An In Vitro Oxygen–Glucose Deprivation Model for Studying Ischemia–Reperfusion Injury of Neuronal Cells,” in, 229–235. doi: 10.1007/978-1-4939-7526-6_18.

376. Sadek, J., Wuo, M. G., Rooklin, D., Hauenstein, A., Hong, S. H., Gautam, A., et al. (2020). Modulation of virus-induced NF- κ B signaling by NEMO coiled coil mimics. *Nat Commun* 11, 1786. doi: 10.1038/s41467-020-15576-3.
377. Sadlecki, P., Bodnar, M., Grabiec, M., Marszalek, A., Walentowicz, P., Sokup, A., et al. (2014). The Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 α , Glucose Transporter-1, (GLUT-1) and Carbon Anhydrase IX in Endometrial Cancer Patients. *Biomed Res Int* 2014, 1–11. doi: 10.1155/2014/616850.
378. Sakagami, H., Makino, Y., Mizumoto, K., Isoe, T., Takeda, Y., Watanabe, J., et al. (2014). Loss of HIF-1 α impairs GLUT4 translocation and glucose uptake by the skeletal muscle cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 306, E1065–E1076. doi: 10.1152/ajpendo.00597.2012.
379. Salceda, S., and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. *Journal of Biological Chemistry* 272, 22642–22647. doi: 10.1074/jbc.272.36.22642.
380. Salhanick, S. D., Belikoff, B., Orlow, D., Holt, D., Reenstra, W., and Buras, J. A. (2006). Hyperbaric Oxygen Reduces Acetaminophen Toxicity and Increases HIF-1 α Expression. *Academic Emergency Medicine* 13, 707–714. doi: 10.1197/j.aem.2006.01.029.
381. Salminen, A., Kaarniranta, K., and Kauppinen, A. (2021). Hypoxia/ischemia impairs CD33 (Siglec-3)/TREM2 signaling: Potential role in Alzheimer's pathogenesis. *Neurochem Int* 150, 105186. doi: 10.1016/j.neuint.2021.105186.
382. Salter, M. W., and Kalia, L. v. (2004). Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci* 5, 317–328. doi: 10.1038/nrn1368.
383. SantaCruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., et al. (2005). Tau Suppression in a Neurodegenerative Mouse Model Improves Memory Function. *Science* (1979) 309, 476–481. doi: 10.1126/science.1113694.
384. Sasabe, E., Tatemoto, Y., Li, D., Yamamoto, T., and Osaki, T. (2005). Mechanism of HIF-1 α -dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in

squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 96, 394–402. doi: 10.1111/j.1349-7006.2005.00065.x.

385. Sasi, M., Vignoli, B., Canossa, M., and Blum, R. (2017). Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Pflugers Arch* 469, 593–610. doi: 10.1007/s00424-017-1964-4.

386. Savaskan, E., Müller-Spahn, F., Olivieri, G., Bruttel, S., Otten, U., Rosenberg, C., et al. (2000). Alterations in Trk A, Trk B and Trk C Receptor Immunoreactivities in Parietal Cortex and Cerebellum in Alzheimer's Disease. *Eur Neurol* 44, 172–180. doi: 10.1159/000008229.

387. Savyuk, M. O. , Krivonosov, M. I. , Ivanchenko, M. V. , Poloznikov, A. A. , Mitroshina, E. V. , and Vedunova, M. V. (2021). Network activity in primary hippocampal cultures upon HIF-prolyl hydroxylase inhibition. *Izvestiya VUZ. Applied Nonlinear Dynamics* 29, 421–427. doi: 10.18500/0869-6632-2021-29-3-421-427.

388. Savyuk, M., Krivonosov, M., Mishchenko, T., Gazaryan, I., Ivanchenko, M., Khristichenko, A., et al. (2020). Neuroprotective Effect of HIF Prolyl Hydroxylase Inhibition in an In Vitro Hypoxia Model. *Antioxidants* 9, 662. doi: 10.3390/antiox9080662.

389. Scemes, E., and Giaume, C. (2006). Astrocyte calcium waves: What they are and what they do. *Glia* 54, 716–725. doi: 10.1002/glia.20374.

390. Scheltens, N. M. E., Galindo-Garre, F., Pijnenburg, Y. A. L., van der Vlies, A. E., Smits, L. L., Koene, T., et al. (2016a). The identification of cognitive subtypes in Alzheimer's disease dementia using latent class analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87, 235–243. doi: 10.1136/jnnp-2014-309582.

391. Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S., et al. (2016b). Alzheimer's disease. *The Lancet* 388, 505–517. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01124-1.

392. Schubert, D., Soucek, T., and Blouw, B. (2009). The induction of HIF-1 reduces astrocyte activation by amyloid beta peptide. *European Journal of Neuroscience* 29, 1323–1334. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06712.x.

393. Semenza, G. L. (2004). Hydroxylation of HIF-1: Oxygen Sensing at the Molecular Level. *Physiology* 19, 176–182. doi: 10.1152/physiol.00001.2004.
394. Semenza, G. L. (2017). Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *EMBO J* 36, 252–259. doi: 10.15252/embj.201695204.
395. Serocki, M., Bartoszewska, S., Janaszak-Jasiecka, A., Ochocka, R. J., Collawn, J. F., and Bartoszewski, R. (2018). miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target. *Angiogenesis* 21, 183–202. doi: 10.1007/s10456-018-9600-2.
396. Shang, J., Yamashita, T., Zhai, Y., Nakano, Y., Morihara, R., Fukui, Y., et al. (2016). Strong Impact of Chronic Cerebral Hypoperfusion on Neurovascular Unit, Cerebrovascular Remodeling, and Neurovascular Trophic Coupling in Alzheimer's Disease Model Mouse. *Journal of Alzheimer's Disease* 52, 113–126. doi: 10.3233/JAD-151126.
397. Sharma, M., Machuy, N., Böhme, L., Karunakaran, K., Mäurer, A. P., Meyer, T. F., et al. (2011). HIF-1 α is involved in mediating apoptosis resistance to *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *Cell Microbiol* 13, 1573–1585. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01642.x.
398. Shchelchkova, N. A., Kokaya, A. A., Bezhenar', V. F., Rozhdestvenskaya, O. V., Mamedova, M. A., Mishchenko, T. A., et al. (2020a). The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Chronic Fetal Oxygen Deprivation. *Sovremennye tehnologii v medicine* 12, 25. doi: 10.17691/stm2020.12.1.03.
399. Shchelchkova, N. A., Kokaya, A. A., Bezhenar', V. F., Rozhdestvenskaya, O. V., Mamedova, M. A., Mishchenko, T. A., et al. (2020b). The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Chronic Fetal Oxygen Deprivation. *Sovremennye tehnologii v medicine* 12, 25. doi: 10.17691/stm2020.12.1.03.
400. Sheldon, R. A., Lee, C. L., Jiang, X., Knox, R. N., and Ferriero, D. M. (2014). Hypoxic preconditioning protection is eliminated in HIF-1 α knockout mice

subjected to neonatal hypoxia–ischemia. *Pediatr Res* 76, 46–53. doi: 10.1038/pr.2014.53.

401. Sheldon, R. A., Osredkar, D., Lee, C. L., Jiang, X., Mu, D., and Ferrero, D. M. (2009). HIF-1 α -Deficient Mice Have Increased Brain Injury after Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Dev Neurosci* 31, 452–458. doi: 10.1159/000232563.

402. Shi, Z.-M., Han, Y.-W., Han, X.-H., Zhang, K., Chang, Y.-N., Hu, Z.-M., et al. (2016). Upstream regulators and downstream effectors of NF- κ B in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 366, 127–134. doi: 10.1016/j.jns.2016.05.022.

403. Shishkina, T. v., Mishchenko, T. A., Mitroshina, E. v., Shirokova, O. M., Pimashkin, A. S., Kastalskiy, I. A., et al. (2018). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) counteracts hypoxic damage to hippocampal neural network function in vitro. *Brain Res* 1678, 310–321. doi: 10.1016/j.brainres.2017.10.023.

404. Shishkina, T. V., Vedunova, M. V., Mishchenko, T. A., and Mukhina, I. V. (2015). The Role of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in the Functioning of the Nervous System (Review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 7, 211–220. doi: 10.17691/stm2015.7.4.27.

405. Shu, L., Wang, C., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, X., Yang, Y., et al. (2016). The neuroprotection of hypoxic preconditioning on rat brain against traumatic brain injury by up-regulated transcription factor Nrf2 and HO-1 expression. *Neurosci Lett* 611, 74–80. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.012.

406. Shulga, A., and Rivera, C. (2013). Interplay between thyroxin, BDNF and GABA in injured neurons. *Neuroscience* 239, 241–252. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.007.

407. Siddiq, A., Ayoub, I. A., Chavez, J. C., Aminova, L., Shah, S., LaManna, J. C., et al. (2005). Hypoxia-inducible Factor Prolyl 4-Hydroxylase Inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 280, 41732–41743. doi: 10.1074/jbc.M504963200.

408. Siegel, G. J., and Chauhan, N. B. (2000). Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Rev* 33, 199–227. doi: 10.1016/S0165-0173(00)00030-8.
409. Siesjö, B. K., Elmér, E., Janelidze, S., Keep, M., Kristián, T., Ouyang, Y.-B., et al. (1999). "Role and Mechanisms of Secondary Mitochondrial Failure," in *Current Progress in the Understanding of Secondary Brain Damage from Trauma and Ischemia* (Vienna: Springer Vienna), 7–13. doi: 10.1007/978-3-7091-6391-7_2.
410. Simões Pires, E. N., Frozza, R. L., Hoppe, J. B., Menezes, B. de M., and Salbego, C. G. (2014). Berberine was neuroprotective against an in vitro model of brain ischemia: Survival and apoptosis pathways involved. *Brain Res* 1557, 26–33. doi: 10.1016/j.brainres.2014.02.021.
411. Singh, E., and Devasahayam, G. (2020). Neurodegeneration by oxidative stress: a review on prospective use of small molecules for neuroprotection. *Mol Biol Rep* 47, 3133–3140. doi: 10.1007/s11033-020-05354-1.
412. Singh, S., and Joshi, N. (2017). Astrocytes: inexplicable cells in neurodegeneration. *International Journal of Neuroscience* 127, 204–209. doi: 10.3109/00207454.2016.1173692.
413. Sjöstrand, D., and Ibáñez, C. F. (2008). Insights into GFR α 1 Regulation of Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Function from Structure-Function Analysis of the NCAM/GFR α 1 Receptor Complex. *Journal of Biological Chemistry* 283, 13792–13798. doi: 10.1074/jbc.M800283200.
414. Skaper, S. D. (2018). "Neurotrophic Factors: An Overview," in, 1–17. doi: 10.1007/978-1-4939-7571-6_1.
415. Snigdha, S., Smith, E. D., Prieto, G. A., and Cotman, C. W. (2012). Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. *Neurosci Bull* 28, 14–24. doi: 10.1007/s12264-012-1057-5.
416. Snyder, B., Shell, B., Cunningham, J. T., and Cunningham, R. L. (2017). Chronic intermittent hypoxia induces oxidative stress and inflammation in brain regions associated with early-stage neurodegeneration. *Physiol Rep* 5, e13258. doi: 10.14814/phy2.13258.

417. Solis, , Ernesto, Hascup, K. N., and Hascup, E. R. (2020). Alzheimer's Disease: The Link Between Amyloid- β and Neurovascular Dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease* 76, 1179–1198. doi: 10.3233/JAD-200473.
418. Soria Lopez, J. A., González, H. M., and Léger, G. C. (2019). "Alzheimer's disease," in, 231–255. doi: 10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3.
419. Sowter, H. M., Ratcliffe, P. J., Watson, P., Greenberg, A. H., and Harris, A. L. (2001). HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 61, 6669–73.
420. Speer, R. E., Karuppagounder, S. S., Basso, M., Sleiman, S. F., Kumar, A., Brand, D., et al. (2013). Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases as targets for neuroprotection by "antioxidant" metal chelators: From ferroptosis to stroke. *Free Radic Biol Med* 62, 26–36. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.026.
421. Stavchansky., Tvorogova T.V., Botsina A.Iu., Skvortsova V.I., Limborskaia S.A., et al. (2011). The effect of semax and its C-end peptide PGP on expression of the neurotrophins and their receptors in the rat brain during incomplete global ischemia. *Mol. Biol. (Mosk.)* 45. 1026–1035
422. Stein, T. D., and Crary, J. F. (2020). Chronic Traumatic Encephalopathy and Neuropathological Comorbidities. *Semin Neurol* 40, 384–393. doi: 10.1055/s-0040-1713628.
423. Sun, S., Hu, F., Wu, J., and Zhang, S. (2017). Cannabidiol attenuates OGD/R-induced damage by enhancing mitochondrial bioenergetics and modulating glucose metabolism via pentose-phosphate pathway in hippocampal neurons. *Redox Biol* 11, 577–585. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.029.
424. Suzuki, H., Tomida, A., and Tsuruo, T. (2001). Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1 α as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene* 20, 5779–5788. doi: 10.1038/sj.onc.1204742.
425. Suzuki, K., and Monteggia, L. M. (2020). "The role of eEF2 kinase in the rapid antidepressant actions of ketamine," in, 79–99. doi: 10.1016/bs.apha.2020.04.005.

426. Sveinsson, Ó. Á., Kjartansson, Ó., and Valdimarsson, E. M. (2014). Heilablóðþurrð / heiladrep. Faraldsfræði, orsakir og einkenni. *Laeknabladid* 2014, 271–279. doi: 10.17992/lbl.2014.05.543.
427. Tarkowska, A. (2021). Hypoxic-Ischemic Brain Injury after Perinatal Asphyxia as a Possible Factor in the Pathology of Alzheimer's Disease.
428. Tecuapetla, F., Matias, S., Dugue, G. P., Mainen, Z. F., and Costa, R. M. (2014). Balanced activity in basal ganglia projection pathways is critical for contraversive movements. *Nat Commun* 5, 4315. doi: 10.1038/ncomms5315.
429. Theis, M., and Giaume, C. (2012). Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res* 1487, 88–98. doi: 10.1016/j.brainres.2012.06.045.
430. Thomas, S., Prins, M. L., Samii, M., and Hovda, D. A. (2000). Cerebral Metabolic Response to Traumatic Brain Injury Sustained Early in Development: A 2-Deoxy-D-Glucose Autoradiographic Study. *J Neurotrauma* 17, 649–665. doi: 10.1089/089771500415409.
431. Tiwari, V., Mishra, A., Singh, S., Mishra, S. K., Sahu, K. K., Parul, et al. (2021). Protriptyline improves spatial memory and reduces oxidative damage by regulating NFκB-BDNF/CREB signaling axis in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1754, 147261. doi: 10.1016/j.brainres.2020.147261.
432. Tobon-Velasco, J., Cuevas, E., and Torres-Ramos, M. (2014). Receptor for AGEs (RAGE) as Mediator of NF-κB Pathway Activation in Neuroinflammation and Oxidative Stress. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13, 1615–1626. doi: 10.2174/1871527313666140806144831.
433. Trachootham, D., Alexandre, J., and Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 8, 579–591. doi: 10.1038/nrd2803.
434. Trojanowski, J. Q., and Mattson, M. P. (2003). Overview of Protein Aggregation in Single, Double, and Triple Neurodegenerative Brain Amyloidoses. *Neuromolecular Med* 4, 1–6. doi: 10.1385/NMM:4:1-2:1.

435. Tsai, H.-H., Li, H., Fuentealba, L. C., Molofsky, A. v., Taveira-Marques, R., Zhuang, H., et al. (2012). Regional Astrocyte Allocation Regulates CNS Synaptogenesis and Repair. *Science* (1979) 337, 358–362. doi: 10.1126/science.1222381.
436. Tynan, R. J., Beynon, S. B., Hinwood, M., Johnson, S. J., Nilsson, M., Woods, J. J., et al. (2013). Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes. *Acta Neuropathol* 126, 75–91. doi: 10.1007/s00401-013-1102-0.
437. Ulland, T. K., Ewald, A. C., Knutson, A. O., Marino, K. M., Smith, S. M. C., and Watters, J. J. (2021). Alzheimer’s Disease, Sleep Disordered Breathing, and Microglia: Puzzling out a Common Link. *Cells* 10, 2907. doi: 10.3390/cells10112907.
438. Ünal-Çevik, I., Kılınç, M., Can, A., Gürsoy-Özdemir, Y., and Dalkara, T. (2004). Apoptotic and Necrotic Death Mechanisms Are Concomitantly Activated in the Same Cell After Cerebral Ischemia. *Stroke* 35, 2189–2194. doi: 10.1161/01.STR.0000136149.81831.c5.
439. Urazov, M. D., Astrakhanova, T. A., Usenko, A. V., Mishchenko, T. A., Schelchkova, N. A., Kravchenko, G. A., et al. (2018). New Aspects of Central Nervous System Adaptation to Prenatal Hypoxia. *Sovremennyye tehnologii v medicine* 10, 60. doi: 10.17691/stm2018.10.4.07.
440. van den Heuvel, C., Thornton, E., and Vink, R. (2007). Traumatic brain injury and Alzheimer’s disease: a review. *Prog Brain Res* 161, 303–16. doi: 10.1016/S0079-6123(06)61021-2.
441. Vardy, E. R. L. C., Catto, A. J., and Hooper, N. M. (2005). Proteolytic mechanisms in amyloid- β metabolism: therapeutic implications for Alzheimer’s disease. *Trends Mol Med* 11, 464–472. doi: 10.1016/j.molmed.2005.08.004.
442. Vasile, F., Dossi, E., and Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct* 222, 2017–2029. doi: 10.1007/s00429-017-1383-5.

443. Vedunova, M. v., Mishchenko, T. A., Mitroshina, E. v., and Mukhina, I. v. (2015). TrkB-mediated neuroprotective and antihypoxic properties of brain-derived neurotrophic factor. *Oxid Med Cell Longev* 2015. doi: 10.1155/2015/453901.
444. Vedunova, M. v., Mishchenko, T. A., Mitroshina, E. v., Ponomareva, N. v., Yudintsev, A. v., Generalova, A. N., et al. (2016). Cytotoxic effects of upconversion nanoparticles in primary hippocampal cultures. *RSC Adv* 6, 33656–33665. doi: 10.1039/C6RA01272H.
445. Vedunova, M., Mishchenko, T., Shishkina, T., Mitroshina, E., Shorokova, O., Pimashkin, A., et al. (2016). Glial cell line-derived neurotrophic factor as a new approach for functional neural networks reorganization in oxygen stress conditions. in *Conference Abstract: MEA Meeting 2016 10th International Meeting on Substrate-Integrated Electrode Arrays* (Reutlingen: Front. Neurosci.).
446. Verkhatsky, A. (2019). Astroglial Calcium Signaling in Aging and Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11, a035188. doi: 10.1101/cshperspect.a035188.
447. Verkhatsky, A., Rodrigues, J. J., Pivoriunas, A., Zorec, R., and Semyanov, A. (2019). Astroglial atrophy in Alzheimer's disease. *Pflugers Arch* 471, 1247–1261. doi: 10.1007/s00424-019-02310-2.
448. Verkhatsky, A., Rodríguez-Arellano, J. J., Parpura, V., and Zorec, R. (2017). Astroglial calcium signalling in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 483, 1005–1012. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.088.
449. Vetrovoy, O., Sarieva, K., Lomert, E., Nimiritsky, P., Eschenko, N., Galkina, O., et al. (2020). Pharmacological HIF1 Inhibition Eliminates Downregulation of the Pentose Phosphate Pathway and Prevents Neuronal Apoptosis in Rat Hippocampus Caused by Severe Hypoxia. *Journal of Molecular Neuroscience* 70, 635–646. doi: 10.1007/s12031-019-01469-8.
450. Wagenaar, D. A. (2005). Controlling Bursting in Cortical Cultures with Closed-Loop Multi-Electrode Stimulation. *Journal of Neuroscience* 25, 680–688. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4209-04.2005.

451. Wagenaar, D. A., Pine, J., and Potter, S. M. (2006). An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neurosci* 7, 11. doi: 10.1186/1471-2202-7-11.
452. Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., et al. (2003). Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet* 35, 238–245. doi: 10.1038/ng1248.
453. Walker, L. C., Diamond, M. I., Duff, K. E., and Hyman, B. T. (2013). Mechanisms of Protein Seeding in Neurodegenerative Diseases. *JAMA Neurol* 70, 304. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.1453.
454. Walmsley, S. R., Print, C., Farahi, N., Peyssonnaud, C., Johnson, R. S., Cramer, T., et al. (2005). Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *Journal of Experimental Medicine* 201, 105–115. doi: 10.1084/jem.20040624.
455. Walsh, P., Sudre, C. H., Fiford, C. M., Ryan, N. S., Lashley, T., Frost, C., et al. (2020). CSF amyloid is a consistent predictor of white matter hyperintensities across the disease course from aging to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 91, 5–14. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2020.03.008.
456. Wan, F., and Lenardo, M. J. (2010). The nuclear signaling of NF- κ B: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res* 20, 24–33. doi: 10.1038/cr.2009.137.
457. Wang, D., Gao, Z., and Zhang, X. (2018). Resveratrol Induces Apoptosis in Murine Prostate Cancer Cells via Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha (HIF-1 α)/Reactive Oxygen Species (ROS)/P53 Signaling. *Medical Science Monitor* 24, 8970–8976. doi: 10.12659/MSM.913290.
458. Wang, J., Wang, F., Wang, Z., Li, S., Chen, L., Liu, C., et al. (2018). Protective effect of GDNF -engineered amniotic fluid-derived stem cells on the renal ischaemia reperfusion injury in vitro. *Cell Prolif* 51, e12400. doi: 10.1111/cpr.12400.

459. Wang, L., Liu, H., Zhang, L., Wang, G., Zhang, M., and Yu, Y. (2017). Neuroprotection of Dexmedetomidine against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats: Involved in Inhibition of NF- κ B and Inflammation Response. *Biomol Ther (Seoul)* 25, 383–389. doi: 10.4062/biomolther.2015.180.
460. Wang, N., Zhang, Y., Xu, L., and Jin, S. (2019a). Relationship Between Alzheimer's Disease and the Immune System: A Meta-Analysis of Differentially Expressed Genes. *Front Neurosci* 12. doi: 10.3389/FNINS.2018.01026.
461. Wang, P., Guan, D., Zhang, X., Liu, F., and Wang, W. (2019). Modeling the regulation of p53 activation by HIF-1 upon hypoxia. *FEBS Lett* 593, 2596–2611. doi: 10.1002/1873-3468.13525.
462. Wang, R., Zhang, X., Zhang, J., Fan, Y., Shen, Y., Hu, W., et al. (2012). Oxygen-Glucose Deprivation Induced Glial Scar-Like Change in Astrocytes. *PLoS One* 7, e37574. doi: 10.1371/journal.pone.0037574.
463. Wang, X. (2013). Structural studies of GDNF family ligands with their receptors—Insights into ligand recognition and activation of receptor tyrosine kinase RET. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1834, 2205–2212. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.10.008.
464. Wang, Y.-Y., Huang, Z.-T., Yuan, M.-H., Jing, F., Cai, R.-L., Zou, Q., et al. (2021). Role of Hypoxia Inducible Factor-1 α in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 80, 949–961. doi: 10.3233/JAD-201448.
465. Wang, Z. H., Xiang, J., Liu, X., Yu, S. P., Manfredsson, F. P., Sandoval, I. M., et al. (2019b). Deficiency in BDNF/TrkB Neurotrophic Activity Stimulates δ -Secretase by Upregulating C/EBP β in Alzheimer's Disease. *Cell Rep* 28, 655–669.e5. doi: 10.1016/J.CELREP.2019.06.054.
466. Weissmiller, A. M., and Wu, C. (2012). Current advances in using neurotrophic factors to treat neurodegenerative disorders. *Transl Neurodegener* 1, 14. doi: 10.1186/2047-9158-1-14.
467. When the Brain Yearns for Oxygen (2019). *Neurosignals* 27, 50–61. doi: 10.33594/000000199.

468. Wilkes, A. L., and Wade, N. J. (1997). Bain on Neural Networks. *Brain Cogn* 33, 295–305. doi: 10.1006/brcg.1997.0869.
469. Wolf, A., Agnihotri, S., Micallef, J., Mukherjee, J., Sabha, N., Cairns, R., et al. (2011). Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *Journal of Experimental Medicine* 208, 313–326. doi: 10.1084/jem.20101470.
470. Wong, B. W., Kuchnio, A., Bruning, U., and Carmeliet, P. (2013). Emerging novel functions of the oxygen-sensing prolyl hydroxylase domain enzymes. *Trends Biochem Sci* 38, 3–11. doi: 10.1016/j.tibs.2012.10.004.
471. Wong, B. W., Kuchnio, A., Bruning, U., and Carmeliet, P. (2013). Emerging novel functions of the oxygen-sensing prolyl hydroxylase domain enzymes. *Trends Biochem Sci* 38, 3–11. doi: 10.1016/j.tibs.2012.10.004.
472. Wood, I. S., and Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition* 89, 3–9. doi: 10.1079/BJN2002763.
473. Wu, C.-S., Chang, I. Y.-F., Hung, J., Liao, W.-C., Lai, Y.-R., Chang, K.-P., et al. (2020). ASC modulates HIF-1 α stability and induces cell mobility in OSCC. *Cell Death Dis* 11, 721. doi: 10.1038/s41419-020-02927-7.
474. Wu, S.-H., Lu, I.-C., Lee, S.-S., Kwan, A.-L., Chai, C.-Y., and Huang, S.-H. (2018). Erythropoietin attenuates motor neuron programmed cell death in a burn animal model. *PLoS One* 13, e0190039. doi: 10.1371/journal.pone.0190039.
475. Wu, Z., Zhang, W., and Kang, Y. J. (2019). Copper affects the binding of HIF-1 α to the critical motifs of its target genes. *Metallomics* 11, 429–438. doi: 10.1039/C8MT00280K.
476. Wyss, M. T., Jolivet, R., Buck, A., Magistretti, P. J., and Weber, B. (2011). In Vivo Evidence for Lactate as a Neuronal Energy Source. *Journal of Neuroscience* 31, 7477–7485. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0415-11.2011.

477. Xiang, G., Pan, L., Huang, L., Yu, Z., Song, X., Cheng, J., et al. (2007). Microelectrode array-based system for neuropharmacological applications with cortical neurons cultured in vitro. *Biosens Bioelectron* 22, 2478–2484. doi: 10.1016/j.bios.2006.09.026.
478. Xing, X., Liang, G., Blanton, H., Rafique, M. U., Wang, C., Lin, A.-L., et al. (2020). Dynamic Image for 3D MRI Image Alzheimer's Disease Classification. doi: 10.1007/978-3-030-66415-2_23.
479. Xu, S., Liu, J., Zhang, Y., Wang, C., Wang, J., Yang, Y., et al. (2012). Apoptosis-related protein expression in rabbits with blast brain injury following early hyperbaric oxygen therapy. *Neural Regen Res* 7, 1318–24. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.17.006.
480. Yagishita, S., and Hirasawa, A. (2017). Intermittent hypoxia produces Alzheimer disease? *Oncotarget* 8, 41786–41787. doi: 10.18632/oncotarget.18214.
481. Yamagata, K. (2020). Astrocytic nutritional dysfunction associated with hypoxia-induced neuronal vulnerability in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Neurochem Int* 138, 104786. doi: 10.1016/j.neuint.2020.104786.
482. Yamaki, T., Uchino, Y., Henmi, H., Kamezawa, M., Hayakawa, M., Uchida, T., et al. (2018). Increased brain glucose metabolism in chronic severe traumatic brain injury as determined by longitudinal 18F-FDG PET/CT. *Journal of Clinical Neuroscience* 57, 20–25. doi: 10.1016/j.jocn.2018.08.052.
483. Yamanaka, K., and Komine, O. (2018). The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neurosci Res* 126, 31–38. doi: 10.1016/j.neures.2017.09.011.
484. Yamazaki, Y., and Kanekiyo, T. (2017). Blood-Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 18, 1965. doi: 10.3390/ijms18091965.
485. Yang, J., Harte-Hargrove, L. C., Siao, C.-J., Marinic, T., Clarke, R., Ma, Q., et al. (2014). proBDNF Negatively Regulates Neuronal Remodeling, Synaptic Transmission, and Synaptic Plasticity in Hippocampus. *Cell Rep* 7, 796–806. doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.040.

486. Yang, S., Yan, T., Wu, H., Xiao, Q., Fu, H. M., Luo, J., et al. (2017a). Acute hypoxic stress: Effect on blood parameters, antioxidant enzymes, and expression of HIF-1 α and GLUT-1 genes in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Fish Shellfish Immunol* 67, 449–458. doi: 10.1016/j.fsi.2017.06.035.
487. Yang, S.-H., and Liu, R. (2021). Four Decades of Ischemic Penumbra and Its Implication for Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res* 12, 937–945. doi: 10.1007/s12975-021-00916-2.
488. Yang, W., Ma, J., Zhou, W., Cao, B., Zhou, X., Zhang, H., et al. (2019a). Reciprocal regulations between miRNAs and HIF-1 α in human cancers. *Cellular and Molecular Life Sciences* 76, 453–471. doi: 10.1007/s00018-018-2941-6.
489. Yang, X.-L., Zeng, M.-L., Shao, L., Jiang, G.-T., Cheng, J.-J., Chen, T.-X., et al. (2019b). NFAT5 and HIF-1 α Coordinate to Regulate NKCC1 Expression in Hippocampal Neurons After Hypoxia-Ischemia. *Front Cell Dev Biol* 7. doi: 10.3389/fcell.2019.00339.
490. Yang, X.-S., Yi, T.-L., Zhang, S., Xu, Z.-W., Yu, Z.-Q., Sun, H.-T., et al. (2017b). Hypoxia-inducible factor-1 α is involved in RIP-induced necroptosis caused by in vitro and in vivo ischemic brain injury. *Sci Rep* 7, 5818. doi: 10.1038/s41598-017-06088-0.
491. Yasutake, C., Kuroda, K., Yanagawa, T., Okamura, T., and Yoneda, H. (2006). Serum BDNF, TNF- α and IL-1 β levels in dementia patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256, 402–406. doi: 10.1007/s00406-006-0652-8.
492. Yasutake, C., Kuroda, K., Yanagawa, T., Okamura, T., and Yoneda, H. (2006). Serum BDNF, TNF- α and IL-1 β levels in dementia patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256, 402–406. doi: 10.1007/s00406-006-0652-8.
493. Yi, C., Koulakoff, A., and Giaume, C. (2018). Astroglial Connexins as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des* 23. doi: 10.2174/1381612823666171004151215.

494. Yin, F., Sancheti, H., Patil, I., and Cadenas, E. (2016). Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 100, 108–122. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.200.
495. Yoo, S.-Y., Yoo, J.-Y., Kim, H.-B., Baik, T.-K., Lee, J.-H., and Woo, R.-S. (2019). Neuregulin-1 Protects Neuronal Cells Against Damage due to CoCl₂-Induced Hypoxia by Suppressing Hypoxia-Inducible Factor-1 α and P53 in SH-SY5Y Cells. *Int Neurourol J* 23, S111-118. doi: 10.5213/inj.1938190.095.
496. Yu, S.-J., Tseng, K.-Y., Shen, H., Harvey, B. K., Airavaara, M., and Wang, Y. (2013). Local Administration of AAV-BDNF to Subventricular Zone Induces Functional Recovery in Stroke Rats. *PLoS One* 8, e81750. doi: 10.1371/journal.pone.0081750.
497. Yu, S.-J., Tseng, K.-Y., Shen, H., Harvey, B. K., Airavaara, M., and Wang, Y. (2013). Local Administration of AAV-BDNF to Subventricular Zone Induces Functional Recovery in Stroke Rats. *PLoS One* 8, e81750. doi: 10.1371/journal.pone.0081750.
498. Yuste, R. (2015). From the neuron doctrine to neural networks. *Nat Rev Neurosci* 16, 487–497. doi: 10.1038/nrn3962.
499. Zetterberg, H., Mörtberg, E., Song, L., Chang, L., Provuncher, G. K., Patel, P. P., et al. (2011). Hypoxia Due to Cardiac Arrest Induces a Time-Dependent Increase in Serum Amyloid β Levels in Humans. *PLoS One* 6, e28263. doi: 10.1371/journal.pone.0028263.
500. Zhang, G., Chen, L., Liu, J., Jin, Y., Lin, Z., Du, S., et al. (2020a). HIF-1 α /microRNA-128-3p axis protects hippocampal neurons from apoptosis via the Axin1 -mediated Wnt/ β -catenin signaling pathway in Parkinson's disease models. *Aging* 12, 4067–4081. doi: 10.18632/aging.102636.
501. Zhang, J., Cheng, W., Liu, Z., Zhang, K., Lei, X., Yao, Y., et al. (2016). Neural, electrophysiological and anatomical basis of brain-network variability and its characteristic changes in mental disorders. *Brain* 139, 2307–2321. doi: 10.1093/brain/aww143.

502. Zhang, J., Yu, Z., Yu, Z., Yang, Z., Zhao, H., Liu, L., et al. (2011). rAAV-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor promotes neurite outgrowth and protects neurodegeneration in focal ischemic model. *Int J Clin Exp Pathol* 4, 496–504.
503. Zhang, L., Qu, Y., Yang, C., Tang, J., Zhang, X., Mao, M., et al. (2009). Signaling pathway involved in hypoxia-inducible factor-1 α regulation in hypoxic-ischemic cortical neurons in vitro. *Neurosci Lett* 461, 1–6. doi: 10.1016/j.neulet.2009.03.091.
504. Zhang, X., Zhou, K., Wang, R., Cui, J., Lipton, S. A., Liao, F.-F., et al. (2007). Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α)-mediated Hypoxia Increases BACE1 Expression and β -Amyloid Generation. *Journal of Biological Chemistry* 282, 10873–10880. doi: 10.1074/jbc.M608856200.
505. Zhang, X., Zhou, Y., Li, H., Wang, R., Yang, D., Li, B., et al. (2018). Intravenous administration of DPSCs and BDNF improves neurological performance in rats with focal cerebral ischemia. *Int J Mol Med*. doi: 10.3892/ijmm.2018.3517.
506. Zhang, X.-Y., Cao, J.-B., Zhang, L.-M., Li, Y.-F., and Mi, W.-D. (2015). Deferoxamine attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment in mice. *J Neuroinflammation* 12, 20. doi: 10.1186/s12974-015-0238-3.
507. Zhang, Y., Yan, X., Xu, S., Pang, Z., Li, L., Yang, Y., et al. (2020b). α -Lipoic Acid Maintains Brain Glucose Metabolism via BDNF/TrkB/HIF-1 α Signaling Pathway in P301S Mice. *Front Aging Neurosci* 12. doi: 10.3389/fnagi.2020.00262.
508. Zhang, Z., Sun, G. Y., and Ding, S. (2021). Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor and Focal Ischemic Stroke. *Neurochem Res* 46, 2638–2650. doi: 10.1007/s11064-021-03266-5.

509. Zhao, H., Alam, A., San, C.-Y., Eguchi, S., Chen, Q., Lian, Q., et al. (2017). Molecular mechanisms of brain-derived neurotrophic factor in neuro-protection: Recent developments. *Brain Res* 1665, 1–21. doi: 10.1016/j.brainres.2017.03.029.
510. Zhao, H., Alam, A., San, C.-Y., Eguchi, S., Chen, Q., Lian, Q., et al. (2017). Molecular mechanisms of brain-derived neurotrophic factor in neuro-protection: Recent developments. *Brain Res* 1665, 1–21. doi: 10.1016/j.brainres.2017.03.029.
511. Zheng, H., Niu, S., Zhao, H., Li, S., and Jiao, J. (2018). Donepezil improves the cognitive impairment in a tree shrew model of Alzheimer's disease induced by amyloid- β 1–40 via activating the BDNF/TrkB signal pathway. *Metab Brain Dis* 33, 1961–1974. doi: 10.1007/s11011-018-0303-6.
512. Zheng, Z., Sabirzhanov, B., and Keifer, J. (2010). Oligomeric Amyloid- β Inhibits the Proteolytic Conversion of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), AMPA Receptor Trafficking, and Classical Conditioning. *Journal of Biological Chemistry* 285, 34708–34717. doi: 10.1074/jbc.M110.150821.
513. Zhou, J., Burns, M. P., Huynh, L., Villapol, S., Taub, D. D., Saavedra, J. M., et al. (2017). Temporal Changes in Cortical and Hippocampal Expression of Genes Important for Brain Glucose Metabolism Following Controlled Cortical Impact Injury in Mice. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8. doi: 10.3389/fendo.2017.00231.
514. Zhuravin, I. A., Dubrovskaya, N. M., Vasilev, D. S., Postnikova, T. Yu., and Zaitsev, A. v. (2019). Prenatal hypoxia produces memory deficits associated with impairment of long-term synaptic plasticity in young rats. *Neurobiol Learn Mem* 164, 107066. doi: 10.1016/j.nlm.2019.107066.
515. Ziemlińska, E., Kügler, S., Schachner, M., Wewiór, I., Czarkowska-Bauch, J., and Skup, M. (2014). Overexpression of BDNF Increases Excitability of the Lumbar Spinal Network and Leads to Robust Early Locomotor Recovery in Completely Spinalized Rats. *PLoS One* 9, e88833. doi: 10.1371/journal.pone.0088833.

Приложения

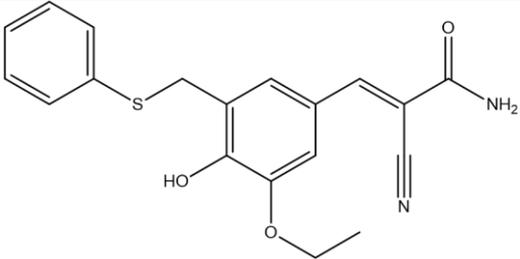
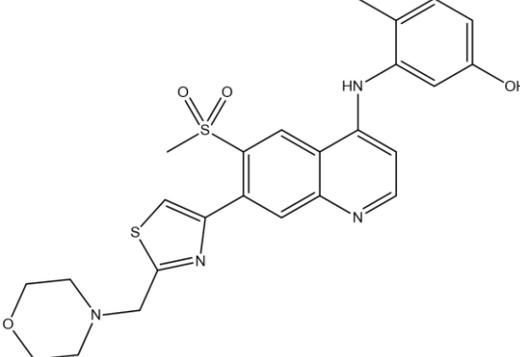
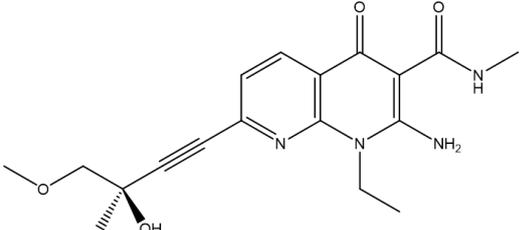
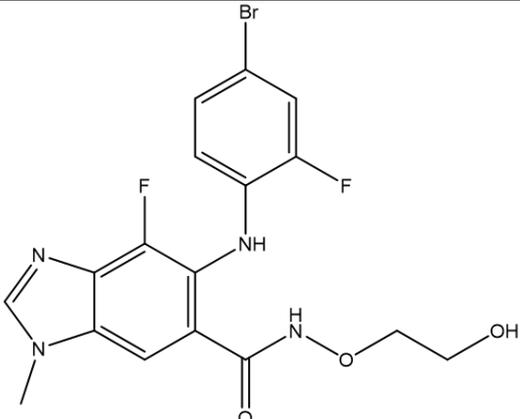
Приложение 1.

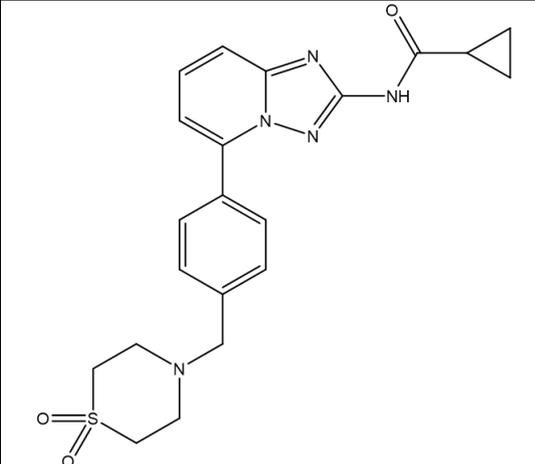
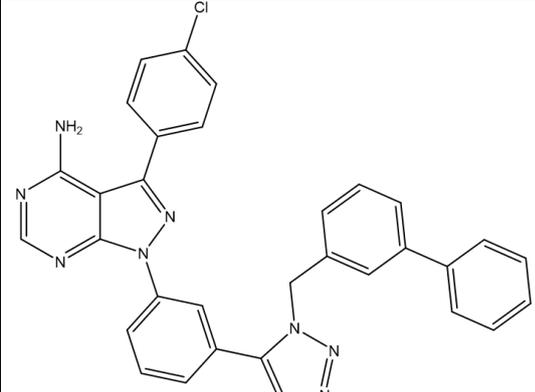
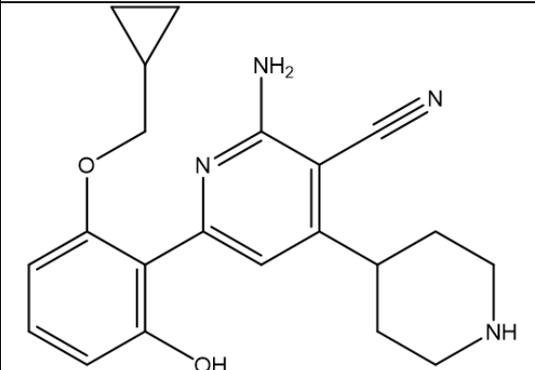
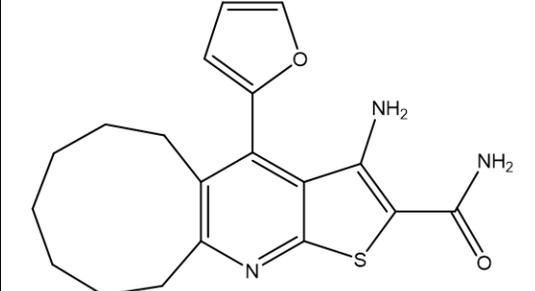
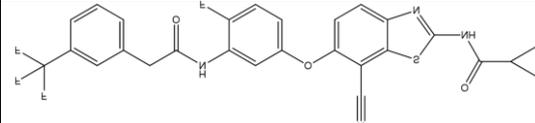
Список антител, используемых для выполнения иммуногистохимического анализа

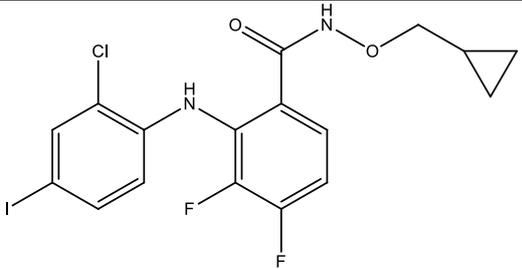
Первичные антитела			
Мишень	Маркерный антиген	Антитело	Производитель, каталожный номер
Нейроны	β III-tubulin	Антитела морской свинки к β III-tubulin	Synaptic systems, cat#302304, Germany
	MAP2	Кроличьи антитела к MAP2	Abcam, ab32454, Великобритания
Астроциты	GFAP	Мышиные антитела к GFAP Куриные антитела к GFAP	Sigma-Aldrich G3893, Merck KGaA, Германия Abcam, Ab4674, Великобритания
Микроглия	Iba1	Куриные антитела к Iba1	Synaptic systems, cat#234006, Германия
В-амилоид	V-amyloid	Куриные антитела к A β	Abcam, ab2539, Великобритания
BDNF	BDNF	Кроличьи антитела к BDNF	Abcam, ab108319, Великобритания
Вторичные антитела			
Используемое антитело			Производитель, каталожный номер
Козьи антитела к антителам курицы с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 555			Thermo Fisher Scientific, A-21437, США
Куриные антитела к антителам кролика с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488			Thermo Fisher Scientific, A21441, США
Козьи антитела к антителам мыши с флуоресцентной меткой Alexa 647			Thermo Fisher Scientific, A21236, США
Козьи антитела к антителам морской свинки с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 647			Thermo Fisher Scientific, A-21450, США

Приложение 2

Химическая структура ингибиторов киназ

Ингибируемая киназа(ы)	Ингибитор	Химическая формула	Структурная формула
TrkB	ST638, ST-6385	$C_{19}H_{18}N_2O_3S$	
RET	RET Inhibitor	$C_{25}H_{26}N_4O_4S_2$	
FLT4 (VEGFR3)	SAR-131675	$C_{18}H_{22}N_4O_4$	
MAP2K1 (MEK1), MAP2K2 (MEK2)	Binimetinib, ARRY-162, ARRY-438162, MEK-162	$C_{17}H_{15}BrF_2N_4O_3$	

JAK1, JAK2	Filgotinib, G-146034, GLPG-0634	$C_{21}H_{23}N_5O_3S$	
SRC (c-SRC)	Compound4	$C_{32}H_{23}ClN_8$	
IKKb (IKK2)	ACHP	$C_{21}H_{24}N_4O_2$	
eEF2K	Compound 34	$C_{19}H_{21}N_3O_2S$	
RAF1 (c-Raf)	TAK-632	$C_{27}H_{18}F_4N_4O_3S$	

<p>MAP2K1/2, Erk2, RAF1</p>	<p>PD-184352</p>	<p>$C_{17}H_{14}ClF_2IN_2O_2$</p>	
<p>AKT-1</p>	<p>10-DEBC hydrochloride</p>	<p>$C_{20}H_{26}Cl_2N_2O$</p>	