

УЧАСТИЕ ЭНДОКАННАБИНОИДНОЙ СИСТЕМЫ В АДАПТАЦИИ НЕЙРОН-ГЛИАЛЬНЫХ СЕТЕЙ К ФАКТОРАМ ИШЕМИИ *in vitro*

DOI: 10.17691/stm2017.9.4.08

УДК 576/577:616–005.6

Поступила 22.05.2017 г.



Е.В. Митрошина, к.б.н., доцент кафедры нейротехнологии Института биологии и биомедицины; старший научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий¹; старший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ²;

Т.А. Мищенко, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий¹; старший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ²;

Н.В. Воронова, магистр кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹;

Р.С. Ярков, магистр кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹;

Д.С. Асютин, к.м.н., научный сотрудник отделения спинальной нейрохирургии и хирургии периферических нервов³;

М.А. Мищенко, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник кафедры теории колебаний и автоматического регулирования¹;

М.В. Ведунова, д.б.н., старший научный сотрудник Института биологии и биомедицины; директор Института биологии и биомедицины¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

²Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

³Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125047, 4-я Тверская-Ямская улица, 16

Цель исследования — оценить роль агониста каннабиноидных рецепторов и блокаторов активности ключевых ферментов биодegradации эндоканнабиноидов в адаптации нейрон-глиальных сетей к повреждающим факторам ишемии.

Материалы и методы. Материалом для исследований служили культуры диссоциированных клеток гиппокампа, полученные от эмбрионов мыши линии C57BL/6 18-го дня гестации. Моделирование гипоксии и глюкозной депривации проводили на 14-й день культивирования. Аппликацию синтетического аналога эндоканнабиноида N-арахидоноилдофамина (NADA) (10 мкМ), необратимого ингибитора моноацилглицерол липазы JZL184 (1 мкМ) и ингибитора обоих ключевых ферментов биодegradации эндоканнабиноида JZL195 (1 мкМ) в культуральную среду выполняли при моделировании факторов ишемии и непосредственно после него. Оценивали жизнеспособность клеток в культуре на 1, 3 и 7-е сутки после моделирования факторов ишемии. На 7-е сутки также проводили анализ спонтанной кальциевой активности диссоциированных культур с помощью мультিকлеточного функционального кальциевого имиджинга. Для выявления молекулярных механизмов нейропротекторного действия активации компонентов эндоканнабиноидной системы была исследована экспрессия мРНК CB_{1R}-рецепторов и индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 α с помощью флуоресцентных мРНК-зондов (SmartFlare, Merck, Германия).

Результаты. Установлено, что введение в культуральную среду агониста каннабиноидных рецепторов 1-го и 2-го типа NADA и блокатора ферментов MAGL и FAAH JZL195 оказывает нейропротекторное действие, проявляющееся в достоверном снижении количества мертвых клеток по сравнению с группами культур, подвергшихся действию факторов ишемии (гипоксии и глюкозной депривации). Кроме того, активация эндоканнабиноидной системы позволяет частично нивелировать индуцированные гипоксией и глюкозной депривацией *in vitro* изменения спонтанной кальциевой активности в культурах клеток гиппокампа, что выражается

Для контактов: Митрошина Елена Владимировна, e-mail: helenmitroshina@gmail.com

в поддержании числа клеток, проявляющих активность, а также в частичной нормализации длительности и частоты кальциевых осцилляций.

Выявлено, что применение синтетического аналога эндоканнабиоида NADA при моделировании гипоксии достоверно повышает экспрессию каннабиноидных рецепторов 1-го типа. При использовании NADA и JZL195 уровень экспрессии мРНК фактора HIF-1 α не отличался от показателей интактных культур.

Заключение. Применение N-арахидоноилдофамина (10 мкМ) и блокатора ферментов JZL195 оказывает нейропротекторный эффект при моделировании факторов ишемии, выражающийся в поддержании жизнеспособности и спонтанной кальциевой активности клеток первичных культур гиппокампа.

Ключевые слова: эндоканнабиноидная система; N-арахидоноилдофамин; NADA; JZL195; JZL184; ишемия мозга; гипоксия мозга; первичные культуры клеток гиппокампа; нейропротекция.

Как цитировать: Mitroshina E.V., Mishchenko T.A., Voronova N.V., Yarkov R.S., Asyutin D.S., Mishchenko M.A., Vedunova M.V. Endocannabinoid system participates in neuron-glia networks adaptation to modeled ischemia factors *in vitro*. Modern Technologies in Medicine 2017; 9(4): 66–77, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.4.08>

English

Endocannabinoid System Participates in Neuron-Glia Networks Adaptation to Modeled Ischemia Factors *in vitro*

E.V. Mitroshina, PhD, Associate Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine; Senior Researcher, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Center for Translational Technologies¹; Senior Researcher, Molecular Cellular Technologies Department, Central Scientific Research Laboratory²;

T.A. Mishchenko, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Center for Translational Technologies¹; Senior Researcher, Molecular Cellular Technologies Department, Central Scientific Research Laboratory²;

N.V. Voronova, MSc, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine¹;

R.S. Yarkov, MSc, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine¹;

D.S. Asyutin, MD, PhD, Researcher, Department of Spinal Neurosurgery and Surgery of Peripheral Nerves³;

M.A. Mishchenko, PhD, Senior Researcher, Department of Theory of Oscillations and Automatic Control¹;

M.V. Vedunova, DSc, Senior Researcher, Institute of Biology and Biomedicine; Director of Institute of Biology and Biomedicine¹

¹Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation;

²Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation;

³N.N. Burdenko National Scientific and Practical Center for Neurosurgery of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 16, 4th Tverskaya-Yamskaya St., Moscow, 125047, Russian Federation

The aim of the study was to evaluate the role of a cannabinoid receptor agonist and blockers of key enzymes of endocannabinoid biodegradation in the adaptation of neuron-glia networks to ischemia factors influence.

Materials and Methods. Dissociated hippocampal cells obtained from C57BL/6 murine embryos on the 18th day of gestation were cultivated as primary cultures. Two major factors of ischemia — hypoxia and glucose deprivation — were modeled on day 14 of culture development *in vitro*. Synthetic endocannabinoid N-arachidonoyl dopamine (NADA) at concentration of 10 μ M, irreversible inhibitor of monoacylglycerol lipase JZL184 (1 μ M) and inhibitor of two key enzymes of endocannabinoid biodegradation JZL195 (1 μ M) were added into the culture medium at the beginning of ischemia factors modeling or immediately after it. The cell viability was assessed on days 1, 3, and 7 after the influence of ischemia factors. On day 7, the spontaneous calcium activity in primary hippocampal cells was analyzed using the multicellular functional calcium imaging. To reveal the molecular neuroprotective mechanisms of the tested compounds, expression of mRNA CB_{1R} receptor and mRNA hypoxia-inducible factor HIF-1 α were measured using fluorescent mRNA detection probes (Smart Flare Merck, Germany).

Results. Application of NADA (the agonist of the cannabinoid type 1 and 2 receptors) or JZL195 (the MAGL/FAAH enzymes blocker) into the culture medium has been found to have a neuroprotective effect manifesting itself in a consistent cell death decrease compared with the control cultures. In addition, activation of the endocannabinoid system partially neutralizes the changes induced by hypoxia and glucose deprivation *in vitro*: the spontaneous calcium activity was detected in a greater number of cells (vs the control group), and the duration and frequency of calcium oscillations were partially normalized.

It was also found that NADA application during hypoxia significantly increased the type 1 cannabinoid receptors expression. When NADA and JZL195 were added the expression level of mRNA HIF-1 α factor did not differ from that of the intact cultures.

Conclusion. The synthetic endocannabinoid NADA and the enzyme blocker JZL195 have a pronounced neuroprotective effect on the modeled ischemia factors consisting in the increase of neuronal cell viability and a good functional calcium activity of primary hippocampal cultures in a long-term period after injury.

Key words: endocannabinoid system; N-arachidonoyl dopamine; NADA; JZL195; JZL184; brain ischemia; brain hypoxia; primary cultures of hippocampal cells; neuroprotection.

Актуальная задача современной неврологии — поиск соединений, обладающих нейропротекторным потенциалом и способных поддерживать функциональную активность нейронных сетей головного мозга, когнитивные и мнестические функции после ишемического повреждения, повышать адаптационные возможности организма.

За последние два десятилетия появились сведения, убедительно свидетельствующие о том, что эндогенные регуляторные системы играют важную роль в обеспечении устойчивости нервных клеток к различным повреждающим факторам [1–4]. Большой интерес вызывает нейропротекторный потенциал соединений, нацеленных на модуляцию активности эндоканнабиноидной системы (ЭКС). К этой системе относятся эндогенные лиганды каннабиноидных рецепторов и непосредственно рецепторы, расположенные на клеточной мембране, в первую очередь каннабиноидные рецепторы 1-го и 2-го типов (CB_{1R} и CB_{2R}), а также другие родственные рецепторы. К ЭКС также принадлежат ферменты, участвующие в биосинтезе и инактивации эндогенных лигандов [5, 6].

ЭКС является регуляторной системой, модулирующей различные физиологические процессы в организме. Одна из ключевых ее функций — регуляция синаптической передачи, также к ее функциям относится регуляция пищевого и эмоционального поведения, болевой чувствительности и т.д. ЭКС играет важную роль и в других системах организма, регулируя, например, активность иммунной системы. Каннабиноидные рецепторы, лиганды и ферменты биодegradации эндоканнабиноида — моноацилглицерол липаза (MAGL) и гидролаза амидов жирных кислот (FAAH) — были обнаружены во всех отделах нервной системы [7].

Нейропротекторные свойства ЭКС были показаны на различных моделях заболеваний и травм головного и спинного мозга, причем как для лигандов каннабиноидных рецепторов [4, 6, 8–14], так и для ингибиторов инактивации эндоканнабиноидов и аллостерических модуляторов активности ферментов ЭКС [15–20]. За последнее десятилетие сформировалось представление об ЭКС как одном из гомеостатических механизмов защиты организма, и прежде всего нервной системы, при травмах и действии различных повреждающих факторов [4, 6]. Каннабиноиды уменьшают повреждения нервной ткани при нейродегенеративных заболеваниях, оказывая антиоксидантное, противовоспалительное и антиапоптозное действие. Именно это комплексное воздействие на

разнообразные патогенетические молекулярные каскады, позволяющее эффективно защитить нервную ткань от повреждения, является важным преимуществом ЭКС перед соединениями, также обладающими нейропротекторным эффектом, но воздействующими только на один из путей реализации повреждающего действия ишемии, например блокаторы NMDA-рецепторов.

Очевидно, что в основе патогенеза большинства нейродегенеративных расстройств и заболеваний ЦНС лежит комбинация различных патогенетических каскадов, поэтому надежная стратегия сохранения функциональной активности нейронов требует сочетания защитных эффектов на всех или на большинстве этих молекулярных каскадов. Каннабиноидные рецепторы различных типов присутствуют на всех ключевых клетках нервной системы (нейроны, астроциты, покоящаяся и реактивная микроглия, олигодендроциты и клетки-предшественники олигодендроцитов, а также предшественники нейронов) во всех ключевых структурах головного мозга [6, 21]. Таким образом, используя ЭКС, можно одновременно уменьшить эксайтотоксичность путем активации каннабиноидных рецепторов 1-го типа, расположенных на нейронах (CB_{1R}), снизить негативные эффекты реактивного микроглиоза, воздействуя через микроглиальные каннабиноидные рецепторы 2-го типа (CB_{2R}), а также усилить трофическую и метаболическую поддержку нейронов при ишемическом повреждении, действуя через астроцитарные рецепторы CB_{1R} или CB_{2R} (рис. 1).

Следует отметить, что эффекты каннабиноидов могут реализовываться через механизмы, не связанные с каннабиноидными рецепторами/ферментами, но активирующие факторы транскрипции (например, Nrf-2 и NF- κ B) или ядерные рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором (PPAR) для ограничения окислительного стресса и воспалительных реакций [6, 22].

На сегодняшний день наиболее изученным способом активации ЭКС является экзогенное введение синтетических аналогов эндогенных каннабиноидов. Еще одним методом активации ЭКС служит применение ферментов, ингибирующих активность ферментов биодegradации эндоканнабиноидов (MAGL и FAAH). Их использование приводит к увеличению концентрации эндогенно синтезируемых каннабиноидов в тканях организма. Этот способ является весьма перспективным, однако относительно мало

изученным. S. Carloni с соавт. [16] показали, что применение ингибитора MAGL уменьшает апоптотическую и некротическую гибель клеток головного мозга экспериментальных животных при перинатальной гипоксии. Нейропротекторный эффект установлен при использовании ингибитора MAGL JZL184 в модели болезни Альцгеймера на мышах APdE9 [15]. Положительный эффект при блокаде гидролазы амидов жирных кислот продемонстрирован также на модели болезни Паркинсона [18].

Таким образом, исследования различных способов активации компонентов ЭКС и поиск оптимальных методических подходов, позволяющих защитить клетки нервной системы от повреждающих воздействий, в том числе ишемического, чрезвычайно актуальны.

Цель исследования — изучить влияние агониста каннабиноидных рецепторов и блокаторов активности ключевых ферментов биodeградации эндоканнабиноидов на адаптацию нейрон-глиальных сетей к повреждающим факторам ишемии.

Материалы и методы

Культивирование диссоциированных клеток гиппокампа. Материалом для исследований служили культуры диссоциированных клеток гиппокампа, полученных от 18-дневных эмбрионов мышей линии C57BL/6. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, указанным в приказе Минздрава России №267 от 19.06.03.

«Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации». Ферментативную диссоциацию клеток эмбрионального гиппокампа проводили при помощи обработки 0,25% раствором трипсина (Gibco, США). Культивирование первичных культур осуществляли в нейробазальной среде Neurobasal (Thermo Fisher Scientific, США) в комплексе с биоактивной добавкой B27 (Thermo Fisher Scientific, США), L-глутамином (Thermo Fisher Scientific, США), эмбриональной телячьей сывороткой («ПанЭко», Россия)

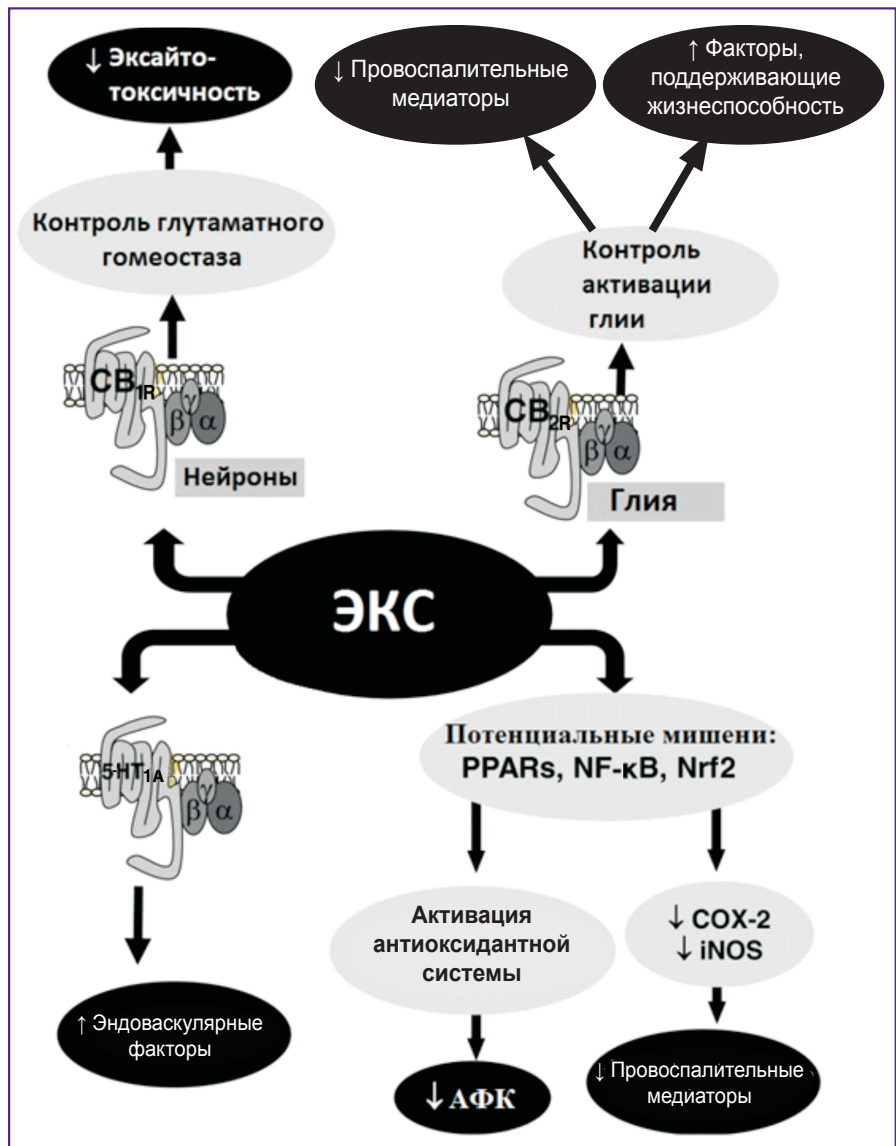


Рис. 1. Модифицированная схема молекулярных и клеточных механизмов, обеспечивающих нейропротективные свойства эндоканнабиноидов [2]:

CB_{1R} — каннабиноидный рецептор 1-го типа; CB_{2R} — каннабиноидный рецептор 2-го типа; PPARs — рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором; NF-κB — транскрипционный фактор (ядерный фактор «каппа-би»); Nrf2 — транскрипционный фактор; АФК — активные формы кислорода; COX-2 — циклооксигеназа 2; iNOS — индуцибельная NO-синтаза; 5-HT_{1A} — подтип серотониновых рецепторов подсемейства 5-HT_{1A}-рецепторов; α, β, γ — субъединицы С-белка, сопряженного с рецептором; ЭКС — эндоканнабиноидная система

согласно ранее разработанному протоколу [23, 24] в течение 21 дня *in vitro* на стеклах, покрытых полиэтиленамином (Sigma-Aldrich, Германия), для повышения адгезии клеток на их поверхность. Исходная плотность культуры на матрице составляла 9000 кл./мм². Жизнеспособность культур поддерживали в условиях CO₂-инкубатора (MCO-18AIC; Sanyo, Япония) при температуре 35,5°C и газовой смеси, содержащей 5% CO₂.

Моделирование гипоксии. Проводили на 14-й день культивирования путем замены культураль-

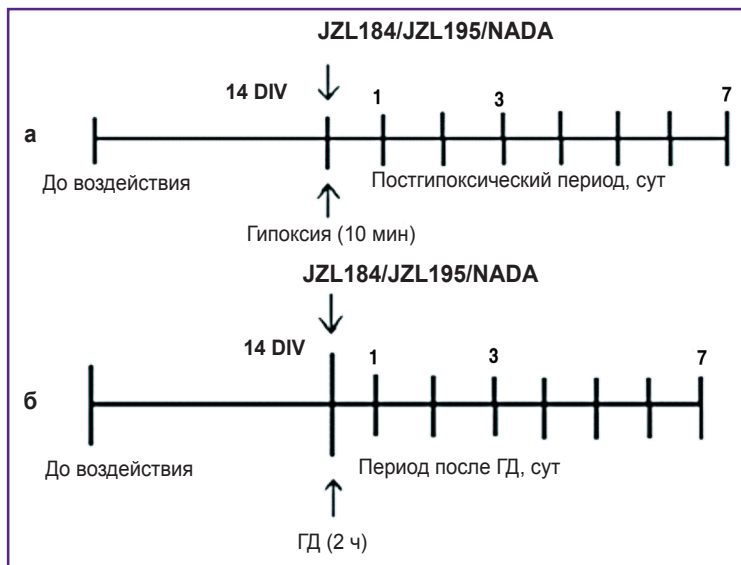


Рис. 2. Схема регистрации спонтанной биоэлектрической активности культур диссоциированных клеток гиппокампа на разных стадиях развития *in vitro*:
 а — после гипоксии; б — после глюкозной депривации (ГД); DIV — день развития

ной среды на среду с низким содержанием кислорода на 10 мин. Вытеснение кислорода осуществляли путем насыщения культуральной среды аргоном. Эксперимент выполняли в герметичной камере, в которой воздух также был замещен на аргон. В культуральную среду при моделировании гипоксии и после замены среды на нормоксическую добавляли одно из исследуемых соединений: N-арахидоноилдофамин (NADA) — 10-мкМ синтетический эндоканнабиноид, агонист рецепторов CB_{1R}, CB_{2R} и TRPV1; JZL184 (4-нитрофенил-4-[бис (1, 3-бензодиоксол-5-ил)(гидрокси) метил]пиперидин-1-карбоксилат) — 1-мкМ необратимый ингибитор MAGL; JZL195 (4-нитрофенил)-4-[(3-феноксифенил)метил]пиперазин-1-карбоновой кислоты) — 1-мкМ ингибитор обоих ключевых ферментов биодegradации эндоканнабиноида, FAAH и MAGL (рис. 2).

Моделирование глюкозной депривации.

Выполняли на 14-й день развития культуры *in vitro* путем замены на 2 ч стандартной культуральной среды на среду, не содержащую глюкозу, лактат, пируват. По прошествии данного времени среду заменяли на исходную. Аппликацию исследуемых соединений проводили аналогично моделированию гипоксии.

Оценка жизнеспособности клеток в диссоциированных культурах. Жизнеспособность клеток диссоциированной культуры гиппокампа оценивали на 1, 3 и 7-й день после моделирования гипоксии и глюкозной депривации. Осуществляли подсчет числа клеточных ядер, окрашенных пропидий иодидом (81845-25MG; Sigma, США), — мертвые клетки — и ядер, окрашенных бис-бензимидам (14530-100MG; Sigma, США), — все клетки культуры. Долю погибших клеток

рассчитывали как процентное соотношение между бис-бензимидам позитивными и пропидий иодид позитивными клетками [24].

Функциональный кальциевый имиджинг. Для исследований функциональной метаболической активности клеток первичных культур гиппокампа использовали кальциевый имиджинг для регистрации изменения концентрации цитоплазматического кальция. Данный метод позволяет визуализировать функциональную архитектуру нейронных сетей на клеточном уровне. Для культур клеток гиппокампа характерно спонтанное периодическое увеличение концентрации ионов Ca₂⁺ в цитоплазме. К нему приводит активация ионных каналов на постсинаптической мембране. После поступления в цитоплазму кальций быстро связывается кальций-связывающей системой клетки. Такая кальциевая активность может быть исследована с применением иончувствительных флюоресцентных зондов [25].

В качестве флюоресцентного зонда использовали специфический кальциевый краситель OregonGreen 488 BAPTA-1 AM (OGB1) (Thermo Fisher Scientific, США). Окрашивание проводили по стандартному протоколу [26]. Для регистрации флюоресценции применяли лазерный сканирующий микроскоп LSM 510 NLO (Carl Zeiss, Германия). Регистрировали временные серии изображений поля флюоресценции OGB1. Флюоресценцию красителя возбуждали линией излучения аргонового лазера 488 нм, регистрировали с помощью светофильтра с полосой 500–530 нм. Анализировали изменение интенсивности флюоресценции (усл. ед.) выбранной области поля зрения, совпадающей с телом клетки. Выделение и анализ кальциевых осцилляций, полученных при помощи флюоресцентной конфокальной микроскопии, проводили с помощью оригинального программного пакета AstroScanner (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2014662670). Анализировали записи функции F(t) средней интенсивности флюоресценции красителя OGB1 выделенной области поля от времени. Учитывали следующие параметры: длительность (с), частоту (количество кальциевых событий в минуту), процент работающих клеток в культуре [26].

Прижизненная детекция мРНК. Для прижизненной детекции мРНК использовали РНК-детекторные зонды SmartFlare (Merck, Германия). Данный метод позволяет прижизненно определить уровень экспрессии мРНК в живых активно функционирующих клетках. Зонды для детекции мРНК поглощаются живыми клетками путем эндоцитоза. Эти зонды циркулируют внутри клетки и связываются с комплементарными целевыми РНК-последовательностями. После связывания высвобождается флюорофор, который может быть обнаружен с помощью флюоресцентной микро-

скопии [27]. РНК-зонды добавляли в среду культивирования после моделирования гипоксии на 14-й день развития культуры *in vitro*.

Для изучения молекулярных механизмов нейропротекторного действия активации компонентов ЭКС была исследована экспрессия мРНК СВ_{1R}-рецепторов и индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 α . Для выявления уровня неспецифического окрашивания и особенностей работы РНК-детекторных зондов использовались следующие контроли: отрицательный контроль (Scramble) (Merck, Германия) — РНК-зонд, «захватывающая нить» которого комплементарна нуклеотидным последовательностям, не встречающимся в клетках, для определения фонового уровня флуоресценции, вызванного неспецифическим высвобождением флуоресцентных нитей; положительный контроль (Uptake) (Merck, Германия) — РНК-зонд, который всегда флуоресцирует внутри клетки и позволяет оценить уровень захвата РНК-зондов клеткой; контроль на гены «домашнего хозяйства» (Housekeeping) (Merck, Германия) — является положительным контролем обнаружения мРНК и всегда активен в клетках (обнаруживает мРНК 18S субъединицы рибосомы). Для детекции флуоресценции использовали конфокальный лазерно-сканирующий микроскоп (LSM 510; Carl Zeiss, Германия).

Статистическая обработка данных. Полученные данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Достоверность различий между экспериментальными группами определяли с помощью пакета ANOVA в программе SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc.). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. На первом этапе работы исследовали жизнеспособность клеток при моделировании факторов ишемии. Установили, что как гипоксия, так и глюкозная депривация вызывают статистически значимое (ANOVA, $p < 0,05$) увеличение количества мертвых клеток в культуре уже в первые сутки после воздействия. Выявлено, что снижение жизнеспособности клеток продолжается вплоть до 7-х суток после воз-

действия факторов ишемии. На 7-й день после моделирования гипоксии доля мертвых клеток в культурах была в 4,8 раза больше, чем в интактных культурах ($80,69 \pm 19,56$ и $16,64 \pm 7,7\%$ соответственно). В культурах, подвергнутых глюкозной депривации, к 7-м суткам мертвых клеток было в 3,9 раза больше, чем в интактных культурах ($55,0 \pm 15,6$ и $14,2 \pm 7,7\%$) (рис. 3).

Применение синтетического аналога эндоканнабиноида NADA (10 мкМ) предотвращало снижение жизнеспособности клеток первичных культур гиппокампа на протяжении всего периода наблюдения (на 7-е сутки после моделирования гипоксии доля мертвых клеток составила $38,4 \pm 7,4\%$, после моделирования глюкозной депривации — $21,6 \pm 3,1\%$).

Аппликация блокатора ключевых ферментов биодеградации эндоканнабиноида JZL195 (1 мкМ) увеличивала жизнеспособность клеток первичных культур

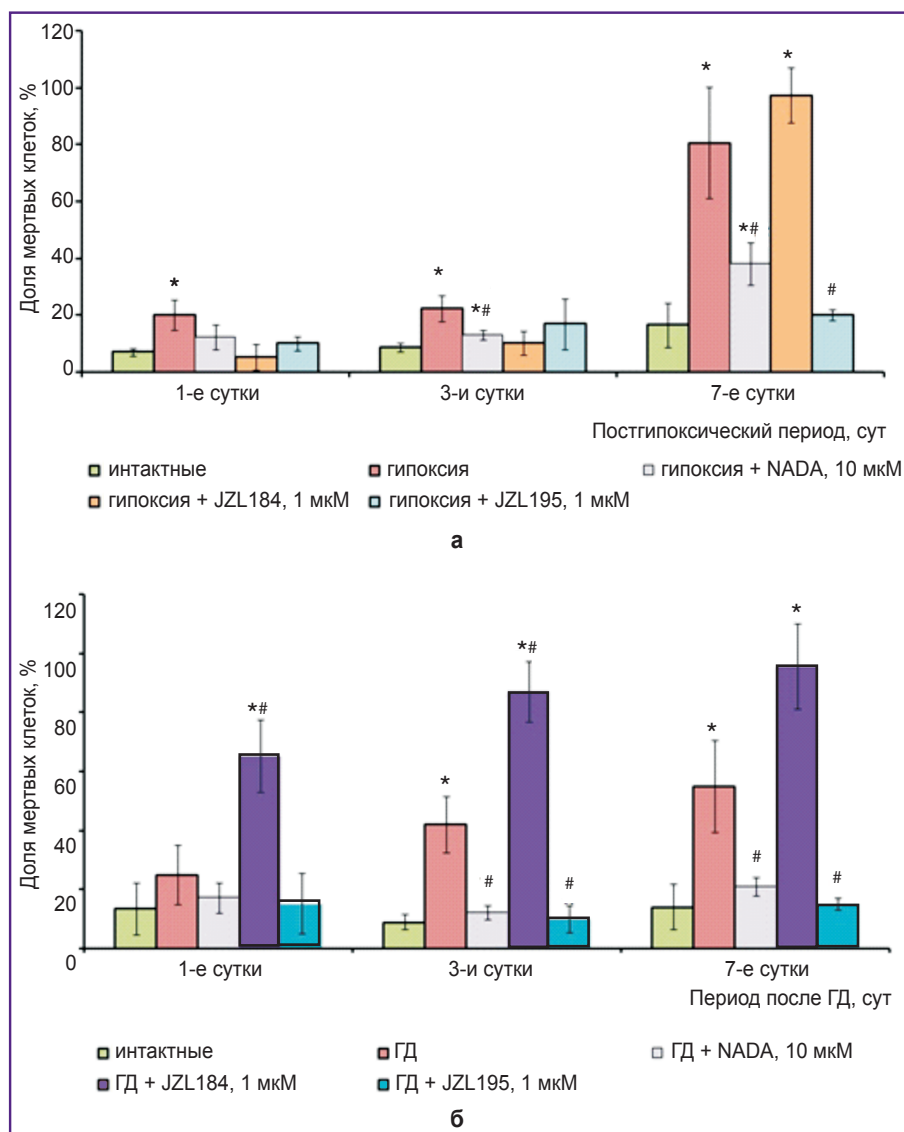


Рис. 3. Доля мертвых клеток в диссоциированных культурах гиппокампа на 1, 3 и 7-е сутки после моделирования: а — гипоксии; б — глюкозной депривации (ГД); различия статистически значимы ($p < 0,05$) по сравнению с * — контролем, # — гипоксией или ГД соответственно

гиппокампа при моделировании факторов ишемии. При моделировании гипоксии жизнеспособность клеток культур группы «гипоксия + JZL195» не отличалась от интактных культур и была статистически значимо (ANOVA, $p < 0,05$) выше, чем в группе «гипоксия» ($20,1 \pm 2,0\%$). В группе «глюкозная депривация + JZL195» на 7-е сутки после воздействия происходило незначительное снижение жизнеспособности, статистически значимых различий с интактной группой не выявлено ($15,1 \pm 2,7\%$).

Следует отметить, что применение блокатора MAGL JZL184 (1 мкМ) как при моделировании гипоксии, так и при моделировании глюкозной депривации неблагоприятно воздействовало на жизнеспособность клеток в первичной культуре гиппокампа (при моделировании гипоксии на 7-е сутки в культурах с аппликацией JZL184 наблюдали $97,3 \pm 9,6\%$ мертвых клеток, при моделировании глюкозной депривации — $98,5 \pm 14,6\%$).

Таким образом, выявлено, что введение в культуральную среду агониста каннабиноидных рецепторов 1-го и 2-го типа NADA и блокатора основных ферментов JZL195 оказывает нейропротекторное действие, проявляющееся в достоверном снижении количества мертвых клеток по сравнению с группами культур, подвергшихся действию факторов ишемии (гипоксии и глюкозной депривации). При этом в процессе моделирования гипоксии JZL195 проявил более выраженный защитный эффект по сравнению с NADA. Применение блокатора JZL184 не оказывало положительного эффекта на жизнеспособность нервных клеток. Поэтому для дальнейших исследований были выбраны NADA и JZL195.

Следующим этапом исследования явилось изучение эффектов, оказываемых ЭКС на индуцированные факторами ишемии изменения спонтанной кальциевой активности клеток первичных культур гиппокампа. Сегодня не вызывает сомнений, что важнейшие функции нервной системы — обработку и передачу информации, консолидацию памяти, формирование эмоций и поведенческих реакций — выполняют не отдельные нейроны, а целые нейронные сети, которые являются минимальной функциональной единицей нервной системы [28]. Изучение функциональной активности на сетевом уровне чрезвычайно важно для понимания механизмов воздействия стрессорных факторов на головной мозг. Определение особенностей динамики концентрации кальция в клетках первичных культур гиппокампа позволяет провести анализ функциональной метаболической активности как нейронов, так и глии [26].

В рамках нашего исследования был проведен мультиклеточный кальциевый имиджинг. Преимущество данного метода — возможность исследования метаболической активности нейронных сетей, формирующихся в первичных культурах клеток гиппокампа, с клеточным разрешением. Оценка функциональной кальциевой активности проводилась на 7-й день по-

сле моделирования повреждающих факторов ишемии. В интактных культурах на 21-й день культивирования наблюдалась спонтанная кальциевая активность. Частота возникновения кальциевых осцилляций в нейронной сети составляла $2,2 \pm 0,2$ в минуту, активность проявляли $91,1 \pm 3,5\%$ клеток (рис. 4, а, б). Исследование воздействия острой гипоксии выявило, что на 7-е сутки постгипоксического периода происходило резкое снижение спонтанной кальциевой активности. Активность проявляло лишь $34,0 \pm 13,4\%$ клеток, а частота кальциевых осцилляций (ANOVA, $p < 0,05$) снизилась до $0,94 \pm 0,21$ в минуту. Длительность кальциевых осцилляций изменилась незначительно.

Эффект блокады ферментов биодеградации эндоканнабиноидов с помощью JZL195 проявляется в сохранении спонтанной кальциевой активности. Активность обнаружена в $79,7 \pm 15,5\%$ клеток (см. рис. 4, б). Частота кальциевых осцилляций при воздействии JZL195 снизилась в 2,4 раза по сравнению с интактными культурами и составила $0,9 \pm 0,3$ осцилляции в минуту. Длительность кальциевых осцилляций возросла почти в два раза по сравнению с интактными культурами ($12,8 \pm 1,7$ и $6,7 \pm 1,3$ с соответственно; $p < 0,05$, ANOVA).

NADA также оказал антигипоксический эффект. Спонтанную кальциевую активность в культурах клеток данной экспериментальной группы проявляли $86,8 \pm 7,7\%$ клеток (см. рис. 4, б). Нейропротекторный эффект NADA по параметру частоты осцилляций был более выражен, чем в случае применения JZL195 (снижение в 1,4 раза относительно интактной группы), и статистически значимо отличался от группы «гипоксия». Длительность кальциевых осцилляций в группе NADA возросла незначительно и составила $23,8 \pm 7,7$ с.

При моделировании глюкозной депривации на 7-е сутки также происходило статистически значимое снижение спонтанной кальциевой активности. Активность проявляли лишь $53,2 \pm 5,0\%$ клеток, а частота кальциевых осцилляций снизилась в 2,2 раза — до $0,9 \pm 0,04$ в минуту (ANOVA, $p < 0,05$). Интересно отметить, что в отличие от гипоксии глюкозная депривация вызвала статистически значимое (ANOVA $p < 0,05$) увеличение длительности кальциевых осцилляций в два раза ($38,8 \pm 1,5$ с) (рис. 4, в).

Установлено, что оба способа активации ЭКС позволяют частично предотвратить вызванное глюкозной депривацией снижение кальциевой активности. Нейропротекторный эффект JZL195 выражался в поддержании числа клеток, проявляющих активность ($80,6 \pm 5,8\%$) (см. рис. 4, в), и в частичном сохранении частоты и длительности кальциевых осцилляций. Частота кальциевых осцилляций при воздействии JZL195 снизилась в 1,6 раза по сравнению с интактными культурами ($1,3 \pm 0,2$ осцилляции в минуту). Длительность кальциевых осцилляций возросла в 1,4 раза по сравнению с интактными культурами ($9,1 \pm 0,3$ и $6,6 \pm 0,3$ с соответственно). NADA также оказал нейропротекторное воздействие. Активность в данной

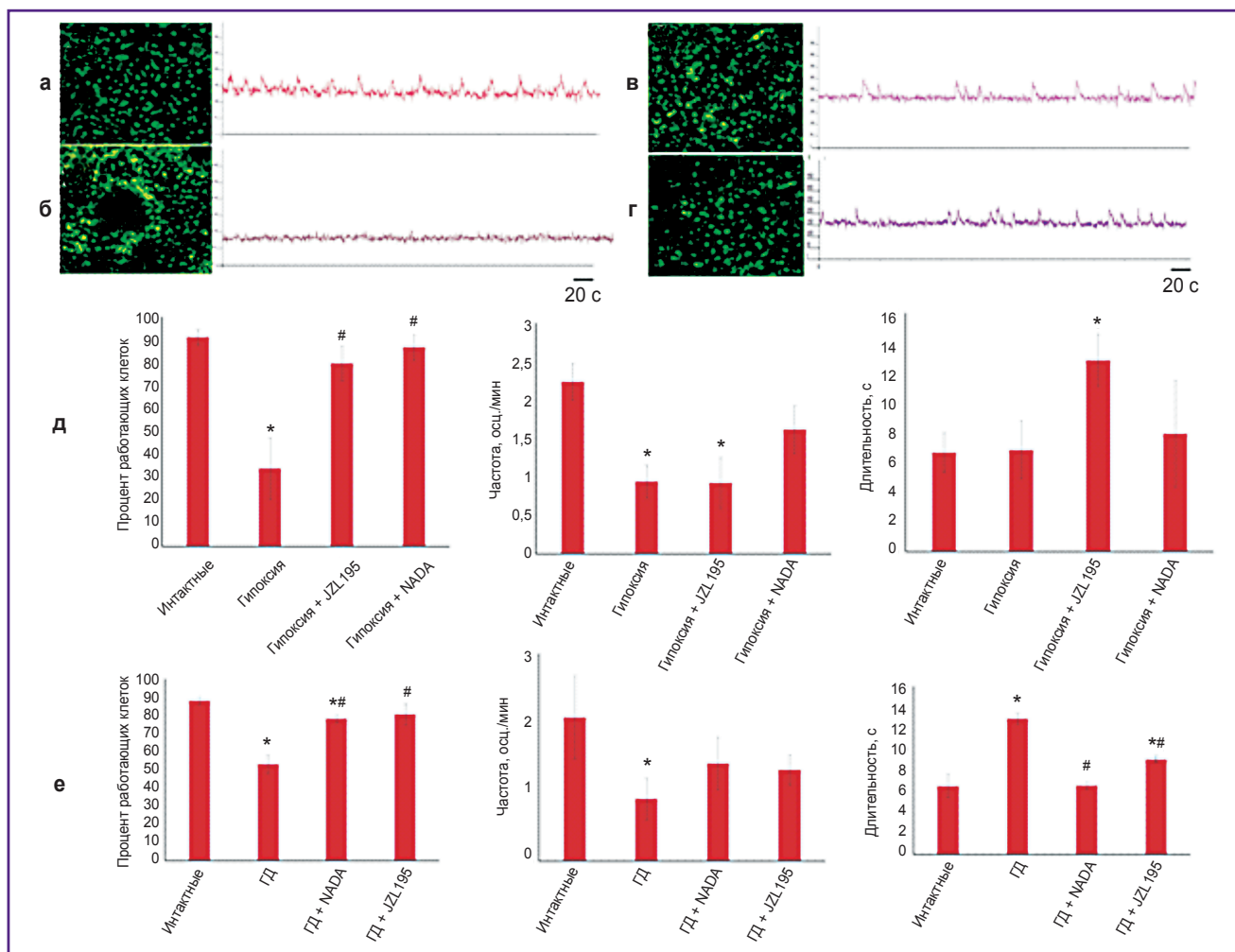


Рис. 4. Характерные примеры записей кальциевой активности в культурах клеток гиппокампа: а — интактная культура; б — гипоксия; в — гипоксия + JZL195; г — гипоксия + NADA; д, е — основные параметры спонтанной кальциевой активности на 7-й день после моделирования гипоксии (д); глюкозной депривации — ГД — (е) *in vitro*; различия статистически значимы (p<0,05) по сравнению с * — контролем, # — гипоксией или ГД соответственно

группе проявляли $78,1 \pm 2,4\%$ клеток (см. рис. 4, е). Частота кальциевых осцилляций при воздействии NADA снизилась в 1,5 раза по сравнению с интактными культурами ($1,4 \pm 0,4$ осцилляции в минуту). Длительность кальциевых осцилляций была статистически значимо ниже, чем в группе «гипоксия», и не отличалась от интактных культур ($6,6 \pm 0,4$ с).

Таким образом, наше исследование показало, что ЭКС играет важную роль в поддержании метаболической активности клеток нейронных сетей при действии повреждающих факторов ишемии.

Для понимания возможных молекулярных механизмов действия NADA и JZL195 было проведено исследование изменения уровня экспрессии мРНК CB_{1R} -рецепторов на 3-и сутки после моделирования одного из факторов ишемии (гипоксии). Прижизненная детекция мРНК CB_{1R} -рецепторов показала, что в первичных культурах клеток гиппокампа мРНК CB_{1R} активно синтезируется как нейронами, так и глиальными

клетками. Гипоксическое воздействие вызывало незначительное снижение доли CB_{1R} мРНК-положительных клеток (с $73,6 \pm 4,3$ до $61,1 \pm 6,0\%$). В группе «гипоксия + JZL195» их число статистически значимо не отличалось от интактных значений и составило $69,1 \pm 8,5\%$ (рис. 5, а). В группе «гипоксия + NADA» доля мРНК CB_{1R} -положительных клеток статистически значимо повышается ($95,2 \pm 3,5\%$). Таким образом, выявлено, что применение синтетического аналога эндоканнабиноида NADA достоверно повышает экспрессию каннабиноидных рецепторов 1-го типа.

В течение ряда последних лет появились данные о возможной роли фактора HIF-1 α в реализации нейропротекторного действия ЭКС при гипоксическом повреждении. Для подтверждения данной гипотезы нами был изучен уровень экспрессии мРНК HIF-1 α при действии исследуемых соединений после моделирования гипоксии. Было установлено, что экспрессия мРНК HIF-1 α на 3-и сутки после моделирования

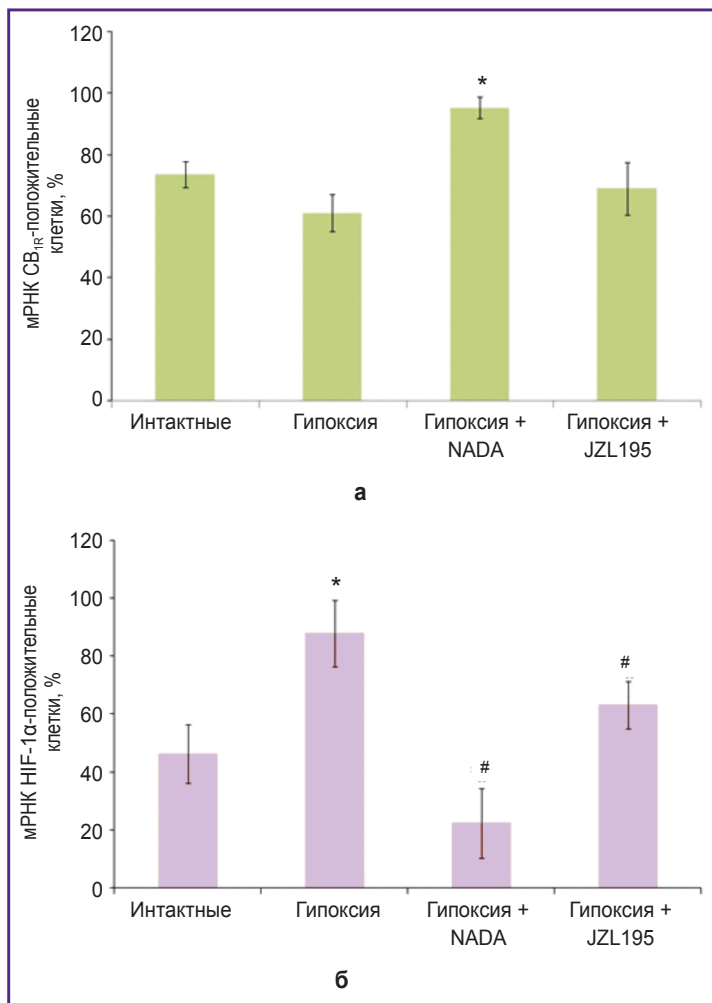


Рис. 5. Исследование возможных молекулярных механизмов нейропротекторного действия эндоканнабиноидной системы с помощью детекции мРНК на 3-и сутки после моделирования гипоксии *in vitro*:

а — экспрессия прижизненной мРНК CB_{1R}; б — экспрессия мРНК HIF-1α; различия статистически значимы (p<0,05) по сравнению с * — контролем, # — гипоксией

гипоксии увеличивается в 1,9 раза по сравнению с интактными культурами (ANOVA, p<0,05): доля мРНК HIF-1α-позитивных клеток в интактной группе составила 46,2±10,1%, в группе «гипоксия» — 87,8±11,5% (рис. 5, б). Применение NADA вызвало снижение доли клеток, экспрессирующих мРНК HIF-1α, в 2 раза (22,3±12,1%; ANOVA p<0,05). Применение блокатора ключевых ферментов биodeградации эндоканнабиноида не вызвало статистически значимого изменения уровня экспрессии мРНК HIF-1α, хотя регистрировалась тенденция к ее увеличению (63,2±8,2%).

Обсуждение. В результате проведенных исследований было установлено, что активация ЭКС как с помощью введения экзогенного аналога эндогенного каннабиноида NADA, так и с помощью блокады ферментов биodeградации эндоканнабиноидов оказывает антигипоксический и нейропротекторный эффект при

действии таких факторов ишемии, как гипоксия и глюкозная депривация. Помимо снижения числа погибших клеток, активация ЭКС позволяет частично нивелировать индуцированные гипоксией и глюкозной депривацией *in vitro* изменения спонтанной кальциевой активности в культурах клеток гиппокампа, что выражается в поддержании числа клеток, проявляющих активность, а также в частичной нормализации длительности и частоты кальциевых осцилляций.

При сравнении эффекта активации ЭКС с помощью синтетического аналога эндоканнабиноида NADA и блокатора ферментов биodeградации эндоканнабиноидов JZL195 обнаружено, что NADA оказывает более выраженный нейропротекторный эффект. Применение NADA позволяет поддержать на исходном уровне не только количество клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность, но и частоту кальциевых осцилляций, а также их длительность, что является важным параметром нормального функционирования нервных клеток.

Исследование возможных молекулярных механизмов нейропротекторного действия активации ЭКС показало ключевую роль каннабиноидных рецепторов 1-го типа, что согласуется с имеющимися литературными данными [29–34]. С применением метода флуоресцентных РНК-зондов для прижизненной детекции мРНК стало очевидным, что аппликация NADA при моделировании гипоксии достоверно повышает экспрессию мРНК CB_{1R}-положительных клеток. По всей вероятности, это позволяет эндоканнабиноидам более активно воздействовать на патологические каскады, индуцируемые гипоксическим воздействием.

Также нами была исследована возможная роль гипоксия-индуцированного фактора HIF-1α в реализации нейропротекторного действия ЭКС. Этот транскрипционный фактор контролирует передачу кислорода тканям и адаптирует клетку к кислородному голоданию за счет регуляции экспрессии генных продуктов, включающихся в энергетический клеточный метаболизм, транспорт глюкозы, апоптоз, эритропоэз, ангиогенез, клеточную пролиферацию, влияя при этом на взаимодействие не только между клетками, но и между клеткой и субстратом [35]. HIF — гетеродимер, включающий в себя конститутивную субъединицу HIF-β и субъединицу HIF-α, у которой существует три изоформы — HIF-1α, HIF-2α и HIF-3α. Уровень продукции HIF-1α зависит от парциального давления кислорода в крови и возрастает при гипоксии [36–38]. Роль HIF-1α при гипоксии изучалась многими исследователями, однако сведения о возможной взаимосвязи между ЭКС и HIF-1α начали появляться только совсем недавно. Данные R. Soler-Torronteras с соавт. [39] свидетельствуют о том, что N-ацилдофамины повышают экспрессию HIF-

1 α клетками первичных нейрональных культур в условиях нормоксии. Работа С. Abán с соавт. [40] показала, что повышение продукции HIF-1 α при моделировании гипоксии приводит к снижению экспрессии FAAH, а также сокращает жизнеспособность клеток трофобласта. Эти исследования позволяют предположить, что изменение продукции HIF-1 α может быть одним из возможных молекулярных механизмов нейропротекторного действия эндоканнабиноидов. Наше исследование показало, что гипоксия вызывает достоверное увеличение экспрессии HIF-1 α , что подтверждают литературные данные [37–39]. Активация ЭКС обоими исследуемыми соединениями сохраняет уровень экспрессии мРНК фактора HIF-1 α близким к параметрам интактных культур.

Данные о роли HIF-1 α в адаптации головного мозга к гипоксии противоречивы. Хотя достаточно много работ показывают, что HIF-1 α стимулирует эритропоэз и ангиопоэз, которые повышают устойчивость организма к гипоксии [41–45], в некоторых исследованиях также отмечается, что HIF-1 α играет отрицательную роль в адаптации клеток нервной системы к гипоксическому воздействию [38]. Ряд исследований свидетельствуют, что HIF-1 α является активатором проапоптотического гена p53 при гипоксии [46, 47] и при черепно-мозговой травме [48]. Мы считаем, что сохранение экспрессии HIF-1 α на стабильном уровне является одним из молекулярных механизмов нейропротекторного действия NADA и позволяет предотвратить индукцию апоптоза.

Заключение. Применение синтетического аналога каннабиноида N-арахидоноилдофамина (10 мкМ) и ингибитора обоих ключевых ферментов биodeградации JZL195 (1 мкМ) оказывает нейропротекторный эффект при моделировании факторов ишемии, выражающийся в поддержании жизнеспособности и спонтанной кальциевой активности клеток первичных культур гиппокампа.

Финансирование исследования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №16-34-00301 мол_а, №17-04-01128 а), а также при поддержке государственного задания (проекты №17.3335.2017/ПЧ и №6.6379.2017/БЧ), гранта президента Российской Федерации МД-2634.2017.4 и гранта Российского научного фонда №17-75-10149 в части исследования экспрессии мРНК.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.

Литература/References

1. Numakawa T. Possible protective action of neurotrophic factors and natural compounds against common neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 2014; 9(16): 1506–1508, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.139474>.

2. Duarte E.P., Curcio M., Canzoniero L.M., Duarte C.B.

Neuroprotection by GDNF in the ischemic brain. *Growth Factors* 2012; 30(4): 242–257, <https://doi.org/10.3109/08977194.2012.691478>.

3. Picone R.P., Kendall D.A. Minireview: from the bench, toward the clinic: therapeutic opportunities for cannabinoid receptor modulation. *Mol Endocrinol* 2015; 29(6): 801–813, <https://doi.org/10.1210/me.2015-1062>.

4. Schurman L.D., Lichtman A.H. Endocannabinoids: a promising impact for traumatic brain injury. *Front Pharmacol* 2017; 8: 69, <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00069>.

5. Pertwee R.G. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol* 2006; 147(S1): S163–S171, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706406>.

6. Fernández-Ruiz J., Moro M.A., Martínez-Orgado J. Cannabinoids in neurodegenerative disorders and stroke/brain trauma: from preclinical models to clinical applications. *Neurotherapeutics* 2015; 12(4): 793–806, <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0381-7>.

7. Pertwee R.G., Howlett A.C., Abood M.E., Alexander S.P., Di Marzo V., Elphick M.R., Greasley P.J., Hansen H.S., Kunos G., Mackie K., Mechoulam R., Ross R.A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev* 2010; 62(4): 588–631, <https://doi.org/10.1124/pr.110.003004>.

8. Nagayama T., Sinor A.D., Simon R.P., Chen J., Graham S.H., Jin K., Greenberg D.A. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci* 1999; 19(8): 2987–2995.

9. Panikashvili D., Shein N.A., Mechoulam R., Trembovler V., Kohen R., Alexandrovich A., Shohami E. The endocannabinoid 2-AG protects the blood–brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. *Neurobiol Dis* 2006; 22(2): 257–264, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.11.004>.

10. Shohami E., Cohen-Yeshurun A., Magid L., Algali M., Mechoulam R. Endocannabinoids and traumatic brain injury. *Br J Pharmacol* 2011; 163(7): 1402–1410, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01343.x>.

11. Koch M., Kreutz S., Böttger C., Benz A., Maronde E., Ghadban C., Korf H.W., Dehghani F. Palmitoylethanolamide protects dentate gyrus granule cells via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Neurotox Res* 2011; 19(2): 330–340, <https://doi.org/10.1007/s12640-010-9166-2>.

12. Pazos M.R., Mohammed N., Lafuente H., Santos M., Martínez-Pinilla E., Moreno E., Valdizan E., Romero J., Pazos A., Franco R., Hillard C.J., Alvarez F.J., Martínez-Orgado J. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic newborn pigs: role of 5HT(1A) and CB₂ receptors. *Neuropharmacology* 2013; 71: 282–291, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.027>.

13. Rosenberg E.C., Patra P.H., Whalley B.J. Therapeutic effects of cannabinoids in animal models of seizures, epilepsy, epileptogenesis, and epilepsy-related neuroprotection. *Epilepsy Behav* 2017; 70(Pt B): 319–327, <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.11.006>.

14. Mori M.A., Meyer E., Soares L.M., Milani H., Guimarães F.S., de Oliveira R.M. Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and functional recovery after brain ischemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2017; 75: 94–105, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.11.005>.

15. Pihlaja R., Takkinen J., Eskola O., Vasara J., López-

- Picón F.R., Haaparanta-Solin M., Rinne J.O. Monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 reduces neuroinflammatory response in APdE9 mice and in adult mouse glial cells. *J Neuroinflammation* 2015; 12: 81, <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0305-9>.
16. Carloni S., Alonso-Alconada D., Girelli S., Duranti A., Tontini A., Piomelli D., Hilario E., Alvarez A., Balduini W. Pretreatment with the monoacylglycerol lipase inhibitor URB602 protects from the long-term consequences of neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Pediatr Res* 2012; 72(4): 400–406, <https://doi.org/10.1038/pr.2012.91>.
17. Valdeolivas S., Pazos M.R., Bisogno T., Piscitelli F., Iannotti F.A., Allarà M., Sagredo O., Di Marzo V., Fernández-Ruiz J. The inhibition of 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG) biosynthesis, rather than enhancing striatal damage, protects striatal neurons from malonate-induced death: a potential role of cyclooxygenase-2-dependent metabolism of 2-AG. *Cell Death Dis* 2013; 4(10): e862, <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.387>.
18. Celorrio M., Fernández-Suárez D., Rojo-Bustamante E., Echeverry-Alzate V., Ramírez M.J., Hillard C.J., López-Moreno J.A., Maldonado R., Oyarzábal J., Franco R., Aymerich M.S. Fatty acid amide hydrolase inhibition for the symptomatic relief of Parkinson's disease. *Brain Behav Immun* 2016; 57: 94–105, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.010>.
19. Tchanchou F., Tucker L.B., Fu A.H., Bluett R.J., McCabe J.T., Patel S., Zhang Y. The fatty acid amide hydrolase inhibitor PF-3845 promotes neuronal survival, attenuates inflammation and improves functional recovery in mice with traumatic brain injury. *Neuropharmacology* 2014; 85: 427–39, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.06.006>.
20. Su S.H., Wang Y.Q., Wu Y.F., Wang D.P., Lin Q., Hai J. Cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 and fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 may protect against cognitive impairment in rats of chronic cerebral hypoperfusion via PI3K/AKT signaling. *Behav Brain Res* 2016; 313: 334–344, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.07.009>.
21. England T.J., Hind W.H., Rasid N.A., O'Sullivan S.E. Cannabinoids in experimental stroke: a systematic review and meta-analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35(3): 348–358, <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.218>.
22. Hind W.H., England T.J., O'Sullivan S.E. Cannabidiol protects an in vitro model of the blood-brain barrier from oxygen-glucose deprivation via PPAR γ and 5-HT $1A$ receptors. *Br J Pharmacol* 2016; 173(5): 815–825, <https://doi.org/10.1111/bph.13368>.
23. Мухина И.В., Казанцев В.Б., Хаспекоев Л.Г., Захаров Ю.Н., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Коротченко С.А., Корягина Е.А. Мультиэлектродные матрицы — новые возможности в исследовании пластичности нейрональной сети. *Современные технологии в медицине*. 2009; 1: 8–15. Mukhina I.V., Kazantsev V.B., Khaspeckov L.G., Zakharov Yu.N., Vedunova M.V., Mitroshina E.V., Korotchenko S.A., Koryagina E.A. Multielectrode matrices — new possibilities in investigation of the neuronal network plasticity. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2009; 1: 8–15.
24. Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Mukhina I.V. TrkB-mediated neuroprotective and antihypoxic properties of brain-derived neurotrophic factor. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 453901, <https://doi.org/10.1155/2015/453901>.
25. Paredes M., Etzler J.C., Watts L.T., Zheng W., Lechleiter J.D. Chemical calcium indicators. *Methods* 2008; 46(3): 143–151, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.09.025>.
26. Zakharov Yu.N., Korotchenko S.A., Kalintseva Ya.I., Potanina A.V., Mitroshina E.V., Vedunova M.V., Mukhina I.V. Fluorescence analysis of the metabolic activity patterns of a neuronal-glia network. *Journal of Optical Technology* 2012; 79(6): 348–351, <https://doi.org/10.1364/jot.79.000348>.
27. Rosi N.L., Giljohann D.A., Thaxton C.S., Lytton-Jean A.K., Han M.S., Mirkin C.A. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science* 2006; 12(5776): 1027–1030, <https://doi.org/10.1126/science.1125559>.
28. Yuste R. From the neuron doctrine to neural networks. *Nat Rev Neurosci* 2015; 16(8): 487–497, <https://doi.org/10.1038/nrn3962>.
29. Grabiec U., Koch M., Kallendrusch S., Kraft R., Hill K., Merkwitz C., Ghadban C., Lutz B., Straiker A., Dehghani F. The endocannabinoid N-arachidonoyldopamine (NADA) exerts neuroprotective effects after excitotoxic neuronal damage via cannabinoid receptor 1 (CB $_1$). *Neuropharmacology* 2012; 62(4): 1797–1807, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.11.023>.
30. Panikashvili D., Mechoulam R., Beni S.M., Alexandrovich A., Shohami E. CB $_1$ cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF- κ B inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25(4): 477–484, <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600047>.
31. Marsicano G., Moosmann B., Hermann H., Lutz B., Behl C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB $_1$. *J Neurochem* 2002; 80(3): 448–456, <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00716.x>.
32. Ma L., Jia J., Niu W., Jiang T., Zhai Q., Yang L., Bai F., Wang Q., Xiong L. Mitochondrial CB $_1$ receptor is involved in A β -induced protective effects on neurons and mitochondrial functions. *Sci Rep* 2015; 5(1): 12440, <https://doi.org/10.1038/srep12440>.
33. Xu C., Hermes D.J., Nwanguma B., Jacobs I.R., Mackie K., Mukhopadhyay S., Lichtman A.H., Ignatowska-Jankowska B., Fitting S. Endocannabinoids exert CB $_1$ receptor-mediated neuroprotective effects in models of neuronal damage induced by HIV-1 Tat protein. *Mol Cell Neurosci* 2017; 83: 92–102, <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.07.003>.
34. Zhuang Q., Dai C., Yang L., Wen H., Wang H., Jiang X., Zhang Y. Stimulated CB $_1$ cannabinoid receptor inducing ischemic tolerance and protecting neuron from cerebral ischemia. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2017; 17(2): 141–150, <https://doi.org/10.2174/1871524916666160504104624>.
35. Smith T.G., Roblins P.A., Ratelife P.J. The human side of hypoxia-inducible factor. *Br J Haematol* 2008; 141(3): 325–334, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07029.x>.
36. Semenza G.L. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* 2004; 19(4): 176–182, <https://doi.org/10.1152/physiol.00001.2004>.
37. Semenza G.L. Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1. *Exp Physiol* 2006; 91(5): 803–806, <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.033498>.
38. Singh N., Sharma G., Mishra V., Raghurir R. Hypoxia inducible factor-1: its potential role in cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol* 2012; 32(4): 491–507, <https://doi.org/10.1007/s10571-012-9803-9>.
39. Soler-Torronteras R., Lara-Chica M., García V., Calzado M.A., Muñoz E. Hypoximimetic activity of N-acyl-

dopamines. N-arachidonoyl-dopamine stabilizes HIF-1 α protein through a SIAH2-dependent pathway. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843(11): 2730–2743, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.07.005>.

40. Abán C., Martínez N., Carou C., Albamonte I., Toro A., Seyahian A., Franchi A., Leguizamón G., Trigubo D., Damiano A., Farina M. Endocannabinoids participate in placental apoptosis induced by hypoxia inducible factor-1. *Apoptosis* 2016; 21(10): 1094–1105, <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1274-x>.

41. Adamcio B., Sperling S., Hagemeyer N., Walkinshaw G., Ehrenreich H. Hypoxia inducible factor stabilization leads to lasting improvement of hippocampal memory in healthy mice. *Behav Brain Res* 2010; 208(1): 80–44, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.010>.

42. Liu X.L., Lu J., Xing J. Stabilization of HIF-1 α modulates VEGF and Caspase-3 in the hippocampus of rats following transient global ischemia induced by asphyxial cardiac arrest. *Life Sci* 2016; 151: 243–249, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.005>.

43. Zhu T., Zhan L., Liang D., Hu J., Lu Z., Zhu X., Sun W., Liu L., Xu E. Hypoxia-inducible factor 1 α mediates neuroprotection of hypoxic postconditioning against global cerebral ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol* 2014; 73(10): 975–986, <https://doi.org/10.1097/nen.000000000000118>.

44. Reischl S., Li L., Walkinshaw G., Flippin L.A., Marti H.H., Kunze R. Inhibition of HIF prolyl-4-hydroxylases by FG-4497 reduces brain tissue injury and edema formation during ischemic stroke. *PLoS One* 2014; 9(1): e84767, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084767>.

45. Yang Y., Ju J., Deng M., Wang J., Liu H., Xiong L., Zhang J. Hypoxia inducible factor 1 α promotes endogenous adaptive response in rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Int J Mol Sci* 2017; 18(1): 3, <https://doi.org/10.3390/ijms18010003>.

46. Yan J., Huang Y., Lu Y., Chen J., Jiang H. Repeated administration of ketamine can induce hippocampal neurodegeneration and long-term cognitive impairment via the ROS/HIF-1 α pathway in developing rats. *Cell Physiol Biochem* 2014; 33(6): 1715–1732, <https://doi.org/10.1159/000362953>.

47. Yin R., Yuan L., Ping L., Hu L. Neonatal bronchopulmonary dysplasia increases neuronal apoptosis in the hippocampus through the HIF-1 α and p53 pathways. *Respir Physiol Neurobiol* 2016; 220: 81–87, <https://doi.org/10.1016/j.resp.2015.09.011>.

48. Li A., Sun X., Ni Y., Chen X., Guo A. HIF-1 α involves in neuronal apoptosis after traumatic brain injury in adult rats. *J Mol Neurosci* 2013; 51(3): 1052–1062, <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0084-7>.