



Известия высших учебных заведений. Прикладная нелинейная динамика. 2021. Т. 29, № 3
Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedeniy. Applied Nonlinear Dynamics. 2021;29(3)

Short communication

DOI: 10.18500/0869-6632-2021-29-3-421-427

Network activity in primary hippocampal cultures upon HIF-prolyl hydroxylase inhibition

M. O. Savyuk¹✉, M. I. Krivonosov¹, M. V. Ivanchenko¹,
A. A. Poloznikov², E. V. Mitroshina¹, M. V. Vedunova¹

¹National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Russia

²Higher School of Economics — National Research University, Moscow, Russia

E-mail: ✉mary.savyuk@bk.ru, mike_live@mail.ru, ivanchenko.mv@gmail.com,
andrey.poloznikov@gmail.com, helenmitroshina@gmail.com, mvvedunova@yandex.ru

Received 13.11.2020, accepted 29.12.2020, published 31.05.2021

Abstract. Neural network functional activity study and estimation of activity changes in different pathological states (e.g. in hypoxia conditions) is an important scientific task. Hypoxia is one of key damaging factors of various brain pathologies such as stroke, traumatic brain injury, neurodegenerative disease etc. Hypoxia causes structural and functional destruction of neuron-glial networks. The protein calls hypoxia-inducible factor (HIF) is one of the main endogenous molecular regulators of the cell's response to hypoxia. It's functional activity is under the control of HIF-prolyl hydroxylase (protein of the prolyl hydroxylase domain, PHD). Recent studies have shown that we can influence HIF activity using PHD-inhibitors and thus increase the cells adaptability to hypoxia. The *aim* of this work was to determine the effect of PHD on network characteristics of the functional calcium activity in primary neuronal cultures in hypoxia model in vitro. *Methods.* We investigated Ca²⁺ signaling in hippocampal cultures using our recently developed method of processing calcium fluorescence imaging data. It includes signal decomposition into individual cells and network reconstruction of dynamical interactions. *Results.* Our data reveals that the blockade PHD by compound 4896-3212 (neuradapt) during hypoxia modeling preserves the connectivity of neuron-glial networks in the post-hypoxic period. *Conclusion.* Pharmacological inhibition of PHD which causes the accumulation of HIF, can be used as an effective approach for therapeutic correction of hypoxic damage.

Ключевые слова: HIF-prolyl hydroxylases, neuroprotection, primary hippocampal cultures, hypoxia modeling, network activity.

Acknowledgements. The research has been supported by Russian Foundation for Basic Research, grant № 18-015-00391 and the state projects "Provision of Scientific Research", № 0729-2020-0061.

For citation: Savyuk MO, Krivonosov MI, Ivanchenko MV, Poloznikov AA, Mitroshina EV, Vedunova MV. Network activity in primary hippocampal cultures upon HIF-prolyl hydroxylase inhibition. *Izvestiya VUZ. Applied Nonlinear Dynamics.* 2021;29(3):421–427. DOI: 10.18500/0869-6632-2021-29-3-421-427

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0).

Нейросетевая активность в первичных культурах гиппокампа при ингибировании HIF-пролилгидроксилазы

М. О. Савюк¹✉, М. И. Кривоносов¹, М. В. Иванченко¹,
А. А. Полозников², Е. В. Митрошина¹, М. В. Ведунова¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского, Россия

²Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

E-mail: ✉mary.savyuk@bk.ru, mike_live@mail.ru, ivanchenko.mv@gmail.com,
andrey.poloznikov@gmail.com, helenmitroshina@gmail.com, mvedunova@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.11.2020, принята к публикации 29.12.2020, опубликована 31.05.2021

Аннотация. Важной научной задачей является исследование нейросетевой функциональной активности и оценка реорганизации сети в различных патологических состояниях, например, при моделировании гипоксии. Гипоксия является одним из ключевых повреждающих факторов при различных патологиях головного мозга, таких как инсульт, черепно-мозговая травма, нейродегенеративные заболевания и т. д. Гипоксическое повреждение приводит к структурным и функциональным нарушениям нейрон-глиальных сетей. Белок, называемый фактором, индуцируемым гипоксией (HIF), является одним из основных эндогенных молекулярных регуляторов реакции клетки на гипоксию. Его функциональная активность находится под контролем HIF-пролилгидроксилазы (белка пролилгидроксилазного домена, PHD). Недавние исследования показали, что регулируя активность HIF с помощью ингибиторов фермента HIF-пролилгидроксидазы PHD возможно повышать адаптационные способности клеток при гипоксии. Целью данной работы было исследование влияния ингибитора PHD на сетевые характеристики функциональной кальциевой активности в первичных культурах клеток гиппокампа в модели гипоксии *in vitro*. Методы. Для анализа кальциевой активности в первичных культурах клеток гиппокампа был использован недавно разработанный нами метод обработки данных флуоресцентной визуализации кальция. Он включает в себя декомпозицию сигнала на отдельные клетки и реконструкцию сетевых динамических взаимодействий между клетками. Результаты. Наши данные показывают, что блокада фермента HIF-пролилгидроксилазы при моделировании гипоксии, сохраняет связность нейрон-глиальных сетей в постгипоксическом периоде. Выводы. Описаны параметры, характеризующие связность нейрон-глиальной сети в модели культуры клеток *in vitro* в нормальных условиях и при моделировании патологии. Фармакологическое ингибирование PHD, которое вызывает накопление HIF, может быть использовано в качестве эффективного подхода для терапевтической коррекции гипоксического повреждения.

Ключевые слова: HIF-пролилгидроксилаза, нейропротекция, первичные культуры гиппокампа, моделирование гипоксии, нейросетевая активность.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-015-00391) и Проекта государственного задания № 0729-2020-0061.

Для цитирования: Савюк М. О., Кривоносов М. И., Иванченко М. В., Полозников А. А., Митрошина Е. В., Ведунова М. В. Нейросетевая активность в первичных культурах гиппокампа при ингибировании HIF-пролилгидроксилазы // Известия вузов. ПНД. 2021. Т. 29, № 3. С. 421–427. DOI: 10.18500/0869-6632-2021-29-3-421-427

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0).

Introduction

Neural networks are the minimum functional unit that provides cognitive functions such as memory, thinking and emotional reactions. Hypoxia accompanying an ischemic stroke or trauma and causes serious brain injury. Even few minutes of oxygen deprivation can lead to degradation of neuronal processes, synapses and destroy neural network. The prolonged lack of oxygen causes the neuronal death [1]. An analysis of the functional reorganization of neural-glial networks is important for the development of effective methods for brain hypoxia protection. Hypoxia-inducible factors – group of transcription factors that respond to hypoxia, i.e. reduction of oxygen concentration in body tissues.

Савюк М. О., Кривоносов М. И., Иванченко М. В.,
Полозников А. А., Митрошина Е. В., Ведунова М. В.
Известия вузов. ПНД, 2021, т. 29, № 3

Hypoxia Induced Factor (HIF-1) is a key link in the molecular mechanism supporting the functioning of nerve cells during hypoxia. HIFs are heterodimers consisting of two protein subunits: HIF-1 α and HIF-1 β . In physiologic conditions, HIF-1 α is degraded by HIF-prolyl hydroxylase. The cofactor of PHD is oxygen. Therefore, under hypoxic conditions, HIF-1 α is not degraded, and HIF-1 complex interacts with Deoxyribonucleic Acid (DNA) and activates the expression of more 100 genes whose protein products help the cell survive [2]. So, it is assumed that pharmacological inhibition of PHD possibly have a neuroprotective effect and prevent the neural networks degradation. The aim of this work was to determine the neuroprotective effect of PHD inhibition and to analyse the effect of PHD on functional neural network activity in hypoxia model in vitro. Calcium ions play a key role in signaling between nerve cells and in the regulation of synaptic activity. We investigated Ca²⁺ signaling in hippocampal cultures using our recently developed method of processing calcium fluorescence images. It includes signal decomposition into individual cells and network reconstruction of dynamical interactions.

1. Materials and methods

The object of in vitro studies were primary hippocampal cell cultures obtained from 18 day old embryos of C57Bl/6 mice. All experimental procedures were approved by the Bioethics Committee of Lobachevsky University and carried out in accordance with Act 708n of the Russian Federation National Ministry of Public Health, which states the rules of laboratory practice for the care and use of laboratory animals, and Council Directive 2010/63 EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes.

1.1. Isolation of murine primary hippocampal cultures. Hippocampal cells were isolated from the mouse embryonic brain (18th day of gestation) and cultured on coverslips according to the previously developed protocol [3]. Isolation of hippocampi was performed in Ca²⁺- and Mg²⁺- free phosphate-buffered saline (PBS) with followed enzymatic digestion with 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Invitrogen, 25200-056) for 20 min. Dissociated cells were plated on coverslips. The initial cell density in the culture was 7000–9000 cells/mm². The primary hippocampal cultures were grown in Neurobasal medium (Invitrogen, 21103-049) supplemented with 2% B27 (Invitrogen, 17504-044), 0.5 mM L-glutamine (Invitrogen, 25030-024), and 0.4% fetal bovine serum (FBS; PanEco, K055, Russia). Cells were cultured under constant conditions of 35.5°C, 5% CO₂ and a humidified atmosphere in a Binder C150 incubator (ThermoFisher, Germany). A half-replenishment of the medium was done once in every two days.

1.2. Acute normobaric hypoxia model. Hypoxia modeling was performed on the 14th day of cultures development in vitro. A normoxic culture medium was replaced with a hypoxic medium for 10 minutes and then a normoxic culture medium was reversed. The oxygen was displaced from the medium with an inert gas (argon). The oxygen concentration in the culture medium was decreased from 3.26 ml/l (normoxia) to 0.37 ml/l (hypoxia) [4].

1.3. Pharmacological treatment. Compound 4896-3212 (neuradapt) was used to inhibit HIF prolyl hydroxylase. The PHD inhibitor was kindly provided by the BioClinicum Research Center (Moscow). The application of the inhibitor was carried out in two concentrations – 1 μ M and 15 μ M according to two experimental protocols. According to the first protocol, it is introduced into a hypoxic culture medium and into a normal medium immediately after modeling acute normobaric hypoxia. According to the second protocol, the application of the PHD inhibitor in the posthypoxic period was carried out 2 hours after modeling hypoxia and then daily for 7 days.

1.4. Calcium imaging. For imaging studies of functional calcium activity, reflecting the functional state of calcium cell homeostasis, a LSM 510 confocal laser scanning microscope (Zeiss, Germany) was used. The functional architecture of the neural network of the culture was visualized at the cellular level. The Oregon Green 488 BAPTA-1 (OGB-1) calcium sensor (0.4 μ M, Invitrogen, O-6807) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, D8418) with 4% pluronic F-127 (Invitrogen, P-3000 MP), introduced into the culture medium and incubated for 30 minutes at 37°C and 5% CO₂. For excitation, an argon laser with $\lambda = 488$ nm was used. Fluorescence radiation was recorded using a light filter with a passband of 500–530 nm. A time series of images was recorded to assess the dynamics of changes in the concentration of intracellular calcium. The recording frequency was 2 frames per second. Registration of calcium activity was carried out on the 7th day after hypoxia modeling [5].

1.5. Network characteristics of primary hippocampal cultures analysis. We investigated Ca²⁺ signaling in astrocytes using a new method of processing calcium fluorescence images. It includes signal decomposition into individual cells and network reconstruction of dynamical interactions [6, 7]. This algorithm represents the neuron-glia network as an oriented graph, the vertices of which correspond to separate cells, while the edges designate connections between them. We analyzed two key network parameters: mean correlation level of adjacent cells and the average propagation speed of delays between calcium signals.

2. Results

Previously we have shown that the PHD inhibitor applied within the 1 and 15 μ M immediately during hypoxia modeling as well as daily in posthypoxic period allows preservation the viability of primary hippocampal cells that indicates its neuroprotective effect. The main task in our present study was assessment of functional calcium activity of neuron-glia networks on day 7th of the posthypoxic period. It was shown that hypoxia significantly decreased all parameters that characterized the connectivity of calcium network activity. We shown that application of PHD inhibitor during hypoxia modeling and immediately after reoxygenation is maintained parameters of network connectivity. The average value of correlation between pairs of cells and signal delay rate are preserved at the level of the intact values (Mean correlation: 1 μ M neuradapt 0.131 ± 0.019 , 15 μ neuradapt 0.108 ± 0.004 ; signal delay between cells: 1 μ M neuradapt 10.75 ± 1.05 μ m/s, 15 μ neuradapt 10.06 ± 0.76 μ m/s). In the “Hypoxia” group, mean value of the correlation maximum on the shift between average calcium levels of cells pairs in time decrease to 0.096 ± 0.002 (the “Intact” group 0.161 ± 0.023) ($p < 0.05$, the Mann–Whitney test) (Fig. 1, a, b).

The speed of signal propagation between cells in posthypoxic period was reduced significantly (“Intact”: 12.19 ± 1.26 μ m/s, “Hypoxia”: 8.4 ± 0.28 μ m/s, $p < 0.05$, the Mann–Whitney test, Fig. 1, b). Therefore, there is dramatic decrease of coordinated network activity in primary hippocampal cultures after hypoxic influence. However, the network characteristics in the cultures with chronic application of PHD inhibitor in the post-hypoxic period did not differ significantly from the “Hypoxia” group. To determine the frequency characteristics of calcium events, we compute the power spectral density of cell calcium intensity. The occupied band is the range in frequency between the points where the integrated power crosses 7.5% and 92.5% of the total power in the spectrum. Finally, we estimate the average value of the lower frequency of the occupied band over all cells in the field of view. An increase in this measure indicates a relative decrease in the low-frequency contribution to the signal under hypoxic condition (Fig. 1, c). Thus, the analysis of network parameters functional calcium activity has confirmed that hypoxia leads to the destruction of network interactions between nerve cells. After oxygen deprivation some of synaptic contacts can be reduced or loss their functionally that leads to neuron-glia networks degradation, and falling their functions, such as memory and cognitive

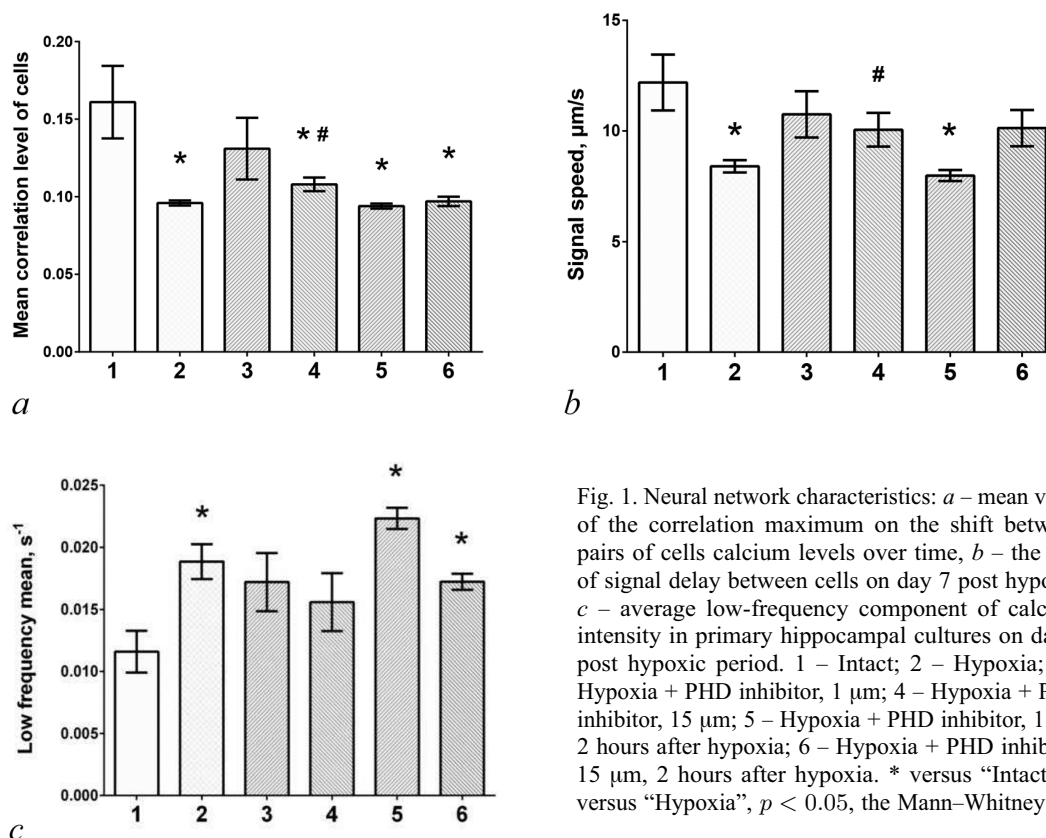


Fig. 1. Neural network characteristics: *a* – mean value of the correlation maximum on the shift between pairs of cells calcium levels over time, *b* – the rate of signal delay between cells on day 7 post hypoxic, *c* – average low-frequency component of calcium intensity in primary hippocampal cultures on day 7 post hypoxic period. 1 – Intact; 2 – Hypoxia; 3 – Hypoxia + PHD inhibitor, 1 μm ; 4 – Hypoxia + PHD inhibitor, 15 μm ; 5 – Hypoxia + PHD inhibitor, 1 μm , 2 hours after hypoxia; 6 – Hypoxia + PHD inhibitor, 15 μm , 2 hours after hypoxia. * versus “Intact”, # versus “Hypoxia”, $p < 0.05$, the Mann–Whitney test

abilities. Our results reveals that the use of PHD inhibitor No.4896-3212 in the hypoxia modeling but not in posthypoxic period preserved the network characteristics, in particular the mean of the correlation between cells, the signal transmission speed and the range of low-frequency calcium events in primary hippocampal cultures.

Conclusion

In this paper, we proposed a biologically-motivated network analysis in the case of known node locations on the two-dimensional plane. This property enables setting distances between nodes and assess spatiotemporal measures of the correlation networks. One of such measures is a speed at which correlated distant peaks commonly coincide. The persistence of the information propagation speed suggests evidence that pharmacological inhibition of PHD which causes the accumulation of HIF, can be used as an effective approach for therapeutic correction of hypoxic damage.

References

1. Dukoff DJ, Hogg DW, Hawrysh PJ, Buck LT. Scavenging ROS dramatically increase NMDA receptor whole-cell currents in painted turtle cortical neurons. *The Journal of Experimental Biology*. 2014;217(18):3346–3355. DOI: 10.1242/jeb.105825.
2. Cerychova R, Pavlinkova G. HIF-1, metabolism, and diabetes in the embryonic and adult heart. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9:460. DOI: 10.3389/fendo.2018.00460.
3. Vedunova M, Sakharnova T, Mitroshina E, Perminova M, Pimashkin A, Zakharov Y, Dityatev A, Mukhina I. Seizure-like activity in hyaluronidase-treated dissociated hippocampal cultures. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013;7:149. DOI: 10.3389/fncel.2013.00149.

4. Vedunova MV, Sakharnova TA, Mitroshina EV, Shishkina TV, Astrakhanova TA, Mukhina IV. Antihypoxic and neuroprotective properties of BDNF and GDNF in vitro and in vivo under hypoxic conditions. *Modern Technologies in Medicine*. 2014;6(4):38–45.
5. Vedunova MV, Mishchenko TA, Mitroshina EV, Mukhina IV. TrkB-mediated neuroprotective and antihypoxic properties of brain-derived neurotrophic factor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015;2015:453901. DOI: 10.1155/2015/453901.
6. Kustikova V, Krivonosov M, Pimashkin A, Denisov P, Zaikin A, Ivanchenko M, Meyerov I, Semyanov A. CalciumCV: Computer vision software for calcium signaling in astrocytes. *Analysis of Images, Social Networks and Texts. 7th International Conference, AIST 2018, July 5–7, Moscow, Russia*. Springer, Cham; 2018. P. 168–179. DOI: 10.1007/978-3-030-11027-7_17.
7. Mitroshina EV, Krivonosov MI, Burmistrov DE, Savyuk MO, Mishchenko TA, Ivanchenko MV, Vedunova MV. Signatures of the consolidated response of astrocytes to ischemic factors in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(21):7952. DOI: 10.3390/ijms21217952.



Савюк Мария Олеговна – родилась в Нижнем Новгороде (1999). Окончила Институт биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского по направлению «Биология» (2020). С 2020 года обучается в магистратуре Института биологии и биомедицины по направлению «Биология» и работает на кафедре общей и медицинской генетики ИББМ ННГУ в должности лаборанта. Научные интересы – нейробиология, физиология, кальциевый имиджинг.

Россия, 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23
 Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
 E-mail: mary.savyuk@bk.ru
 ORCID: 0000-0002-1333-470X



Кривonosов Михаил Игоревич – родился в Нижнем Новгороде (1995). Окончил с отличием Институт информационных технологий математики и механики Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского по направлению «Прикладная математика и информатика» (2018). С 2018 года обучается в аспирантуре института информационных технологий математики и механики по специальности «Математическое моделирование, численные методы и комплексы программ». С 2020 года работает на кафедре прикладной математики в должности ассистента. Научные интересы – нейробиология, сложные сети, анализ временных рядов, компьютерные науки.

Россия, 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23
 Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
 E-mail: mike_live@mail.ru
 ORCID: 0000-0002-1169-5149



Иванченко Михаил Васильевич – родился в городе Горьком (1981). Окончил с отличием радиофизический факультет ННГУ по направлению «Радиофизика» (2004). Защитил диссертацию на соискание учёной степени доктора физико-математических наук на тему «Делокализация и конкуренция: коллективная динамика осцилляторных ансамблей с нелинейной связью и беспорядком» по специальности «Радиофизика» (2011, Нижний Новгород). С 2020 года работает на кафедре прикладной математики ИИТММ ННГУ в должности заведующего кафедрой. Научные интересы – нейробиология, компьютерные науки, сложные сети, анализ временных рядов.

Россия, 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23
 Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
 E-mail: ivanchenko.mv@gmail.com
 ORCID: 0000-0002-1903-7423

*Савюк М. О., Кривonosов М. И., Иванченко М. В.,
 Полозников А. А., Митрошина Е. В., Ведунова М. В.*
 Известия вузов. ПНД, 2021, т. 29, № 3



Полозников Андрей Александрович – родился в Москве (1983). Окончил Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова по специальности «Химия» (2005). Защитил диссертацию на соискание учёной степени кандидата химических наук на тему «Рекомбинантная пероксидаза табака: получение и каталитические свойства мутантных форм фермента» по специальности «Кинетика и катализ» (2008, Москва). С 2020 года работает в Международной лаборатории микрофизиологических систем факультета биологии и биотехнологии НИУ ВШЭ в должности ведущего научного сотрудника. Научные интересы – биохимия, онкология, энзимология, аналитическая химия.

Россия, 101000 Москва, ул. Мясницкая, 20
Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»
E-mail: andrey.poloznikov@gmail.com
ORCID: 0000-0003-1816-8699



Митрошина Елена Владимировна – родилась в городе Горьком (1983). Окончила с отличием биологический факультет Нижегородского государственного университета по специальности «Биология» (2005). Защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему «Антигипоксическое и нейропротекторное действие N-арахидоноилдофамина при моделировании острой гипоксии in vivo и in vitro» по специальностям «Физиология» и «Клеточная биология, цитология, гистология» (2015, Москва). С 2016 года работает на кафедре нейротехнологий ИББМ ННГУ в должности доцента. Научные интересы – нейробиология, физиология, нейрон-глиальные сети, кальциевый имиджинг.

Россия, 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23
Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
E-mail: helenmitroshina@gmail.com
ORCID: 0000-0003-1703-2618



Ведунова Мария Валерьевна – родилась в городе Горьком (1983). Окончила с отличием биологический факультет Нижегородского государственного университета по специальности «Биология» (2005). Защитила диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических наук на тему «Молекулярные механизмы функционирования нейронных сетей in vitro в процессе развития при воздействии стресс факторов» по специальности «Физиология» (2015, Пушкино). С 2016 года работает в ИББМ ННГУ в должности директора. Научные интересы – нейробиология, физиология, онкология, нейрон-глиальные сети, кальциевый имиджинг.

Россия, 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23
Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
E-mail: mvedunova@yandex.ru
ORCID: 0000-0001-9759-6477