

DOI 10.22363/2313-0245-2025-29-4-436-453

EDN AAGDLC

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ORIGINAL RESEARCH

Нейропротективное действие внеклеточных везикул, полученных из глиальных производных человека на модели глутаматной эксайтотоксичности

М.О. Шеденкова¹ , А.А. Гурьянова² , А.К. Судьина¹ , Е.П. Гугучкин² , Е.А. Карпулевич² , Т.Х. Фатхудинов³ , Д.В. Гольдштейн¹ , Д.И. Салихова¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова», г. Москва, Российская Федерация

²Институт системного программирования им. В.П. Иванникова РАН, г. Москва, Российская Федерация

³НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», г. Москва, Российская Федерация
 margarita.shedenkova@gmail.com

Аннотация. Актуальность. Современные исследования в области биомедицины уделяют значительное внимание разработке терапевтических препаратов на основе внеклеточных везикул, чье разнообразие определяется как источниками получения, так и возможностью направленной модификации. В представленной работе впервые проведено транскриптомное профилирование первичной культуры кортикальных нейронов при воздействии внеклеточных везикул, полученных от глиальных клеток, при глутаматной эксайтотоксичности с целью выявления дифференциально экспрессируемых генов. **Материалы и методы.** Внеклеточные везикулы были получены из кондиционированной среды глиальных клеток-предшественников человека с помощью ультрацентрифугирования. Модель глутаматной эксайтотоксичности проводили на первичной культуре кортикальных нейронов крыс (Р0) при добавлении 100 мкМ гутамата. Секвенирование подготовленных библиотек проводили на платформе NextSeq 1000 (Illumina, США) с использованием набора NextSeq 1000/2000 P2 Reagents kit (200 Cycles) v3, дополненного 2 % Phix (Illumina) в качестве внутреннего контроля. Критерием статистической значимости изменения экспрессии гена между группами считался FDR <0.05. **Результаты и обсуждение.** Транскриптомный анализ показал, что добавление внеклеточных везикул при глутаматной эксайтотоксичности приводило к повышенной экспрессии 190 генов, и к пониженной экспрессии 309 генов ($p\text{-value}<0.05$ и $|FC|<1.5$). Анализ генов с помощью базы данных Gene Ontology показал, что гены с повышенной экспрессией достоверно классифицировались по биологическим процессам. Из наиболее представленных были: регенерация, реорганизация внеклеточного матрикса и цитоскелета, поддержание гомеостаза, активация PI3K-Akt-пути и ответ на клеточный стресс. Гены с пониженной

© Шеденкова М.О., Гурьянова А.А., Судьина А.К., Гугучкин Е.П., Карпулевич Е.А., Фатхудинов Т.Х., Гольдштейн Д.В., Салихова Д.И., 2025



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

экспрессией достоверно классифицировались по группам: кальциевый транспорт, регуляция отростков нейронов, апоптоз, глутаматергический синапс. Эти данные могут свидетельствовать о том, что внеклеточные везикулы запускают процессы выживания в нервных клетках при воздействии глутамата и ингибируют пути, связанные с поступлением кальция и глутамата в клетки. **Выводы.** Внеклеточные везикулы усиливают экспрессию генов, связанных с выживанием, и ингибируют гены, отвечающие за кальциевый транспорт и апоптоз. Результаты исследования свидетельствуют о перспективности применения внеклеточных везикул глиального происхождения в качестве основы для разработки новых терапевтических подходов к лечению неврологических заболеваний.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, глутаматная эксайтотоксичность, транскриптомный анализ, глиальные клетки-предшественники, иПСК

Информация о финансировании. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации КБК: 075 0110 47 2 U8 70440 621. Код научной темы: FSSF-2025-0004.

Вклад авторов. Концепция и дизайн исследования — Д.И. Салихова, Т.Х. Фатхудинов, Д.В. Гольдштейн; эксперимент — М.О. Шеденкова, А.К. Судьина; анализ данных — М.О. Шеденкова, А.А. Гурьянова, Е.П. Гугучкин, Е.А. Карпулевич, подготовка текста статьи — М.О. Шеденкова; научное редактирование текста — Д.И. Салихова. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование одобрено Институциональным этическим комитетом Медико-генетического научного центра (Протокол № 2019-2/3 от 13 октября 2020 г.). Эксперименты на животных проводились в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и Декларацией о гуманном обращении с животными, а также в соответствии с Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении лабораторной практики». Уход за животными, их разведение и экспериментальные процедуры проводились в соответствии с требованиями Этического комитета Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского». Протокол № 38(14) от 31.05.2022.

Благодарности — неприменимо.

Информированное согласие на публикацию. Каждый участник исследования представил добровольное письменное информированное согласие на участие в исследовании и публикацию, подписанное после разъяснения потенциальных рисков и преимуществ, а также характера предстоящего исследования. У пациента было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013), обработку персональных данных и согласие на публикацию.

Поступила 22.09.2025. Принята 16.10.2025.

Для цитирования: Шеденкова М.О., Гурьянова А.А., Судьина А.К., Гугучкин Е.П., Карпулевич Е.А., Фатхудинов Т.Х., Гольдштейн Д.В., Салихова Д.И. Нейропротективное действие внеклеточных везикул, полученных из глиальных производных человека на модели глутаматной эксайтотоксичности // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2025. Т. 29. № 4. С. 436–453. doi: 10.22363/2313-0245-2025-29-4-436-453. EDN: AAGDLC

Neuroprotective effect of extracellular vesicles obtained from human glial derivatives on the model of glutamate excitotoxicity

Margarita Shedenkova¹  , Anastasiia Gurianova² , Anastasia Sudina¹ , Egor Guguchin² ,
Evgeny Karpulevich² , Timur Fatkhudinov³ , Dmitry Goldstein¹ , Diana Salikhova¹ 

¹Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

²Institute for System Programming, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

³Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI «Petrovsky National Research Centre of Surgery», Moscow, Russian Federation

 margarita.shedenkova@gmail.com

Abstract. *Relevance.* Modern research in the field of biomedicine leads to the development of therapeutic drugs based on extracellular vesicles, which are defined as sources of production, as well as targeted modification. In the presented work, for the first time, transcriptome profiling of primary culture of cortical neurons under the influence of extracellular vesicles obtained from glial cells during glutamate excitotoxicity was carried out in order to determine differentially expressed genes.

Materials and Methods. Extracellular vesicles were obtained from the conditioned medium of human glial progenitor cells using ultracentrifugation. Model of glutamate excitotoxicity, distributed on the first cultured cortical neurons of cells (P0) with the addition of 100 μ M glutamate. Sequencing of prepared libraries of electronic technologies on the NextSeq 1000 platform (Illumina, USA) using the NextSeq 1000/2000 P2 (200 cycles) v3 reagent kit supplemented with 2 % Phix (Illumina) as an internal control. The criterion for statistical innovation of gene expression change between officially recognized FDR < 0.05 . **Results and Discussion.** Transcriptome analysis showed that the addition of extracellular vesicles during glutamate excitotoxicity leads to increased expression of 190 genes and decreased expression of 309 genes (p value < 0.05 and $|FC| < 1.5$). Gene analysis using the Gene Ontology database showed that genes with increased expression are consistently classified by biological processes. The most represented were: regeneration, reorganization of the extracellular matrix and cytoskeleton, maintenance of homeostasis, activation of the PI3K-Akt pathway and response to cellular stress. Genes with reduced expression were consistently classified into groups: calcium transport, regulation of neuronal processes, apoptosis, glutathergic synapse. These data can indicate that. Extracellular vesicles trigger survival processes in nerve cells when exposed to glutamate and inhibit pathways associated with the entry of substances and glutamate into the cell. **Conclusions.** Extracellular vesicles enhance the expression of genes with survival and inhibit genes, resulting in calcium transport and apoptosis. The results of the study show the promise of using extracellular vesicles of glial origin as a basis for developing new therapeutic approaches to individual neurological diseases.

Keywords: extracellular vesicles, glutamate excitotoxicity, transcriptome analysis, glial progenitor cells, iPSCs

Funding. The work is supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, budget classification code: 075 0110 47 2 U8 70440 621. Scientific topic code: FSSF-2025-0004.

Author contributions. Study idea and design — D.I. Salikhova, T. Kh. Fatkhudinov, D.V. Goldstein; experiment — M.O. Shedenkova, A.K. Sudina; data analysis — M.O. Shedenkova, A.A. Guryanova, E.P. Guguchin, E.A. Karpulevich, article preparation — M.O. Shedenkova; scientific editing of the text — D.I. Salikhova. All authors made a significant contribution to the development of the concept, research, and preparation of the manuscript, read, and approved the final version before publication.

Conflict of interest statement. The authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethics approval. The protocol was approved by this Institutional Institutional Review Board of the Medical Genetics Research Center (Protocol No. 2019-2/3 dated October 13, 2020). Animal experiments are conducted in accordance with these principles and regulations, the Foundation's preferred low standards (ESF) and the Declaration on Humane Animal Nutrition, as well as

in accordance with the Order of the Ministry of Health and Social Development of Russia dated August 23, 2010 No. 708n "On approval of laboratory practice". Animal care, breeding and experimental procedures are carried out in accordance with the requirements of the Ethics Committee of the A.P. Avtyn Research Institute of Human Morphology of the B.V. Petrovsky Russian Scientific Center of Surgery. Protocol No. 38 (14) dated May 31, 2022.

Acknowledgments — not applicable.

Consent for publication. Each study participant provided voluntary written informed consent to participate in the study and publication, signed after explanation of the potential risks and benefits, as well as the nature of the upcoming study. Voluntary written consent was obtained from the patients for the investigation and publication of relevant medical information according to WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013

Received 22.09.2024. Accepted 16.10.2025.

For citation: Shedenkova MO, Gurianova AA, Sudina AK, Guguchin EP, Karpulevich EA, Fatkhudinov TKh, Goldstein DV, Salikhova DI. Neuroprotective effect of extracellular vesicles obtained from human glial derivatives on the model of glutamate excitotoxicity. *RUDN Journal of Medicine*. 2025;29(4):436–453. doi: 10.22363/2313-0245-2025-29-4-436-453. EDN: AAGDLC

Введение

Неврологические расстройства относятся к числу ключевых факторов, снижающих продолжительность и качество жизни пациентов. Их этиология, патофизиологические механизмы и клинические последствия крайне разнообразны. Многие из этих патологий связаны с нарушением гомеостаза глутамата — одного из основных возбуждающих нейромедиаторов ЦНС, играющего центральную роль в процессах нейротрансмиссии [1]. Помимо участия в синаптической передаче глутамат вовлечен в механизмы синаптической пластичности, что определяет его значение в когнитивных функциях, включая обучение и память. Важную роль в его действии играют метаботропные глутаматные рецепторы, расположенные на мембранах нейронов и способные активировать внутриклеточные сигнальные каскады. Через эти механизмы глутамат регулирует рост аксонов, синаптическую пластичность, а также процессы, зависящие от кальциевого сигналинга, такие как апоптоз [2]. Нарушение баланса данного нейромедиатора приводит к когнитивным расстройствам и структурным повреждениям нервной ткани, вплоть до локального некроза [3]. Дисрегуляция глутаматергической системы наблюдается при ряде заболеваний ЦНС, включая болезнь Альцгеймера, ишемический инсульт и боковой амиотрофический склероз [4].

Несмотря на существование широкого спектра фармакологических препаратов и терапевтических подходов, направленных на предотвращение нейротоксического действия избыточных концентраций глутамата, разработка новых эффективных нейропротекторных средств остается важной научно-практической задачей. Внеклеточные везикулы (ВВ) в настоящее время рассматриваются как перспективный инструмент регенеративной медицины, представляющий новый класс мультитаргетных терапевтических агентов [5]. Их поливалентное действие реализуется за счет транспорта специфического молекулярного комплекса (карго), включающего белки, нуклеиновые кислоты, пептиды и метаболиты. Ключевыми преимуществами ВВ являются: стабильность в биологических жидкостях (кровь, лимфа, тканевая жидкость), обеспечиваемая билипидной мембраной; способность к специфическому взаимодействию с клетками-мишениями через мембранные рецепторы; возможность преодоления гематоэнцефалического барьера. Эти уникальные свойства определяют значительный терапевтический потенциал ВВ для патогенетической терапии нейрородегенеративных заболеваний и восстановления функций нервной системы [6].

На основании этих данных целью работы было проанализировать основные сигнальные факторы

и пути, способствующих нейропротекции внеклеточных везикул, полученных из глиальных производных индуцированных плорипотентных стволовых клеток (иПСК) человека, на модели глутаматной эксайтотоксичности с помощью транскриптомного анализа.

Материалы и методы

Получение внеклеточных везикул глиальных клеток-предшественников

Культуры глиальных клеток-предшественников (ГКП), использованные для получения препарата ВВ, были получены ранее от здорового донора путем дифференцировки иПСК в глиальном направлении [7]. ГКП культивировали до достижения 15–17 пассажа и монослоя в среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением: 1% добавки N2 (ПанЭко, Россия), 1% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), 1 мМ глутамина (ПанЭко, Россия), 50 ед/мл пенициллин-стрептомицина (ПанЭко, Россия), 20 нг/мл EGF (Peprotech, США), 20 нг/мл CNTF (Peprotech, США), после чего данную среду отбирали и проводили дальнейшее культивирование в среде выше указанного состава, но без добавления сыворотки в течение 24 часов. Далее собранную среду центрифугировали при 10.000g, 30 минут для осаждения апоптотических телец, а затем при 108.000g 1,5 часа дважды. Полученный осадок анализировали с помощью методики, описанной ранее [8]. Готовые препараты ВВ хранили при температуре –80 °C.

Получение нейроглиальной культуры и постановка глутаматной эксайтотоксичности *in vitro*.

Постановку модели глутаматной эксайтотоксичности производили на нейроглиальных первичных культурах коры головного мозга из новорожденных крысят (Р0), как указано в методике [9]. Кратко, культивирование производилось в среде следующего состава: Neurobasal (Gibco, США) с добавлением 1 мМ глутамин (ПанЭко, Россия), 50 ед/мл пенициллин-стрептомицина (ПанЭко, Россия) и B27-supplement (Gibco, США). На 10-е сутки производили добавку препаратов ВВ-ГКП в какой концентрации 10 мкг/мл. На следующий день осуществляли постановку модели глутаматной

эксайтотоксичности. Для постановки модели были использованы следующие растворы: фосфатно-солевой буфер без Ca^{2+} и Mg^{2+} (ПанЭко, Россия), который использовали для промывки культур, глутаматный раствор (100 мкМ глутамата, 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 10 мМ глицин, 2 мМ CaCl_2 , 5 мМ глюкоза, 20 мМ HEPES) и кальциевый раствор (140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 10 мМ глицин, 2 мМ MgCl_2 , 2 мМ CaCl_2 , 5 мМ глюкоза, 20 мМ HEPES). Этапы постановки модели: после промывки клеток от среды культивирования производилась смена раствора на кальциевый раствор, в случае контрольной группы, и на глутаматный раствор в экспериментальных группах, в которых клетки культивировались 1 час. Затем культуры дважды промывались фосфатно-солевой буфер без Ca^{2+} и Mg^{2+} , после чего возвращалась исходная среда культивирования, отобранная ранее.

Транскриптомный анализ. Сбор и очистка тотальной РНК

С целью исследования внутриклеточных путей, активирующихся в присутствии внеклеточных везикул глиальных клеток-предшественников (ВВ-ГКП) на модели глутаматной эксайтотоксичности, производился анализ тотальной РНК с помощью транскриптомного анализа. Для этого культурам за сутки до постановки модели добавлялись препараты ВВ-ГКП. На следующий день культурам добавлялся глутамат, как ранее было указано в методике. После инкубации с глутаматом культуры инкубировали 4 часа в культуральной среде, после чего производили сбор тотальной РНК с помощью набора RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкциям производителя. Хранение и транспортировку образцов производили на –80 °C.

Полученные образцы тотальной РНК сначала обрабатывали с помощью набора Turbo DNA-Free Kit (Thermo Fisher Scientific) в объеме 50 мкл, а затем очищали с помощью Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter, США) в соответствии с инструкциями производителя. Общее количество РНК измеряли с помощью набора Quant-iT Ribogreen RNA assay kit (ThermoFisher Scientific), а качество

выделенной РНК проверяли с помощью биоанализатора Agilent на чипах Agilent RNA 6000 Pico Chips (Agilent Technologies, США).

Подготовка транскриптомных библиотек и секвенирование РНК

Для приготовления транскриптомных библиотек в качестве исходного материала брали 250 нг тотальной РНК. Библиотеки РНК готовили с помощью модуля магнитной изоляции поли(А) мРНК NEBNext и набора KAPA RNA Hyper Kit (Roche, Швейцария) в соответствии с протоколом производителя. Затем проводили очистку РНК с помощью набора RNA Clean XP (Beckman Coulter, Brea, США) и окончательную очистку библиотек с помощью магнитных бусин Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, США). Распределение библиотек по размерам и их качество оценивали с помощью набора Agilent High Sensitivity DNA kit (Agilent Technologies, США), а концентрацию библиотек определяли с помощью набора Quant-iT DNA Assay Kit, High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific, США). После этого библиотеки эквимолярно объединяли и разводили до конечной концентрации 750 пМ. Секвенирование подготовленных библиотек проводили на платформе NextSeq 1000 (Illumina, США) с использованием набора NextSeq 1000/2000 P2 Reagents kit (200 Cycles) v3, дополненного 2 % Phix (Illumina) в качестве внутреннего контроля.

Биоинформационическая обработка данных секвенирования

Контроль качества и экспрессионный анализ

Первичный контроль качества прочтений производился с помощью утилиты FastQC [10]. Удаление участков низкокачественного чтения и технических адаптеров производилось с использованием утилиты Trimmomatic [11]; прочтения дополнительно обрабатывались утилитой Cutadapt с параметром nextseq-trim 20.

Для количественной оценки уровня экспрессии генов использовалась утилита Salmon (mapping-based mode) [12]. В качестве референсного транскриптома *R. norvegicus* использовался набор полный

транскриптов для версии генома *rn6* по данным базы ENSEMBL версии 106. При построении индекса референсного транскриптома нуклеотидная последовательность генома была использована в качестве decoy-последовательности для того, чтобы избежать ошибочного приписывания прочтений транскриптом. Уровни экспрессии генов рассчитывались на основании значений экспрессии отдельных транскриптов этих генов с помощью R-пакета tximport [13]. Для оценки дифференциальной экспрессии генов между группами был использован R-пакет edgeR, в качестве статистического теста был выбран glmLRT [14]. Критерием статистической значимости изменения экспрессии гена между группами считался FDR < 0,05.

Результаты и обсуждение

Транскриптомный анализ нейроглиальных культур на модели глутаматной эксайтотоксичности

Добавление глутамата к культурам кортикальных нейронов приводило к изменению дифференциальной экспрессии у 1269 генов, из которых у 969 генов была повышена экспрессия в контрольных культурах, а у 300 генов была повышенная экспрессия в культурах с добавлением глутамата (p -value < 0,05 и $|FC| < 1,5$). Далее проводили анализ дифференциально экспрессированных генов, с помощью их классификации по биологическим процессам и по сигнальным путям.

Анализ генов с повышенной экспрессией в контрольной группе с помощью базы данных Gene Ontology показал, что гены достоверно группировались по категориям Биологических процессов.

Из наиболее обогащенных, были выделены категории биологических путей, связанные с работой синапса, удлинению аксонов и развитием дендритного дерева: аксоногенез (94 гена, среди которых можно выделить: *Trpv2*, *Nell2* — данные белки обнаруживаются в аксональном конусе и отвечают за навигацию роста аксона, *Rtn4rl1* — активный участник регенерации аксонов, *Ptpro* — удлинение аксонов

и разветвление отростков в ответ на BDNF, Robo2 — белок Robo-сигналинга, отвечающих за удлинение аксонов, а также гены семейства ephrins *Epb41l3*, *Epha4*, *Ephb6*, *Ephx4* [16–20]); регуляция структуры или активности синапсов (82 гена: *Snap25* — белок синаптовезикул; *Dlg4*, *Arhgap33* — отвечают за пластичность синапсов и контроль структуры [21–23]); развитие дендритов (59 генов: *Kidins220*, *Celsr2*, *Bcl11a* — гены формирования дендритов [24–26]) и транспорт нейромедиаторов (63 гена: *Nos1* — синтетаза оксида азота (NO), который действует как сигнальный мессенджер в различных нейронных процессах; *Slc17a6*, *Slc17a7* — глутаматный транспортер; *Slc2a3*, *Slc2a6* — транспортер глюкозы, *Stxbp5* — регулятор экзоцитоза нейротрансмиттеров [27, 28]), что

может говорить о поддержании нейротрансмиттерной передачи в нейроглиальной культуре, а также о росте и развитии нейритов (рисунок 1).

Также наиболее активируемые биологические процессы можно разделить на несколько групп: регуляция нейрональной синаптической пластичности (27 генов: *Syp* — модулирует работу синапса, который контролирует слияние везикул и экзоцитоз нейротрансмиттеров, *Rasgrf1* — белок сигнального пути Ras, который отвечает за реакцию на приток кальция на постсинаптической мембране [29, 30]); сигнальный путь рецептора глутамата (19 генов: *Gria4*, *Gria1* — субъединицы глутаматного рецептора; *Grin1*, *Grin2d* — гены субъединиц NMDA-рецептора,

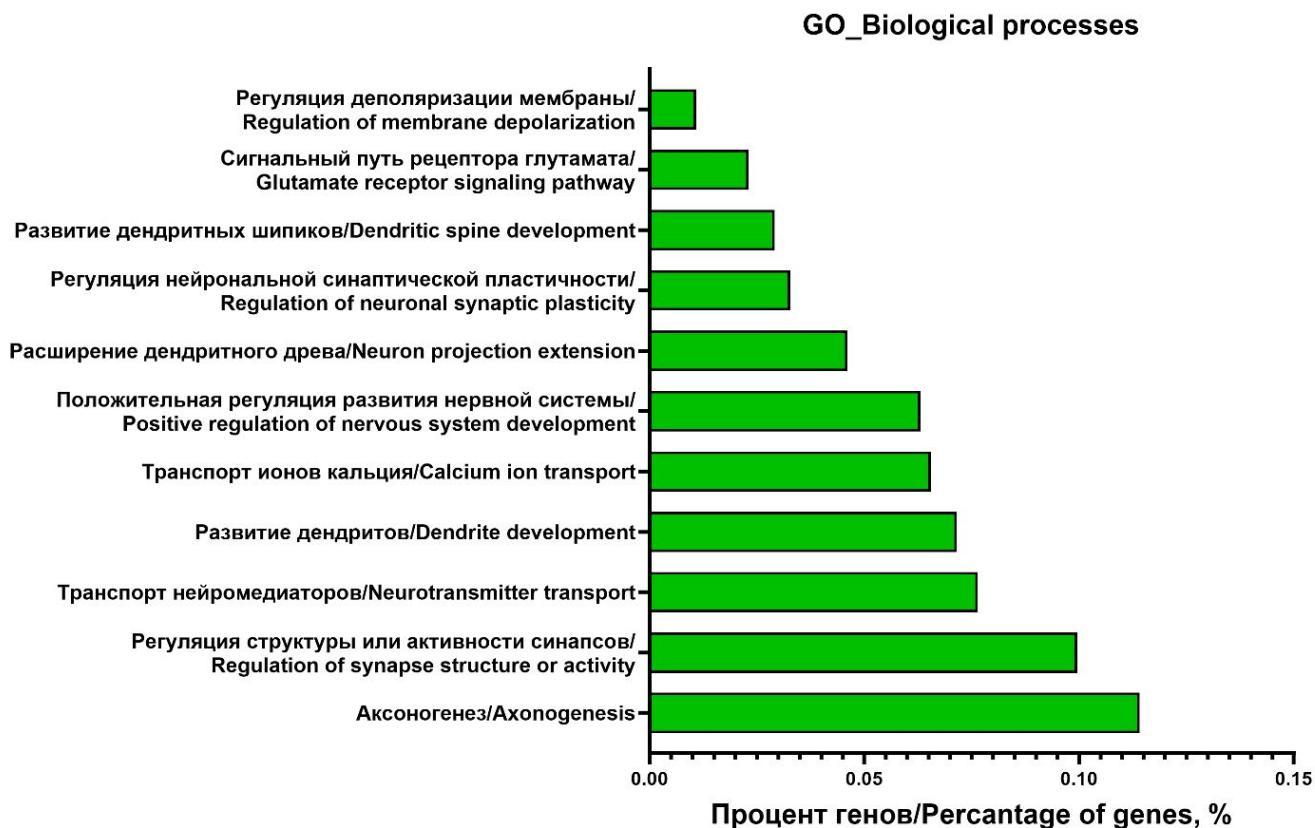


Рис. 1. Результаты классификации генов с повышенной экспрессией в контрольной группе с помощью базы данных Gene Ontology. По оси X указано процент генов, по оси Y выбранные биологические процессы

Fig. 1. Results of classification of genes with increased expression in the control group using the Gene Ontology database. The x-axis shows the percentage of genes, and the y-axis shows the selected biological processes

реагирующие на глутамат [31, 32]), и регуляция деполяризации мембранны (9 генов: *Camk1g*, *Camk2a*, *Camk2b*, *Camk2d*, *Camkk1* — гены Ca^{2+} /кальмодулин зависимые протеин киназы, которые отвечают за ответную реакцию деполяризации мембранны [33, 34]); поддержание гомеостаза и регуляция концентрации ионов кальция — транспорт ионов кальция (54 генов: *Atp2b2*, *Atp2b3*, *Atp2b4* — АТФаза плазматической мембранны, транспортирующая Ca^{2+} (PMCA2), играет решающую роль в нейронах, регулируя концентрацию ионов кальция), позитивная регуляция развития нервной ткани — (52 гена: *Foxg1*, *Bcl11a* — участвуют в развитии нейронов [35]) и пути связанные с ростом и развитием аксонов и дендритов — расширение дендритного древа (38 генов) и развитие дендритных шипиков (24 генов) (рисунок 1).

Также ДЭГ были классифицированы по сигнальным путям с помощью базы данных KEGG.

Были обнаружены следующие сигнальные пути: направление роста аксонов (40 генов, среди которых, *Neo1*, *Pak6*, *Dpysl5*), кальциевый сигнальный путь (32 гена: *Cacna1b*, *Camk1g*, *Camk2d*, *Camk1d*, *Camk2a*), сAMP сигнальный путь (36 генов), сигнальный путь MAPK (33 гена: *Mapk10*, *Ptprr*, *Rasgrf1*, *Map3k12*), глутаматергический синапс (30 генов, например, *Grik2*, *Grik5*, *Grin2d*), фокальная адгезия (14 генов, например, *Itga3*, *Lamb1*, *Prkcg*), долговременная потенциация (13 генов, например, *Itpr1*, *Grin2b*, *Mapk3*, *Prkcg*, *Adcy1*) и апелиновый сигнальный путь (10 генов) (рисунок 2).

После анализа и классификации генов, чья экспрессия была повышенена в контрольной группе, были найдены и проанализированы гены, чья экспрессия была повышенена в группе с добавлением глутамата. Обнаруженные 300 генов были классифицированы по категориям биологических процессов и сигнальных путей.

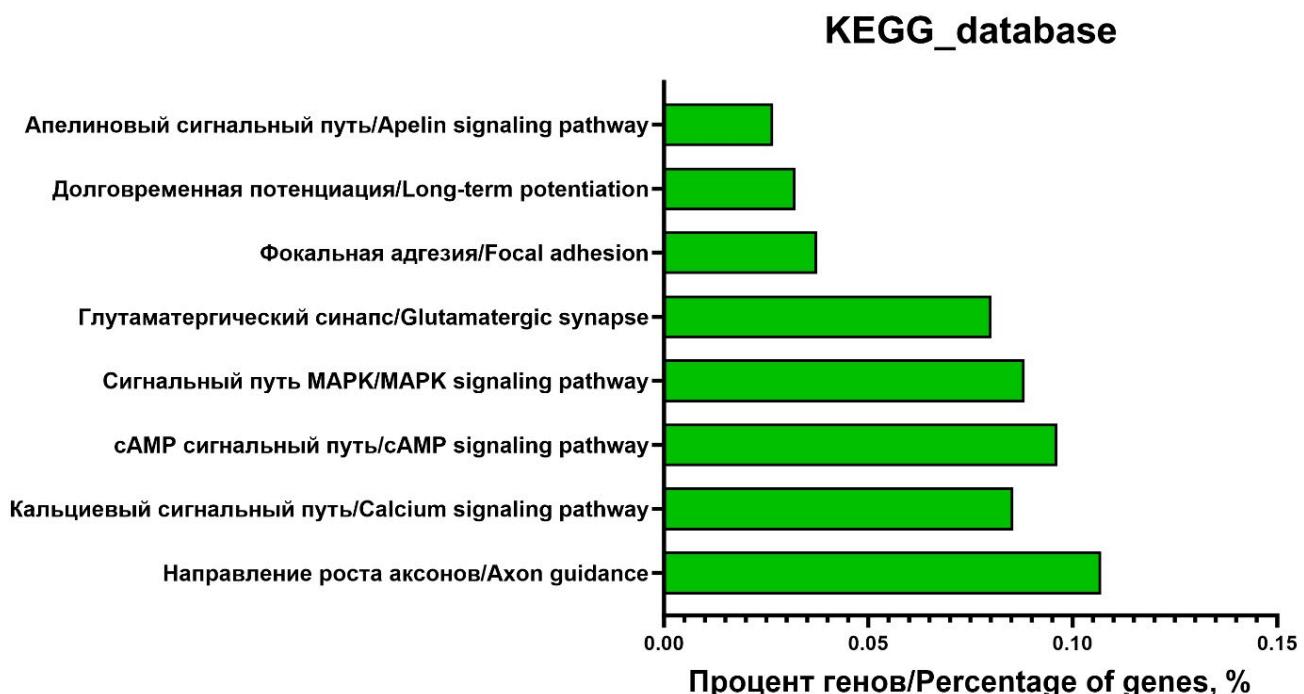


Рис. 2. Результаты классификации генов, чья экспрессия была повышенена в контрольной группе с помощью базы данных KEGG database. По оси X указано процент генов, по оси Y выбраны сигнальные пути

Fig. 2. Results of classification of genes whose expression was increased in the control group using the KEGG database. The X-axis shows the percentage of genes, and the Y-axis shows the selected signaling pathways

При классификации генов по биологическим процессам с помощью базы данных Gene Ontology были обнаружены категории, которые отвечали за активацию путей, связанных с защитными процессами клетки на токсическое действие глутамата, такие как: ответ на гипоксию (28 генов: *Hmox1* — белок, активирующийся в ответ на гипоксию; *Pmaip1* — проапоптозный белок, ингибирующий антиапоптозный белок *Mlc-1* [36]); клеточный ответ на химический стресс (24 гена: *LIF* — активатор путей выживания клеток, *Fos* — является маркером реакции клеток на стресс, *Hsp90b1* — белок теплового шока, реагирующий на накопление неправильно свернутых белков [37-39]); клеточный ответ на окислительный стресс (16 генов: *Gadd45b*, *Gadd45g* — гены, активирующиеся на разные типы стресса, такие как повреждение ДНК активными формами кислорода [40, 41]); клеточный ответ на активные формы кислорода (14 генов: *Nfe2l2* — ген белка, который нейтрализует активные формы кислорода, тем самым защищая клетки [42]); ответ на стресс эндоплазматического ретикулума (11 генов: *Dnajc3*, *Pdia4* — активируется на стресс ЭПР [43, 44]). Все эти пути свидетельствуют об активации внутри нейронов механизмов, отвечающих за внутриклеточный ответ на стресс и на нарушение гомеостаза нейронов. Также были обнаружены пути программированной клеточной гибели — регуляция апоптотического сигнального пути (20 генов: *Anxa1*, *An6* — их экспрессия усиливается во время апоптоза [45, 46]). Кроме того, были выделены категории, связанные с регенерацией и восстановлением — заживление ран (36 генов: *Cdkn1a*, *Csrp1* — ген, активирующийся в ответ на повреждение клетки и стимулирующий ее восстановление, *Nrg1* — активно участвует в развитии нейронов и в восстановлении работы синапсов [47-49]). Наличие этих процессов свидетельствует о том, что клетки при токсическом воздействии глутамата запускают процессы, связанные с восстановлением и выживанием. Так как был обнаружен процесс заживление ран вместе с ним были идентифицированы процессы, отвечающие за клеточную адгезию, а также реорганизацию межклеточного пространства нейроглиальной куль-

туры — регуляция межклеточной адгезии (23 гена: *Sdc4* — ген, отвечающий за межклеточную адгезию и миграцию [50]); организация внеклеточной структуры (21 ген: *Has2* — синтез гиалуроновых нитей, *Piezo1* — ген механотрансдукции, активирующийся при адгезии нейронов [51, 52]) (рисунок 3).

Анализ генов с помощью KEGG database показал активацию сигнальных путей, связанных с клеточной гибелью — Апоптоз (9 генов, среди которых: *Fos*, *Ripk1*, *Pmaip1*), выживанием — сигнальный путь PI3K-Akt (12 генов, такие как, *Cdkn1a*, *Nr4a1*, *Atf4*), сигнальный путь NF-кappa B (7 генов, такие как, *Ripk1*, *NfkB2*) и сигнальный путь JAK-STAT (8 генов, например, *Lif*, *Il4r*, *Stat3*), ответ на разные типы стресса — сигнальный путь TNF (8 генов), сигнальный путь HIF-1 (8 генов, например, *Hmox1*, *Stat3*) и сигнальный путь p53 (5 генов: *Cdkn1a*, *Serpine1*, *Pmaip1*) (рисунок 4).

Анализ дифференциальной экспрессии генов при добавлении культурам внеклеточных везикул на фоне действия глутамата

Инкубация с внеклеточными везикулами приводила к изменению дифференциальной экспрессии 499 генов, из которых 190 генов были с повышенной экспрессией в группе с добавлением ВВ-ГКП и 309 генов — с пониженной экспрессией ($p\text{-value} < 0,05$ и $|FC| < 1,5$).

Анализ с помощью базы данных Gene Ontology показал, что гены с повышенной экспрессией в группе с добавлением ВВ-ГКП достоверно классифицировались по группам Биологических процессов. Из наиболее представленных были выделены следующие категории биологических путей: регенерация, реорганизация внеклеточного матрикса и цитоскелета, поддержание гомеостаза и ответ на клеточный стресс. Так к регенерации можно отнести: заживление ран (18 генов: *Timp1*, *Anxa2*, и другие), передача сигнала фосфатидилинозитол-3-киназой/протеинкиназой B (10 генов: *Fgr* — тирозин киназа, которая активирует NF-кB and ERK1/2 pathways, *Txn1* — тиоредоксин, который работает как антиоксидант, тем самым защищает от окислительного стресса [53]); регенерация (8 генов: *Anxa1* — аннексин 1, который,

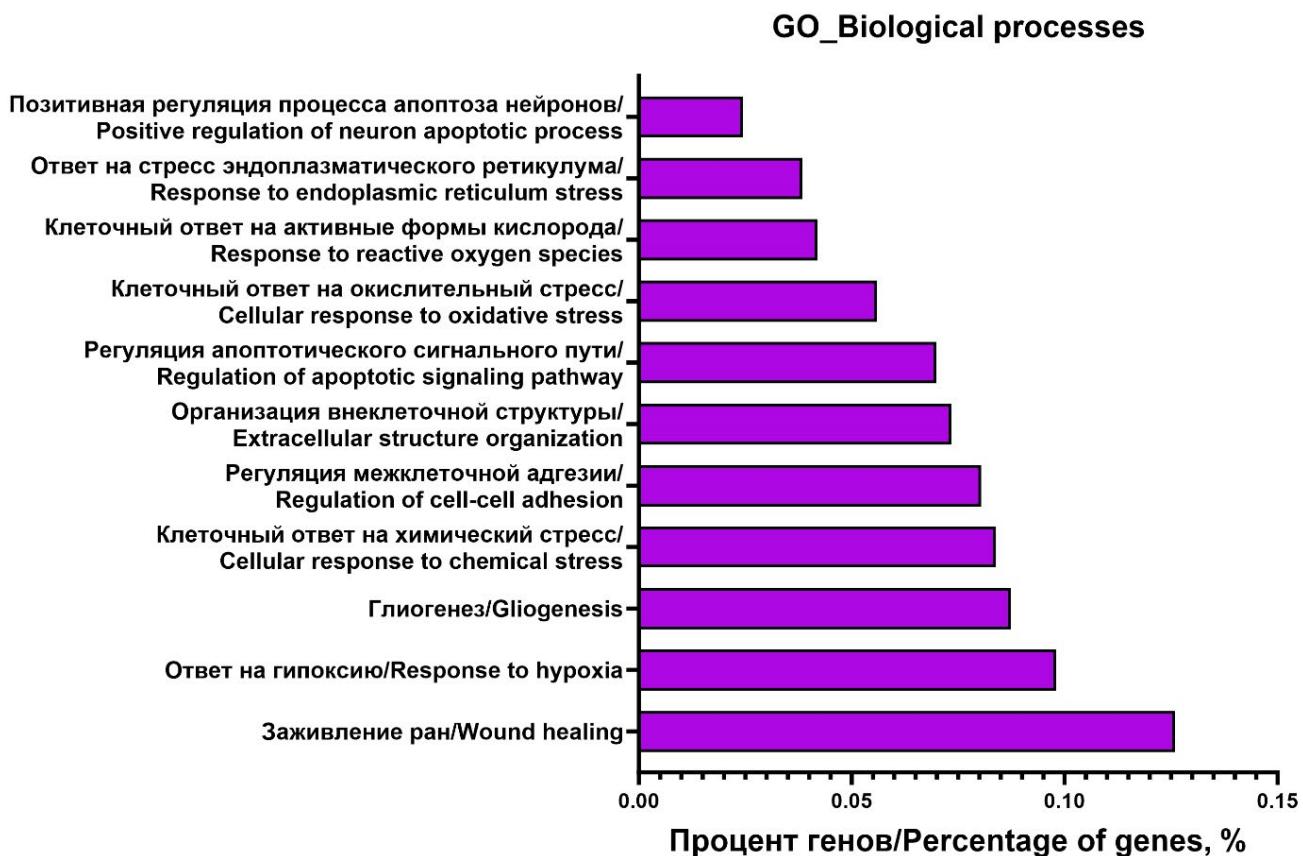


Рис. 3. Результаты классификации генов с повышенной экспрессией в группе с добавлением глутамата с помощью базы данных Gene Ontology Biological processes. По оси X указано процент генов, по оси Y выбранные Biological processes

Fig. 3. Results of classification of genes with increased expression in the glutamate-added group using the Gene Ontology Biological Processes database. The x-axis shows the percentage of genes, and the y-axis shows the selected Biological Processes genes

связываясь со своими рецепторами, активирует пути защиты [54]) и регуляция аксоногенеза (5 генов: Metrn, отвечающий за удлинение аксонов [55]). В категории внеклеточный матрикс и цитоскелет можно выделить следующие подкатегории: организация внеклеточного матрикса (14 генов: Adamts7 — металлопротеиназа, которая может разрушать компоненты внеклеточного матрикса, Vwa1 — активно экспрессируется на концах нейритов и взаимодействует с внеклеточным матрикском [56, 57]); организация активнового цитоскелета (9 генов, например Arpc1b — белок, отвечающий

за разветвленность актинового цитоскелета и тем самым за разветвленность нейритов [58]).

Также в категории ответ на стресс можно выделить: ответ на активные формы кислорода (10 генов, такие как Nptxr — пентраксин, который контролирует формирование синапса и поступление ионов внутрь нейронов; Pex5 — ген, участвующий в формировании пероксисомах [59]); ответ на перекись водорода (7 генов) и ответ на повреждение аксона (5 генов, например Spp1, который связан с выживанием клеток и реорганизацией аксона при повреждении [60]).

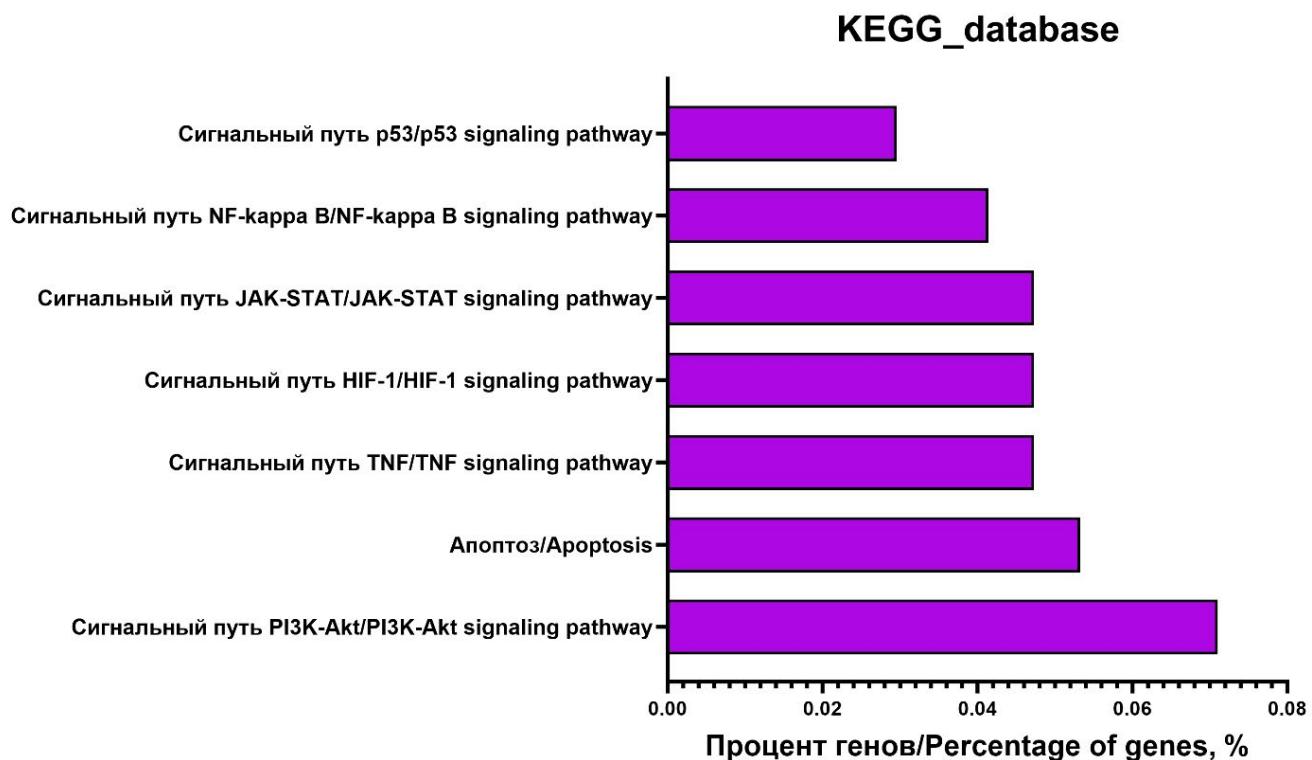


Рис. 4. Результаты классификации генов, чья экспрессия выше в группе с добавлением глутамата с помощью базы данных KEGG database. По оси X указано процент генов, по оси Y выбранные сигнальные пути

Fig. 4. Results of classification of genes whose expression is higher in the glutamate-supplemented group using the KEGG database. The percentage of genes is shown on the X-axis, and the selected signaling pathways are shown on the Y-axis

Последней категорией процессов, которые удалось идентифицировать, было поддержание внутриклеточного гомеостаза, к которой удалось отнести следующие процессы: регуляция транспорта ионов металлов (12 генов: *Tesc* — контролирует поступление ионов металлов внутрь нейронов, особенно ионов кальция, связываясь с ним, *Kcnip2* — потенциал-зависимый канал для ионов калия, *Fxyd5* — регулирует работу Na^+/K^+ -ATPase [61–63]); положительная регуляция секреции клеткой (8 генов); секреция пептидных гормонов (7 генов: *Rbp4* — участвует в транспорте ретиноевой кислоты, *Npy* — нейропептид, необходимый для выживания нейронов [64, 65]) и регуляция деполяризации мембранны (3 гена) (рисунок 5А).

Однако, анализируя пути, в которые группировались гены, чья экспрессия была ниже в группе с добавлением ВВ-ГКП, можно увидеть процессы,

связанные с физиологией нейронов: аксоногенез (24 гена: *Ttc3*, *Vangl2*, *Nfib* — ингибирование появления нейритов и удлинение аксонов, *Mapt* — ген белка, отвечающего за транспорт в аксонах и дендритах [66–69]); регуляция клеточного ответа на стресс (20 генов: *Tmem33* — это индуцируемая стрессом ЭПР молекула, которая модулирует каскад сигналов ответа на развернутый белок, приводящий к апоптозу, *Nfe2l1* — еще один ген, активирующийся стрессом ЭПР, *Foxo1* — один из ключевых генов ответа на окислительный стресс [70–72]); развитие дендритов (19 генов: *Mef2c* — ген белка, который регулирует формирование дендритных шипиков, который стимулирует элиминацию шипиков во время эксайтотоксичности [73]); регуляция организации синапсов (18 генов: *Tnik*, *Zfp804a*, *Tanc2* — гены, отвечающий за регуляцию структуры и функции синапсов [74–76]); транспорт ионов кальция (18 ге-

нов: *Cacna1c*, *Cacna1d*, *Cacna2d1*, *Ryr2* — гены ионных транспортеров, контролирующих транспорт ионов кальция внутрь цитоплазмы нейронов); актин-опосредованное сокращение клеток (8 генов: *Limch1*, *Pde4d* [77]); негативная регуляция экспрессии генов

(10 генов); организация дендритного дерева (11 генов); транспорт ионов кальция в цитозоль (5 генов); регуляция высвобождения ионов кальция в цитозоль саркоплазматическим ретикулумом (4 гена) (рисунок 5Б).

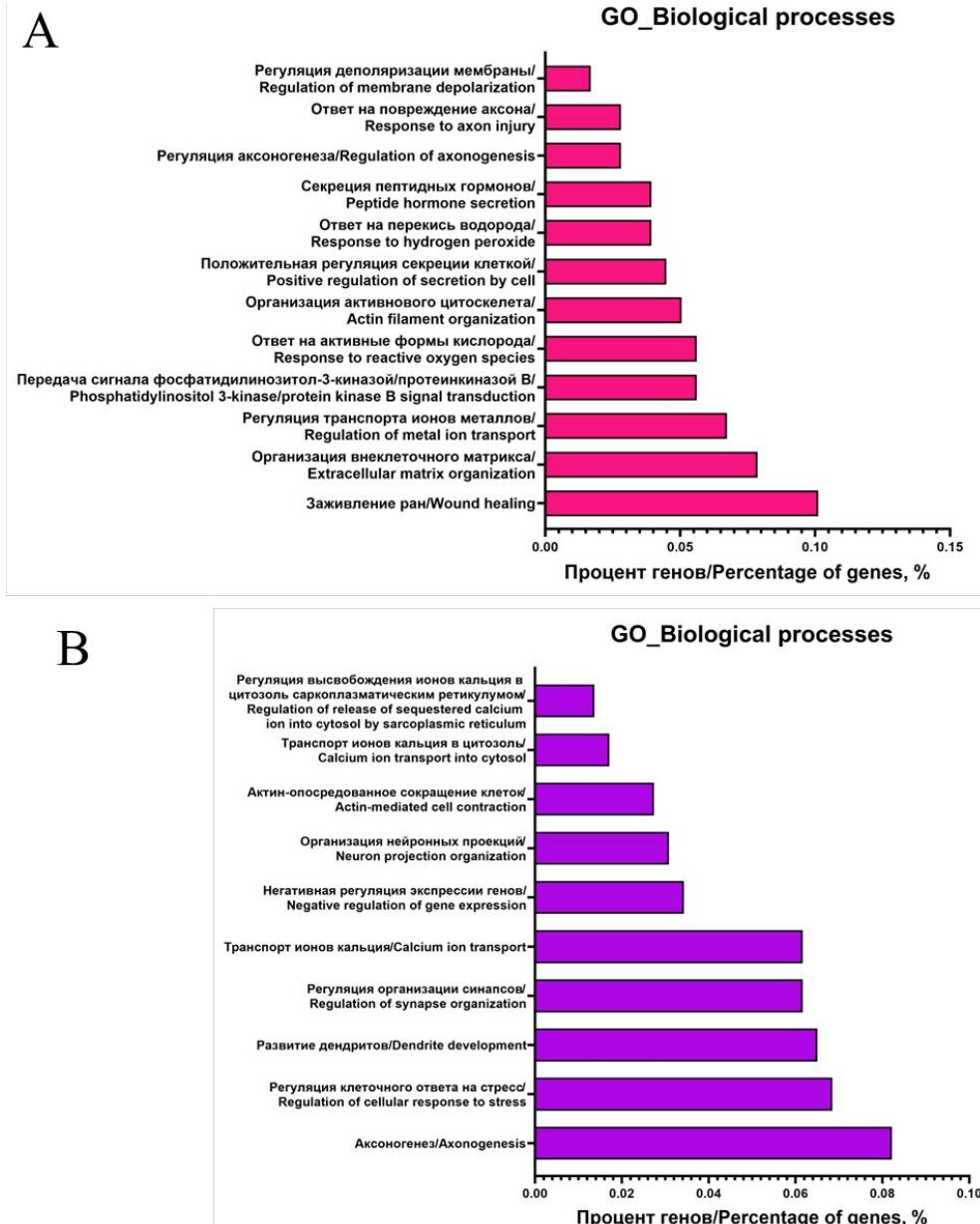


Рис. 5. Результаты классификации генов, чья экспрессия была повышенена (А) и понижена (Б) в группе с добавлением ВВ-ГКП с помощью базы данных Gene Ontology. По оси Х указано число генов, по оси Y выбранные сигнальные пути

Fig. 5. Results of classification of genes whose expression was increased (A) and decreased (B) in the group with the addition of BB-GKP using the Gene Ontology database. The number of genes is indicated on the X-axis, and the selected signaling pathways are shown on the Y-axis

Для более глубокого анализа процессов, как и в предыдущем эксперименте мы с помощью KEGG database классифицировали гены по сигнальным путям. Гены с повышенной экспрессией достоверно классифицировались по следующим путям: Фокальная адгезия (7 генов, например, *Myl9*, *Spp1*, *Thbs4*), Сигнальный путь PI3K-Akt (7 генов, такие как, *Pck2*, *Fn1*), Фагосома (5 генов, например: *Sec61b*) и Регуляция актинового цитоскелета (5 генов, такие как: *Arpc1b*, *Rras*) (рисунок 6А). Гены с пониженной экспрессией тоже достоверно группировались по категориям сигнальных путей, таких как: Сигнальный путь MAPK (13 генов: *Map4k4*, *Ppp3ca*, *Cacna1d*, *Cacna2d1*), Кальциевый сигнальный путь (11 генов: *Atp2b4*, *Atp2b1*, *Plcb1*, *Ryr2*, *Camk4*), Клеточное старение (8 генов: *RT1-S3*, *Tgfb2*, *Rbl1*, *Hipk2*), Наведение аксонов (7 генов: *Srgap1*, *Pak3*, *Ephb1*, *Ppp3ca*, *Sema5a*, *Cxcl12*), Долговременная потенциация (6 генов) и Глутаматергический синапс (5 генов: *Plcb1*, *Prkacb*, *Ppp3ca*) (рисунок 6Б).

Эксайтотоксичность представляет собой ключевой патогенетический механизм повреждения нервной ткани при различных неврологических патологиях. Исследование глутамат-опосредованной эксайтотоксичности имеет принципиальное значение для понимания патогенеза этих заболеваний

и разработки новых терапевтических стратегий. Глутамат как основной возбуждающий нейромедиатор ЦНС при избыточном накоплении вызывает необратимые повреждения нейронов. В процессе синаптической передачи глутамат высвобождается в синаптическую щель и связывается со специфическими рецепторами постсинаптической мембраны. Активация этих рецепторов приводит к: усилению поступления ионов кальция и натрия в цитозоль, деполяризации мембраны и передаче электрического сигнала. Эти процессы стимулируют: активацию внутриклеточных сигнальных каскадов, которые влияют на изменения внутриклеточного гомеостаза. Патологическое накопление глутамата вызывает гиперстимуляцию рецепторов (феномен эксайтотоксичности), что приводит к: критическому повышению внутриклеточного Ca^{2+} , дисфункции митохондрий, окислительному стрессу, активации стресса эндоплазматического ретикулюма, что приводит к запуску апоптоза. Эти нарушения в итоге приводят к необратимой гибели нейронов, что определяет центральную роль эксайтотоксичности в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Это согласуется с полученными данными транскриптомного анализа, которые показали, что глутамат запускает внутринейронов пути, связанные с активацией и регуляцией

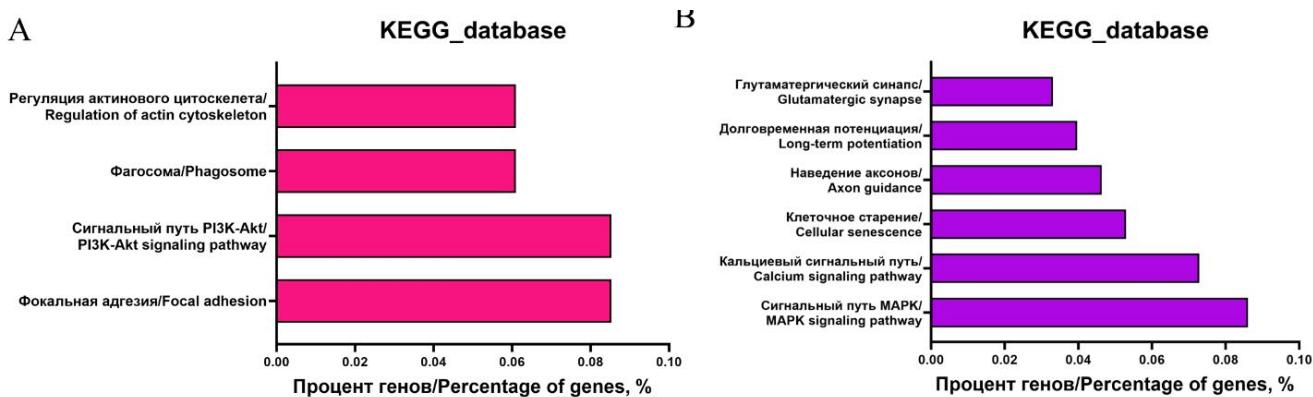


Рис. 6. Результаты классификации генов, чья экспрессия была повышенна (А) и понижена (Б) в группе с добавлением ВВ-ГКП с помощью базы данных KEGG database. По оси X указано число генов, по оси Y выбранные сигнальные пути

Fig. 6. Results of classification of genes whose expression was increased (A) and decreased (B) in the group with the addition of BB-GKP using the KEGG database. The number of genes is indicated on the X-axis, and the selected signalling pathways are indicated on the Y-axis

апоптоза, а также реакцию на клеточный стресс, вызванный активными формами кислорода и нарушением работы эндоплазматического ретикулюма, что согласуется с общеизвестными данными [78]. Также глутамат запускает глиогенез, так как астроциты способствуют защите нейронов при глутаматной эксайтотоксичности, активно поглощая избыток глутамата из внеклеточного пространства [79]. Также есть активация таких путей, как сигнальный путь PI3K-Akt, сигнальный путь NF-кappa B и сигнальный путь JAK-STAT, что свидетельствует о стимулировании защитных механизмов в нервных клетках.

Глиальные клетки, составляющие большинство клеток центральной нервной системы человека, играют ключевую роль в поддержании ее нормального функционирования. Эти клетки обеспечивают комплексное регулирование деятельности ЦНС через выполнение метаболических, структурных и гомеостатических функций, включая контроль синаптической передачи, поддержание нейронального гомеостаза и регуляцию гематоэнцефалического барьера. Важнейшей особенностью глии является их способность осуществлять нейропротекторное действие как посредством прямого межклеточного взаимодействия, так и через паракринные механизмы, реализуемые путем секреции внеклеточных везикул, цитокинов и других сигнальных молекул. Данные механизмы обеспечивают регуляцию нейрональной активности и защиту нервной ткани от повреждающих воздействий.

Уже довольно давно ведутся исследования нейропротекторного свойства внеклеточных везикул, полученных из разных источников, в том числе от нейральных стволовых клеток человека, нейральных клеток-предшественников человека, астроцитов, олигодендроцитов. Особое внимание привлекают внеклеточные везикулы, полученные из астроцитов (ABB), так как есть большое количество исследований об их влиянии на гомеостаз нервной ткани. Так в них обнаруживаются белки FGF-2 и VEGF, стимулирующие: регенерацию тканей, выживание и дифференцировку клеток, за счет активации сигнальный пути PI3K-Akt [80]. Также

есть данные о содержании в АВВ белков теплового шока, которые влияют на корректное сворачивание белков и ингибирование внутриклеточного стресса [81]. Есть исследования, согласно которым астроцитарные ВВ стимулируют активацию сигнальных путей NF-кВ и HIF-1alpha в клетках нервной ткани *in vivo*, которые отвечают за реакцию нервных клеток на окислительный стресс, гипоксию и реактивные формы кислорода [82]. Есть исследования, что АВВ влияют на рост отростков нейронов и направление роста аксонов, а также на нейронную активность и синаптическую передачу [83-84].

В ходе транскриптомного анализа с помощью базы данных KEGG при сравнении генов можно увидеть, что ВВ в присутствии глутамата повышают дифференциальную экспрессию генов, связанных с активацией PI3K-Akt сигнального пути, который активирует нейропротекторные и регенеративные процессы. Поэтому среди групп, полученных при классификации генов с повышенной экспрессией в группе с добавлением ВВ-ГКП, с помощью базы данных Gene Ontology, выделяются следующие биологические процессы: заживление раны, ответ на повреждение аксонов, реакция на клеточный стресс, вызванный активными формами кислорода и гипоксией, а также контроль деполяризации мембранны и транспорта ионов металлов. Однако при этом ВВ в присутствии глутамата снижают дифференциальную экспрессию генов, отвечающих за развитие дендритного дерева, удлинение аксонов, организацию синапсов, что может быть связано со стимуляцией путей выживания нейронов. Есть данные, что при определенных условиях, особенно в процессах, связанных с выживанием, нейроны могут подавлять формирование отростков. Это подавление не является общим подавлением развития дендритов и аксонов, а представляет собой специфический механизм, определяющий приоритет выживания в условиях ограниченных ресурсов или стресса [85]. Кроме того, ВВ снижают экспрессию генов, отвечающих за поступление ионов кальция в цитозоль как из внеклеточного пространства, так и из эндоплазматического ретикулюма, а также ингибируют формирование глутаматергического

синапса и долговременную потенциацию, что также является защитным механизмом от гиперстимуляцией глутаматом [86].

Ограничением данного исследования является использование в экспериментах и анализе препарата ВВ-ГКП, полученных от одного донора.

Изучение механизмов нейропротекции ВВ, полученных от различных клеточных источников, остается актуальной задачей современной клеточной биологии и нейробиологии. При этом уже полученные данные позволяют утверждать, что ВВ имеют ряд преимуществ перед другими терапевтическими агентами благодаря их мультитаргетности и способности активировать множество внутриклеточных путей. Дальнейшее изучение механизмов их воздействия на нервные клетки может привести к созданию нового эффективного терапевтического агента для лечения неврологических заболеваний.

Выводы

Полученные данные свидетельствуют о том, что ВВ, продуцируемые глиальными предшественниками, полученными из iPSC человека, стимулируют нейропротекцию, с помощью активации путей, связанных с ответом на клеточный стресс, ингибированием поступления ионов кальция в цитозоль, а также активацию путей выживания, таких как PI3K-Akt сигнальный путь. Использование данного терапевтического агента позволило бы частично нивелировать последствия патологической экспайто-токсичности глутамата, тем самым способствовать более эффективному лечению нейродегенеративных заболеваний.

Список литературы / References

1. McEntee WJ, Crook TH. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology (Berl)*. 1993;111(4). doi:10.1007/BF02253527
2. Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50. doi:10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533
3. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch*. 2010;460(2). doi:10.1007/s00424-010-0809-1
4. Miladinovic T, Nashed MG, Singh G. Overview of glutamatergic dysregulation in central pathologies. *Biomolecules*. 2015;5(4). doi:10.3390/biom5043112
5. Kumar MA, Baba SK, Sadida HQ, Marzooqi S Al, Jerobin J, Altemani FH, Algehainy N, Alanazi MA, Abou-Samra AB, Kumar R, Al-Shabeeb Akil AS, Macha MA, Mir R, Bhat AA. Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1). doi:10.1038/s41392-024-01735-1
6. Cecchin R, Troyer Z, Witwer K, Morris K V. Extracellular vesicles: The next generation in gene therapy delivery. *Molecular Therapy*. 2023;31(5). doi:10.1016/j.ymthe.2023.01.021
7. Salikhova D, Bukharova T, Cherkashova E, Namestnikova D, Leonov G, Nikitina M, Gubskiy I, Akopyan G, Elchaninov A, Midiber K, Bulatenco N, Mokrousova V, Makarov A, Yarygin K, Chekhonin V, Mikhaleva L, Fatkhudinov T, Goldshtain D. Therapeutic effects of hippocampal glial and neuronal progenitor cells-conditioned medium in experimental ischemic stroke in rats. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9). doi:10.3390/ijms22094694
8. Turovsky EA, Golovicheva V V, Varlamova EG, Danilina TI, Goryunov K V, Shevtsova YA, Pevzner IB, Zorova LD, Babenko VA, Evtushenko EA, Zharikova AA, Khutorenko AA, Kovalchuk SI, Plotnikov EY, Zorov DB, Sukhikh GT, Silachev DN. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles afford neuroprotection by modulating PI3K/AKT pathway and calcium oscillations. *Int J Biol Sci*. 2022;18(14). doi:10.7150/ijbs.73747
9. Bakaeva Z, Lizunova N, Tarzhanov I, Boyarkin D, Petrichuk S, Pinelis V, Fisenko A, Tuzikov A, Sharipov R, Surin A. Lipopolysaccharide From *E. coli* Increases Glutamate-Induced Disturbances of Calcium Homeostasis, the Functional State of Mitochondria, and the Death of Cultured Cortical Neurons. *Front Mol Neurosci*. 2022;14. doi:10.3389/fnmol.2021.811171
10. Andrews S, others. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. <https://WwwBioinformaticsBabrahamAcUk/Projects/Fastqc/>. Published online 2019.
11. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmo1. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170matic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15).
12. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods*. 2017;14(4). doi:10.1038/nmeth.4197
13. Soneson C, Love MI, Robinson MD. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res*. 2015;4. doi:10.12688/f1000research.7563.1
14. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2009;26(1). doi:10.1093/bioinformatics/btp616
15. Mihelc EM, Siepe DH, Chakraborty A, Kalocsay M, Moiseenkova-Bell V. Exploring the role of TRPV2 in neuronal development. *Biophys J*. 2024;123(3). doi:10.1016/j.bpj.2023.11.2380
16. Kim TH, Lee HK, Seo IA, Bae HR, Suh DJ, Wu J, Rao Y, Hwang KG, Park HT. Netrin induces down-regulation of its receptor, Deleted in Colorectal Cancer, through the ubiquitin-proteasome pathway in the embryonic cortical neuron. *J Neurochem*. 2005;95(1). doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03314.x
17. Wang J, Miao Y, Wicklein R, Sun Z, Wang J, Jude KM, Fernandes RA, Merrill SA, Wernig M, Garcia KC, Südhof TC. RTN4/NoGo-receptor binding to BAI adhesion-GPCRs regulates neuronal development. *Cell*. 2021;184(24). doi:10.1016/j.cell.2021.10.016
18. Gatto G, Dudanova I, Suettlerin P, Davies AM, Drescher U, Bixby JL, Klein R. Protein tyrosine phosphatase receptor type O inhibits trigeminal axon growth and branching by repressing TrkB and ret signaling. *Ann Intern Med*. 2013;158(6). doi:10.1523/JNEUROSCI.4707-12.2013
19. Kim M, Roesener AP, Mendonca PRF, Mastick GS. Robo1 and Robo2 have distinct roles in pioneer longitudinal axon guidance. *Dev Biol*. 2011;358(1). doi:10.1016/j.ydbio.2011.07.025
20. Zhao J, Cooper LT, Boyd AW, Bartlett PF. Decreased signalling of EphA4 improves functional performance and motor neuron survival in the SOD1G93A ALS mouse model. *Sci Rep*. 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-29845-1

21. Yang H, Zhang M, Shi J, Zhou Y, Wan Z, Wang Y, Wan Y, Li J, Wang Z, Fei J. Brain-Specific SNAP-25 Deletion Leads to Elevated Extracellular Glutamate Level and Schizophrenia-Like Behavior in Mice. *Neural Plast.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/4526417
22. Schuster S, Rivalan M, Strauss U, Stoenica L, Trimbuch T, Rademacher N, Parthasarathy S, Lajkó D, Rosenmund C, Shoichet SA, Winter Y, Tarabykin V, Rosário M. NOMA-GAP/ARHGAP33 regulates synapse development and autistic-like behavior in the mouse. *Mol Psychiatry*. 2015;20(9). doi:10.1038/mp.2015.42
23. Feyder M, Karlsson RM, Mathur P, Lyman M, Bock R, Momenan R, Munasinghe J, Scattoni ML, Ihne J, Camp M, Graybeal C, Strathdee D, Begg A, Alvarez VA, Kirsch P, Rietschel M, Cichon S, Walter H, Meyer-Lindenberg A, Grant SGN, Holmes A. Association of mouse Dlg4 (PSD-95) gene deletion and human DLG4 gene variation with phenotypes relevant to autism spectrum disorders and Williams' syndrome. *American Journal of Psychiatry*. 2010;167(12). doi:10.1176/appi.ajp.2010.10040484
24. Tolve M, Ulusoy A, Patikas N, Islam KUS, Bodea GO, Öztürk E, Broske B, Mentani A, Wagener A, van Loo KMJ, Britsch S, Liu P, Khaled WT, Metzakopian E, Baader SL, Di Monte DA, Blaess S. The transcription factor BCL11A defines distinct subsets of midbrain dopaminergic neurons. *Cell Rep*. 2021;36(11). doi:10.1016/j.celrep.2021.109697
25. Chen B, Wang L, Li X, Shi Z, Duan J, Wei JA, Li C, Pang C, Wang D, Zhang K, Chen H, Na W, Zhang L, So KF, Zhou L, Jiang B, Yuan TF, Qu Y. Celsr2 regulates NMDA receptors and dendritic homeostasis in dorsal CA1 to enable social memory. *Mol Psychiatry*. 2024;29(6). doi:10.1038/s41380-022-01664-x
26. del Puerto A, Lopez-Fonseca C, Simón-García A, Martí-Prado B, Barrios-Muñoz AL, Pose-Utrilla J, López-Menéndez C, Alcover-Sánchez B, Cesca F, Schiavo G, Campanero MR, Fariñas I, Iglesias T, Porlan E. Kidins220 sets the threshold for survival of neural stem cells and progenitors to sustain adult neurogenesis. *Cell Death Dis*. 2023;14(8). doi:10.1038/s41419-023-05995-7
27. Chang T, Zhang M, Zhu J, Wang H, Li C cong, Wu K, Zhang Z ru, Jiang Y hong, Wang F, Wang H tian, Wang XC, Liu Y. Simulated vestibular spatial disorientation mouse model under coupled rotation revealing potential involvement of Slc17a6. *iScience*. 2023;26(12). doi:10.1016/j.isci.2023.108498
28. Shen W, Kilander MBC, Bridi MS, Frei JA, Niescier RF, Huang S, Lin YC. Tomosyn regulates the small RhoA GTPase to control the dendritic stability of neurons and the surface expression of AMPA receptors. *J Neurosci Res*. 2020;98(6). doi:10.1002/jnr.24608
29. Harper CB, Mancini GMS, van Slegtenhorst M, Cousin MA. Altered synaptobrevin-II trafficking in neurons expressing a synaptophysin mutation associated with a severe neurodevelopmental disorder. *Neurobiol Dis*. 2017;108. doi:10.1016/j.nbd.2017.08.021
30. Feig LA. Regulation of neuronal function by Ras-GRF exchange factors. *Genes Cancer*. 2011;2(3). doi:10.1177/1947601911408077
31. Itoh M, Okuno H, Yamada D, Yamashita M, Abe M, Natsume R, Kaizuka T, Sakimura K, Hoshino M, Mishina M, Wada K, Sekiguchi M, Hayashi T. Perturbed expression pattern of the immediate early gene Arc in the dentate gyrus of GluA1 C-terminal palmitoylation-deficient mice. *Neuropsychopharmacol Rep*. 2019;39(1). doi:10.1002/npr2.12044
32. Ragnarsson L, Zhang Z, Das SS, Tran P, Andersson Å, des Portes V, Desmettre Altuzarra C, Remerand G, Labalme A, Chatron N, Sanlaville D, Lesca G, Anggono V, Vetter I, Keramidas A. GRIN1 variants associated with neurodevelopmental disorders reveal channel gating pathomechanisms. *Epilepsia*. 2023;64(12). doi:10.1111/epi.17776
33. Piechota M, Skupio U, Borczyk M, Ziółkowska B, Gołda S, Szumiec Ł, Szkłarczyk-Smolana K, Bilecki W, Rodriguez Parkitna JM, Korostyński M. Glucocorticoid-Regulated Kinase CAMKII in the Central Amygdala Controls Anxiety-like Behavior in Mice. *Int J Mol Sci*. 2022;23(20). doi:10.3390/ijms232012328
34. Mohanan AG, Gunasekaran S, Jacob RS, Omkumar R V. Role of Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Type II in Mediating Function and Dysfunction at Glutamatergic Synapses. *Front Mol Neurosci*. 2022;15. doi:10.3389/fnmol.2022.855752
35. Simon R, Wiegrefe C, Britsch S. Bcl11 Transcription Factors Regulate Cortical Development and Function. *Front Mol Neurosci*. 2020;13. doi:10.3389/fnmol.2020.00051
36. Li H, Liu B, Lian L, Zhou J, Xiang S, Zhai Y, Chen Y, Ma X, Wu W, Hou L. High dose expression of heme oxygenase-1 induces retinal degeneration through ER stress-related DDIT3. *Mol Neurodegener*. 2021;16(1). doi:10.1186/s13024-021-00437-4
37. Gadient RA, Lein P, Higgins D, Patterson PH. Effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on the morphology and survival of cultured hippocampal neurons and glial cells. *Brain Res*. 1998;798(1-2). doi:10.1016/S0006-8993(98)00236-4
38. Joo JY, Schaukowitch K, Farbiak L, Kilaru G, Kim TK. Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-fos enhancers. *Nat Neurosci*. 2015;19(1). doi:10.1038/nn.4170
39. Huang X, Zhang W, Yang N, Zhang Y, Qin T, Ruan H, et al. Identification of HSP90B1 in pan-cancer hallmarks to aid development of a potential therapeutic target. *Mol Cancer*. 2024;23(1). doi:10.1186/s12943-023-01920-w
40. Huang M, Wang J, Liu W, Zhou H. Advances in the role of the GADD45 family in neurodevelopmental, neurodegenerative, and neuropsychiatric disorders. *Front Neurosci*. 2024;18. doi:10.3389/fnins.2024.1349409
41. Labonté B, Jeong YH, Parise E, Issler O, Fatma M, Engmann O, Cho KA, Neve R, Nestler EJ, Koo JW. Gadd45b mediates depressive-like role through DNA demethylation. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-40844-8
42. Levings DC, Pathak SS, Yang YM, Slattery M. Limited expression of Nrf2 in neurons across the central nervous system. *Redox Biol*. 2023;65. doi:10.1016/j.redox.2023.102830
43. Lytrivi M, Senée V, Salpea P, Fantuzzi F, Philippi A, Abdulkarim B, Sawatani T, Marín-Cañas S, Pachera N, Degavre A, Singh P, Derbois C, Lechner D, Ladrière L, Igoillo-Esteve M, Cosentino C, Marselli L, Deleuze JF, Marchetti P, Eizirik DL, Nicolino M, Chaussenot A, Julier C, Cnop M. DNAJC3 deficiency induces β -cell mitochondrial apoptosis and causes syndromic young-onset diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2021;184(3). doi:10.1530/EJE-20-0636
44. Kang L, Wang D, Shen T, Liu X, Dai B, Zhou D, Shen H, Gong J, Li G, Hu Y, Wang P, Mi X, Zhang Y, Tan X. PDIA4 confers resistance to ferroptosis via induction of ATF4/SLC7A11 in renal cell carcinoma. *Cell Death Dis*. 2023;14(3). doi:10.1038/s41419-023-05719-x
45. Ousingsawat J, Wanitchakool P, Kmit A, Romao AM, Jantarajit W, Schreiber R, Kunzelmann K. Anoctamin 6 mediates effects essential for innate immunity downstream of P2X7 receptors in macrophages. *Nat Commun*. 2015;6. doi:10.1038/ncomms7245
46. Xia Q, Li X, Zhou H, Zheng L, Shi J. S100A11 protects against neuronal cell apoptosis induced by cerebral ischemia via inhibiting the nuclear translocation of annexin A1 article. *Cell Death Dis*. 2018;9(6). doi:10.1038/s41419-018-0686-7
47. Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, Van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M. Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures. *Am J Hum Genet*. 2016;98(3). doi:10.1016/j.ajhg.2016.01.006
48. Marqués-Torrezón MÁ, Porlan E, Banito A, Gómez-Ibarlucea E, Lopez-Contreras AJ, Fernández-Capetillo Ó, Vidal A, Gil J, Torres J, Fariñas I. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1). doi:10.1016/j.stem.2012.12.001
49. Ting AK, Chen Y, Wen L, Yin DM, Shen C, Tao Y, Liu X, Xiong WC, Mei L. Neuregulin 1 promotes excitatory synapse development and function in GABAergic interneurons. *Journal of Neuroscience*. 2011;31(1). doi:10.1523/JNEUROSCI.2538-10.2011
50. Escobedo N, Contreras O, Muñoz R, Farías M, Carrasco H, Hill C, Tran U, Pryor SE, Wessely O, Copp AJ, Larraín J. Syndecan 4 interacts

- genetically with Vangl2 to regulate neural tube closure and planar cell polarity. *Development (Cambridge)*. 2013;140(14). doi:10.1242/dev.091173
51. Fowke TM, Karunasinghe RN, Bai JZ, Jordan S, Gunn AJ, Dean JM. Hyaluronan synthesis by developing cortical neurons in vitro. *Sci Rep*. 2017;7: doi:10.1038/srep44135
 52. Zhu J, Xian Q, Hou X, Wong KF, Zhu T, Chen Z, He D, Kala S, Murugappan S, Jing J, Wu Y, Zhao X, Li D, Guo J, Qiu Z, Sun L. The mechanosensitive ion channel Piezo1 contributes to ultrasound neuromodulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(118). doi:10.1073/pnas.2300291120
 53. Huang T, Fu G, Gao J, Zhang Y, Cai W, Wu S, Jia S, Xia S, Bachmann T, Bekker A, Tao YX. Fgr contributes to hemorrhage-induced thalamic pain by activating NF- κ B/ ERK1/2 pathways. *JCI Insight*. 2020;5(20). doi:10.1172/jci.insight.139987
 54. Wang A, Zhang H, Li X, Zhao Y. Annexin A1 in the nervous and ocular systems. *Neural Regen Res*. 2024;19(3). doi:10.4103/1673-5374.380882
 55. Zheng SL, Li ZY, Song J, Liu JM, Miao CY. Metrnl: A secreted protein with new emerging functions. *Acta Pharmacol Sin*. 2016;37(5). doi:10.1038/aps.2016.9
 56. Iwanicka J, Balcerzyk-Matić A, Iwanicki T, Mizia-Stec K, Bańska P, Filipiak A, Gawron K, Jarosz A, Nowak T, Krauze J, Niemiec P. The Association of ADAMTS7 Gene Polymorphisms with the Risk of Coronary Artery Disease Occurrence and Cardiovascular Survival in the Polish Population: A Case-Control and a Prospective Cohort Study. *Int J Mol Sci*. 2024;25(4). doi:10.3390/ijms25042274
 57. Pagnamenta AT, Kaiyrzhanov R, Zou Y, Da's SI, Maroofian R, Donkervoort S, Dominik N, Lauffer M, Ferla MP, Orioli A, et al. An ancestral 10-bp repeat expansion in VWA1 causes recessive hereditary motor neuropathy. *Brain*. 2021;144(2). doi:10.1093/brain/awaa420
 58. Konietzny A, Bär J, Mikhaylova M. Dendritic actin cytoskeleton: Structure, functions, and regulations. *Front Cell Neurosci*. 2017;11. doi:10.3389/fncel.2017.00147
 59. Uzor NE, Scheihing DM, Kim GS, Moruno-Manchon JF, Zhu L, Reynolds CR, Stephenson JM, Holmes A, McCullough LD, Tsvetkov AS. Aging lowers PEX5 levels in cortical neurons in male and female mouse brains. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2020;107. doi:10.1016/j.mcn.2020.103536
 60. Mohammadzadeh P, Amberg GC. AXL/Gas6 signaling mechanisms in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14. doi:10.3389/fendo.2023.1212104
 61. Kolobynina KG, Solovyova V V, Levay K, Rizvanov AA, Slepak VZ. Emerging roles of the single EF-hand Ca²⁺ sensor tescalcin in the regulation of gene expression, cell growth and differentiation. *J Cell Sci*. 2016;129(19). doi:10.1242/jcs.191486
 62. Wu LY, Song YJ, Zhang CL, Liu J. KV Channel-Interacting Proteins in the Neurological and Cardiovascular Systems: An Updated Review. *Cells*. 2023;12(14). doi:10.3390/cells12141894
 63. Gotliv IL. FXYD5: Na⁺/K⁺-ATPase regulator in health and disease. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4(MAR). doi:10.3389/fcell.2016.00026
 64. Shen J, Shi D, Suzuki T, Xia Z, Zhang H, Araki K, Wakana S, Takeda N, Yamamura KI, Jin S, Li Z. Severe ocular phenotypes in Rbp4-deficient mice in the C57BL/6 genetic background. *Laboratory Investigation*. 2016;96(6). doi:10.1038/labinvest.2016.39
 65. Reichmann F, Holzer P. Neuropeptide Y: A stressful review. *Neuropeptides*. 2016;55. doi:10.1016/j.nep.2015.09.008
 66. Rolando C, Erni A, Grison A, Beattie R, Engler A, Gokhale PJ, Milo M, Wegleiter T, Jessberger S, Taylor V. Multipotency of Adult Hippocampal NSCs In Vivo Is Restricted by Drosha/NFIB. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5). doi:10.1016/j.stem.2016.07.003
 67. Carvalho SDS, Moreau MM, Hien YE, Garcia M, Aubailly N, Henderson DJ, Studer V, Sans N, Thoumine O, Montcouquiol M. Vangl2 acts at the interface between actin and N-cadherin to modulate mammalian neuronal outgrowth. *Elife*. 2020;9. doi:10.7554/elife.51822
 68. Cukier HN, Duarte CL, Laverde-Paz MJ, Simon SA, Van Booven DJ, Miyares AT, Whitehead PL, Hamilton-Nelson KL, Adams LD, Carney RM, Cuccaro ML, Vance JM, Pericak-Vance MA, Griswold AJ, Dykxhoorn DM. An Alzheimer's disease risk variant in TTC3 modifies the actin cytoskeleton organization and the PI3K-Akt signaling pathway in iPSC-derived forebrain neurons. *Neurobiol Aging*. 2023;131. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2023.07.007
 69. Strang KH, Golde TE, Giasson BI. MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration. *Laboratory Investigation*. 2019;99(7). doi:10.1038/s41374-019-0197-x
 70. Sakabe I, Hu R, Jin L, Clarke R, Kasid UN. TMEM33: a new stress-inducible endoplasmic reticulum transmembrane protein and modulator of the unfolded protein response signaling. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;153(2). doi:10.1007/s10549-015-3536-7
 71. Łuczyńska K, Zhang Z, Pietras T, Zhang Y, Taniguchi H. NFE2L1/Nrf1 serves as a potential therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Redox Biol*. 2024;69. doi:10.1016/j.redox.2023.103003
 72. Santo EE, Paik J. FOXO in Neural Cells and Diseases of the Nervous System. In: *Current Topics in Developmental Biology*. Vol 127.; 2018. doi:10.1016/bs.ctdb.2017.10.002
 73. Zhang Z, Zhao Y. Progress on the roles of MEF2C in neuropsychiatric diseases. *Mol Brain*. 2022;15(1). doi:10.1186/s13041-021-00892-6
 74. Guo H, Bettella E, Marcogliese PC, Zhao R, Andrews JC, Nowakowski TJ, Gillentine MA, Hoekzema K, Wang T, Wu H, et al. Disruptive mutations in TANC2 define a neurodevelopmental syndrome associated with psychiatric disorders. *Nat Commun*. 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-12435-8
 75. Aabdién A, Sichlinger L, Borgel Z, Jones MR, Waston IA, Gatford NJF, Raval P, Tanangonan L, Powell TR, Duarte RRR, Srivastava DP. Schizophrenia risk proteins ZNF804A and NT5C2 interact in cortical neurons. *European Journal of Neuroscience*. 2024;59(8). doi:10.1111/ejn.16254
 76. Hussain NK, Hsin H, Huganir RL, Sheng M. MINK and TNIK differentially act on Rap2-mediated signal transduction to regulate neuronal structure and AMPA receptor function. *Journal of Neuroscience*. 2010;30(44). doi:10.1523/JNEUROSCI.4124-10.2010
 77. Baumgärtel K, Green A, Hornberger D, Lapira J, Rex C, Wheeler DG, Peters M. PDE4D regulates Spine Plasticity and Memory in the Retrosplenial Cortex. *Sci Rep*. 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-22193-0
 78. Kritis AA, Stamoula EG, Paniskaki KA, Vavilis TD. Researching glutamate — induced cytotoxicity in different cell lines: A comparative/collective analysis/study. *Front Cell Neurosci*. 2015;9. doi:10.3389/fncel.2015.00091
 79. Mahmoud S, Ghargozlou M, Simard C, Gris D. Astrocytes maintain glutamate homeostasis in the CNS by controlling the balance between glutamate uptake and release. *Cells*. 2019;8(2). doi:10.3390/cells8020184
 80. Proia P, Schiera G, Mineo M, Ingrassia AMR, Santoro G, Savettieri G, Di Liegro I. Astrocytes shed extracellular vesicles that contain fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor. *Int J Mol Med*. 2008;21(1). doi:10.3389/ijmm.21.1.63
 81. Taylor AR, Robinson MB, Gifondorwa DJ, Tytell M, Milligan CE. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: Role of signaling kinases. *Dev Neurobiol*. 2007;67(13). doi:10.1002/dneu.20559
 82. Montecchi T, Shaba E, De Tommaso D, Di Giuseppe F, Angelucci S, Bini L, Landi C, Baldari CT, Olivieri C. Differential proteomic analysis of astrocytes and astrocytes-derived extracellular vesicles from control and rai knockout mice: insights into the mechanisms of neuroprotection. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15). doi:10.3390/ijms22157933
 83. Patel MR, Weaver AM. Astrocyte-derived small extracellular vesicles promote synapse formation via fibulin-2-mediated TGF- β signaling. *Cell Rep*. 2021;34(10). doi:10.1016/j.celrep.2021.108829
 84. You Y, Borgmann K, Edara VV, Stacy S, Ghorpade A, Ikezu T. Activated human astrocyte-derived extracellular vesicles modulate neuronal uptake, differentiation and firing. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1). doi:10.1080/20013078.2019.1706801
 85. Krishnan A, Areti A, Komirishetty P, Chandrasekhar A, Cheng C, Zochodne DW. Survival of compromised adult sensory neurons involves macrovesicular formation. *Cell Death Discov*. 2022;8(1). doi:10.1038/s41420-022-01247-3
 86. Vaillant AR, Zanassi P, Walsh GS, Aumont A, Alonso A, Miller FD. Signaling mechanisms underlying reversible activity-dependent dendrite formation. *Neuron*. 2002;34(6). doi:10.1016/S0896-6273(02)00717-1

Ответственный за переписку: Шеденкова Маргарита Олеговна — младший научный сотрудник Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова, 115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1, E-mail: margarita.shedenkova@gmail.com

Шеденкова М.О. SPIN 3390-4201, ORCID 0000-0001-7415-1520

Гурьянова А.А. ORCID 0000-0002-6589-2164

Судынина А.К. SPIN 5225-7878ORCID 0000-0003-3531-7684

Гугучкин Е.П. ORCID 0000-0001-7885-9892

Карпулевич Е.А. SPIN 8064-2794, ORCID 0000-0002-6771-2163

Фатхудинов Т.Х. SPIN 7919-8430, ORCID 0000-0002-6498-5764

Гольдштейн Д.В. SPIN 7714-9099, ORCID 0000-0003-2438-1605

Салихова Д.И. SPIN 1436-5027, ORCID 0000-0001-7842-7635

Corresponding author: Shedenkova Margarita — Junior Researcher, Research Centre for Medical Genetics, 115522, Moscow, 1 Moskvorechye St, Russian Federation, E-mail: margarita.shedenkova@gmail.com

Shedenkova M.O. ORCID 0000-0001-7415-1520

Gurianova A.A. ORCID 0000-0002-6589-2164

Sudina A.K. ORCID 0000-0003-3531-7684

Guguchin E.P. ORCID 0000-0001-7885-9892

Karpulевич Е.А ORCID 0000-0002-6771-2163

Fatkhudinov T. Kh. ORCID 0000-0002-6498-5764

Goldstein D.V. ORCID 0000-0003-2438-1605

Salikhova D.I. ORCID 0000-0001-7842-7635