

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ  
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
Отделение физиологических наук РАН  
Отделение биологических наук РАН  
Физиологическое общество им. И.П. Павлова  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской академии наук  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт Высшей нервной Деятельности и Нейрофизиологии Российской академии наук  
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого**

**ПЕРВАЯ ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ И ШКОЛА С  
МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «ОПТОГЕНЕТИКА И  
ОПТОФАРМАКОЛОГИЯ»**

**THE FIRST RUSSIAN CONFERENCE & WORKSHOP  
"OPTOGENETICS AND OPTOPHARMACOLOGY"**

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ**

*11-15 апреля 2018 года*

**Санкт-Петербург  
2018**

Первая Всероссийская конференция и Школа с международным участием «Оптогенетика и оптофармакология», Санкт-Петербург, 11-15 апреля 2018 г.: Сборник научных трудов / Под общ. ред. д.б.н. М. Л. Фирсова. – СПб: ВВМ, 2018. –127 с.

ISBN 978-5-9651-1134-3

В сборнике научных трудов публикуются исследовательские материалы сотрудников Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института Высшей нервной Деятельности и Нейрофизиологии Российской академии наук, Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого и др., представивших свои научные результаты в форме докладов и лекций на Первой Всероссийской конференции и Школе с международным участием «Оптогенетика и оптофармакология».

Данный сборник представляет интерес для специалистов различных областей знаний, аспирантов, студентов ВУЗов.

Материалы публикуются в авторской редакции

Редакционная коллегия: д.б.н. **М.Л. Фирсов**, чл.-корр. РАН **П.М. Балабан**, д.б.н. **С.М. Антонов**, д.б.н. **И.В. Романова**, к.б.н. **Е.И. Гальперина**, **О.В. Кручинина**, **С.Л. Малкин**, **И.В. Смоленский**.

Рецензенты: *акад. РАН* **Е. Е. Никольский**, д.б.н. **А. Б. Вольнова**.

Конференция и Школа проводятся при финансовой поддержке: Федерального агентства научных организаций, Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 18-15-20003), IBRO-PERC Workshops, Conferences and Meetings Support, European Society for Neurochemistry.

Без объявления.

©Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова Российской академии наук  
(ИЭФБ РАН), 2018 г.

ОРГКОМИТЕТ ПЕРВОЙ ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ И ШКОЛЫ С  
МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «ОПТОГЕНЕТИКА И ОПТОФАРМАКОЛОГИЯ»:

**Организационный комитет:** д.б.н. **М.Л. Фирсов** (Сопредседатель), чл.-корр. РАН **П.М. Балабан** (Сопредседатель), акад. РАН **М.А. Островский**, акад. РАН **М.П. Кирпичников**, чл.-корр. РАН **А.В. Семьянов**, чл.-корр. РАН **К.В. Анохин**, чл.-корр. РАН **Н.Н. Дыгало**, чл.-корр. РАН **Д.Б. Тихонов**, д.б.н. **И.Б. Безпрозванный**, проф. **П.Д. Брежестовский**, д.ф.-м.н. **О.Л. Власова**, проф. **Р.Р. Гайнетдинов**, д.ф.-м.н. **А.М. Желтиков**, д.б.н. **А.В. Зайцев**, д.б.н. **С.М. Антонов**, д.б.н. **И.В. Романова**, д.б.н. **А.Ю. Малышев**.

**Программный комитет:** чл.-корр. РАН **П.М. Балабан** (Председатель), д.б.н. **А.В. Зайцев** (Заместитель председателя), д.б.н. **М.Л. Фирсов**, чл.-корр. РАН **А.В. Семьянов**, д.б.н. **А.Ю. Малышев**, д.б.н. **Д.А. Долгих**, д.ф.-м.н. **О.Л. Власова**, д.б.н. **С.М. Антонов**, д.б.н. **И.В. Романова**.

## Содержание

<b>I</b>	<b>Оптогенетика и оптофармакология</b>	<b>8</b>
1	Fedotov I.V., Kelmanson I.V., Martynov G.N., Blakley S.M., Sidorov-Biryukov D.A., Fedotov A.B., Kilin S.Ya., Hemmer P., Belousov V.V., Zheltikov A.M. Fiber-optic thermometry in awake animal models	8
2	Fedotov I.V., Pochechuev M.S., Ivashkina O.I., Roshchina M.A., Sidorov-Biryukov D.A., Fedotov A.B., Anokhin K.V., Zheltikov A.M. Reconnectable fiberscopes for chronic <i>in vivo</i> deep-brain imaging	12
3	Mikhailova M.A., Gainetdinov R.R., Budygin E.A. Optogenetically-induced tonic dopamine release from VTA-nucleus accumbens projections inhibits reward consummatory behaviors	15
4	Nalivaeva N.N., Turner A.J. European and international societies for neurochemistry and their role in promoting new developments in neuroscience	16
5	Rotov A.Yu., Sitnikova V.S., Ryazantsev M.N., Firsov M.L. & Astakhova L.A. Screening of novel optopharmacological compounds: convenient experimental models of photoreceptor degeneration	17
6	Брежестовский П.Д. Анализ функций нервной системы с помощью света	20
7	Брежестовский П.Д. Фотоуправляемая модуляция активности тормозных рецепторов нервных клеток	22
8	Власова О.Л., Артамонов Д.Н., Ерофеев А.И., Безprozванный И.Б. Применение оптогенетических подходов к исследованию электрофизиологических особенностей нейронов у мышей-моделей нейродегенеративных заболеваний	23
9	Груздева А.М., Ивашкина О.И., Субач Ф.В., Анохин К.В. Оптический имиджинг нейронов мозга, участвовавших в получении нового опыта: новые <i>in vivo</i> и <i>ex vivo</i> применения генетически кодируемых кальциевых сенсоров	26
10	Дыгало Н.Н., Калинина Т.С., Дрозд У.С., Сухарева Е.В., Булыгина В.В., Коншу Д.А., Шишкина Г.Т., Ланшаков Д.А. Особенности поведенческого и нейрохимического ответов на оптогенетическую и фармакологическую модуляцию активности глутаматергической нейротрансмиссии	29
11	Ерофеев А.И., Безprozванный И.Б., Власова О.Л. Режимы световой стимуляции нейронов в культуре	31
12	Малышев А.Ю. Субклеточное таргетирование опсинов в оптогенетике	33

13	Матвеев М.В., Власова О.Л., Безпрозванный И.Б. Нейроимплантат с адаптивной обратной связью для проведения оптогенетических исследований	36
14	Низамиева А.А. Исследование эффективности модельного биопейсмекера, полученного имплантацией светочувствительных клеток HL-1 в первичную культуру неонатальных кардиомиоцитов	38
15	Петровская Л.Е., Некрасова О.В., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Микробные родопсины и оптогенетика	39
16	Писклова М.В., Ивашкина О.И., Анохин К.В. Влияние оптогенетической стимуляции Thy-положительных нейронов области CA1 гиппокампа на нейрональную экспрессию ранних генов и поведение мышей	41
17	Рязанцев М.Н. Использование методов вычислительной химии и спектроскопии для оптогенетических и оптофармакологических применений	46
18	Смирнова Г.Р., Колотова Д.Е., Роцин М.В., Винарская А.Х., Балабан П.М., Малышев А.Ю. Использование заякоривающих мотивов для обеспечения центральной или периферической локализации опсинов в целях оптогенетического протезирования сетчатки	48
19	Смирнова Е.Ю., Ерофеев А.И., Власова О.Л., Чижов А.В., Зайцев А.В. Система биологической обратной связи в оптогенетическом эксперименте	52
20	Смирнова Е.Ю., Зайцев А.В. Применение оптогенетических методов для подавления эпилептической активности (обзор)	55
21	Цыцарев В.Ю. Визуализация активности головного мозга и оптогенетика: новые перспективы исследования нейронных сетей	59
22	Чижов А.В. Математическая модель как элемент протезирования зрения посредством оптогенетической стимуляции зрительной коры	61
23	Штыров А.А. Дизайн фотохромных блокаторов ионных каналов с коротким временем термической релаксации из цис-формы в транс-форму	63
<b>II</b>	<b>Имиджинг биологических объектов</b>	<b>64</b>
1	Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Дубровская Н.М., Алексеева О.С., Журавин И.А. Пренатальная гипоксия приводит к усилению выработки белка транстиретин в сосудистом сплетении крыс в первый месяц постнатального онтогенеза	64

- 2 **Жиляков Н.В., Хазиев Э.Ф., Маломуж А.И., Бухараева Э.А., Никольский Е.Е., Самигуллин Д.В.**  
Оценка влияния холиномиметиков и гамма-аминомасляной кислоты на уровень кальция в двигательных нервных окончаниях мышцы 66
- 3 **Журавин И.А., Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Дубровская Н.М., Наливаева Н.Н.**  
Использование конфокальной микроскопии для исследования распространения полилизинных дендримеров 3-й и 5-й генерации в головном мозге крыс 69
- 4 **Закирьянова Г.Ф., Гильмутдинов А.И., Ценцевичский А.Н., Зефилов А.Л., Петров А.М.**  
Хлорный транспорт в пресинаптических нервных окончаниях аксонов мотонейронов: связь с эффектом олесоксима на экзоцитоз 71
- 5 **Зачепило Т.Г., Лопатина Н.Г.**  
Распределение субъединиц GluR1 и GluR2 AMPA-подобных рецепторов в мозге медоносной пчелы 73
- 6 **Зыкин П.А., Ткаченко Л.А., Насыров Р.А., Краснощекова Е.И.**  
Исследование периацетабулярной коры мозга человека с помощью слой-специфичных нейрональных маркерных белков 74
- 7 **Иванова М.А., Ситникова Л.С., Карелина Т.В., Сибаров Д.А., Абушик П.А., Антонов С.М.**  
Исследование нейропротекции форсколина в нейронах первичной культуры мозжечка крыс с использованием конфокальной сканирующей микроскопии 77
- 8 **Кошеверова В.В., Литвинов И.К., Харченко М.В., Каменцева Р.С., Корнилова Е.С.**  
Влияние детергентов на флуоресцентные свойства квантовых точек в эндосомах 79
- 9 **Краснощекова Е.И., Зыкин П.А., Ткаченко Л.А., Насыров Р.А.**  
Особенности развития мозолистого тела мозга детей по данным МРТ 82
- 10 **Крылов Б.В., Пеннийнен В.А., Плахова В.Б.**  
Исследование молекулярных механизмов модуляции ноцицептивных сигналов: применение методов локальной фиксации потенциала, конфокальной и атомно-силовой микроскопии 86
- 11 **Кубасов И.В., Бобков Д.Е.**  
Оптические и электрические ответы кардиомиоцитов в изолированном сердце крысы при развитии гипоксии 88
- 12 **Литвинов И.К., Беляева Т.Н., Баженова А.С., Леонтьева Е.А., Орлова А.О., Корнилова Е.С.**  
Имиджинг клеток в культуре: изучение изменений фотофизических характеристик люминесцирующих полупроводниковых квантовых точек различной структуры 91
- 13 **Михайлова Е.В., Романова И.В., Деркач К.В., Бондарева В.М., Шпаков А.О.**  
Содержание серотониновых и дофаминовых рецепторов на гипоталамических

проопиомеланокортин-иммунопозитивных нейронах мышей с диета-индуцированным и меланокортиновым ожирением	95
14 Морина И.Ю., Романова И.В. Иммуногистохимическое исследование влияния дофамина на орексинергические нейроны перифорникальной области гипоталамуса крысы	96
15 Плаксина Д.В., Екимова И.В. Конфокальная микроскопия альфа-синуклеиновой патологии в дофаминергических структурах головного мозга в модели доклинической стадии болезни паркинсона у крыс среднего возраста	97
16 Пруцкова Н.П., Селивёрстова Е.В. Способы количественной оценки реабсорбции белка на фиксированных препаратах почки	103
17 Романова И.В., Морина И.Ю., Деркач К.В., Михрина А.Л., Сухов И.Б., Кузнецова Л.А., Шпаков А.О. Изменение соотношения орексигенных и анорексигенных факторов в гипоталамусе крыс с ожирением, вызванным кафетерий-диетой	106
18 Самигуллин Д.В., Хазиев Э.Ф., Жилияков Н.В., Бухараева Э.А., Никольский Е.Е. Имиджинг кальциевого метаболизма в периферических двигательных нервных окончаниях	107
19 Сибаров Д.А., Степаненко Ю.Д., Карелина Т.В., Иванова М. А., Ситникова Л. С., Антонов С.М. Особенности развития клеток Пуркинье в первичной культуре нейронов	111
20 Смирнова Т.А. Мультифотонная микроскопия Nikon для визуализации <i>in vivo</i> и оптогенетики	113
21 Шуваев А.Н., Белозор О.С., Якимова Я.С., Каспаров С. Вклад глии Бергмана в патогенез нейродегенеративных заболеваний на примере модели селективного астроглиоза мозжечка	115
22 Ярмиев И.З., Яковлева О.В. Сравнение процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в нервном окончании мышцы в аллоксановой и стрептозоциновой моделях сахарного диабета	122
Авторский указатель	125

# ОПТОГЕНЕТИКА И ОПТОФАРМАКОЛОГИЯ

## FIBER-OPTIC THERMOMETRY IN AWAKE ANIMAL MODELS

**Fedotov I.V.<sup>1,3,4,5</sup>, Kelmanson I.V.<sup>6</sup>, Martynov G.N.<sup>1</sup>, Blakley S.M.<sup>3</sup>, Sidorov-Biryukov D.A.<sup>1,2,4,5</sup>, Fedotov A.B.<sup>1,2,4,5</sup>, Kilin S.Ya.<sup>6</sup>, Hemmer P.<sup>3</sup>, Belousov V.V.<sup>7</sup>, Zheltikov A.M.<sup>1,2,3,4,5</sup>**

<sup>1</sup>*Physics Department, International Laser Center, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia,*

<sup>2</sup>*Kurchatov Institute National Research Center, Moscow, Russia,*

<sup>3</sup>*Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station, Texas,*

<sup>4</sup>*Russian Quantum Center, Skolkovo, Russia,*

<sup>5</sup>*Kazan Quantum Center, A.N. Tupolev Kazan National Research Technical University, Kazan, Russia,*

<sup>6</sup>*B.I. Stepanov Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,*

<sup>7</sup>*M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*E-mail: fedotovilyaeg@mail.ru*

We demonstrate in-vivo brain temperature measurement with ultra compact fiber-optic probe which couples nitrogenvacancy (NV) centers in diamond to a high-numericalaperture photonic-crystal fiber integrated with a two-wire microwave transmission line.

Temperature is a fundamental objective measurable whereby the universal physical principles, including the laws of thermodynamics, enter into biology, controlling every biological process within a living organism and within each living cell [1]. In the nervous system, thermosensitive ion channels in cell membranes—transient receptor potential (TRP) cation channels [2]—serve as elementary heat-controlled actuators, which convert incoming energy into action potentials, thus enabling the sensation of warm, cold, and hot [3-6]. In a more detailed picture of temperature effects in neuronal circuits, conduction of action potentials, presynaptic transmitter release, and postsynaptic reception are all highly sensitive to temperature, varying neuronal functions dramatically in response to temperature changes [7].

Living cells actively react to environmental changes in temperature and are likely to change their internal temperature during such processes as division, gene expression, enzyme reaction, and metabolism [8-9]. It is known that significant changes in brain temperature are associated with physiological and behavioral activity [10]. Recent experiments have shown that changes in the temperature of the mouse's cerebral cortex significantly and specifically affect brain activity. In particular, local cooling of the somatosensory cortex up to 29-30 C reversibly suppresses slow-wave thalamocortical activity and activates the cortex, while local heating up to 39-40C exerts a reverse influence [11]. Thus, by changing the temperature of the cortex, even without the use of thermogenetic tools, one can influence such an important parameter as the wakefulness level of the animal [12].

To face all this challenges highly accurate and extremely delicate instruments are needed for local temperature measurements. Within the past few years, several promising approaches have been demonstrated to enable single-cell and intracellular thermometry using appropriate thermosensitive fluorophores [13], fluorescent proteins [14], gold nanoclusters [15], quantum dots, diamond [16], silica



[17], and polymer [18] nanoparticles. However, to be compatible with the research aimed at understanding the most complex functions of the higher nervous system, including learning and memory, single-neuron thermometry has to be implemented in a format that would enable efficient minimally invasive neurostimulation in freely behaving animal models.

This challenge can be confronted by coupling small-size temperature-sensing agents to a specifically designed fiber-optic probe. Here we demonstrate a fiber-optic quantum thermometry based on an optically detected magnetic resonance (ODMR) in fiber-coupled nitrogen-vacancy (NV) centers [17,20]. Quantum sensing with nitrogen-vacancy centers in diamonds requires coupling of optical and microwave radiation with the diamond sensor. In our previous work [19] optical fiber have been integrated by hands with 50 mkm copper wire, which formed a two-wire microwave transmission line. Here we show a compact and flexible measuring probe by fabricating a microwave transmission line and a loop antenna directly on an optical fiber. We considered two types of transmission lines suitable for integration, such as a two-wire transmission line and a coaxial waveguide(Fig.1). A two-wire transmission line and a loop antenna were fabricated by applying a 5  $\mu\text{m}$  copper coating onto a fiber surface by means of magnetron sputtering and further etching of a conductor pattern by means of lithography technique. A probe manufactured by this technology is reproducible. It is only 10  $\mu\text{m}$  thicker than an uncoated fiber, and can be of the order of one meter length for convenient measurements in living freely moving animals.

To demonstrate the performance of the developed probe, experiments were conducted to measure the temperature in the brains of mice in response to the injection of anesthesia (Fig. 2) and to the external temperature (Fig.3). The probe was placed in the brain to a depth of 1 mm through the hole in the skull. In the first case, after the first 30 minutes of measurement, during which the temperature was at 37.5 ° C, a mixture of chloral hydrate and xylazine was introduced into the animal. After 43 minutes from the beginning of the measurements, the temperature of the brain reduced to 34C (Fig. 2). After 120 minutes after the measurements the effect of anesthesia ceased, the muscle tone of the mouse was restored. At the same time, the temperature of the tissue increased to 39.5 ° C.

In the second series of experiments, the mouse fixed under a microscope with a metal plate using a standard protocol. In accordance with recommendations, the temperature of the plate on which the mouse lies kept at 38 ° C. It was separately controlled that the body temperature of the experimental animal is 38 ° C throughout the experiment. The effect of plate temperature on the temperature of the brain was investigated by our compact fiber probe. For this purpose, the plate temperature was subsequently varied in the range 25-40 ° C by applying a current to the resistors pressed to the plate. The results are shown in Fig. 3 (b). It can be seen that the temperature of the surface of the brain drops to 35 ° C at room temperature. To maintain the temperature of the brain at a normal 38 ° C, it is necessary to warm the mount.

## References

- 1) A. R. Cossins, Temperature Biology of Animals (Chapman and Hall, 1987).
- 2) I. S. Ramsey, M. Delling, and D. E. Clapham, Annu. Rev. Physiol. 68, 619 (2006).
- 3) E. O. Gracheva, et al, Nature 476, 88 (2011).
- 4) J. Vriens, B. Nilius, and T. Voets, Nat. Rev. Neurosci. 15, 573 (2014).
- 5) D. D. McKemy, W. M. Neuhausser, and D. Julius, Nature 416, 52 (2002).
- 6) Y. Karashima, , et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 1273 (2009).
- 7) J. C. Montgomery and J. A. Macdonald, Am. J. Physiol. 259, R191 (1990).

- 8) Clark, D. G.; Brinkman, M.; Neville, S. D. *Biochem. J.* 235, 2 (1986).
- 9) Lowell, B. B.; Spiegelman, B. M. *Nature* 404, 652 (2000).
- 10) E. A. Kiyatkin, *Brain Res. Rev.* 50, 27–56 (2005).
- 11) M. Sheroziya, and I. Timofeev, *The Journal of neuroscience* 35, 13006-13019 (2015).
- 12) M. Schwalm, and C. Easton, *eNeuro* 3 (2016).
- 13) Y. Takei, , et al, *ACS Nano* 8, 198 (2013).
- 14) S. Kiyonaka, , et al, *Angewandte Chem. Int. Ed.* 52, 11154 (2013).
- 15) J.-M. Yang, H. Yang, and L. Lin, *ACS Nano* 5, 5067 (2011).
- 16) G. Kucsko, , et al, *Nature* 500, 54 (2013).
- 17) L. Yang, H.-S. , et al, *Microchimica Acta* 181, 743 (2014).
- 18) K. Okabe, , et al, *Nat. Commun.* 3, 705 (2012).
- 19) I. V. Fedotov, , et al, *Appl. Phys. Lett.* 105, 261109 (2014).

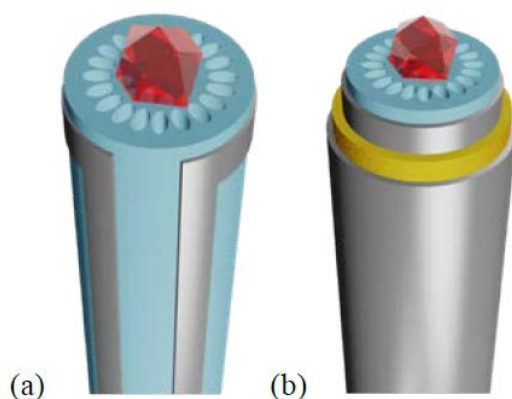


Figure 1. A fiber probe integrating an NV-diamond quantum sensor, an optical fiber, and a microwave transmission line (a) or coaxial waveguide (b).

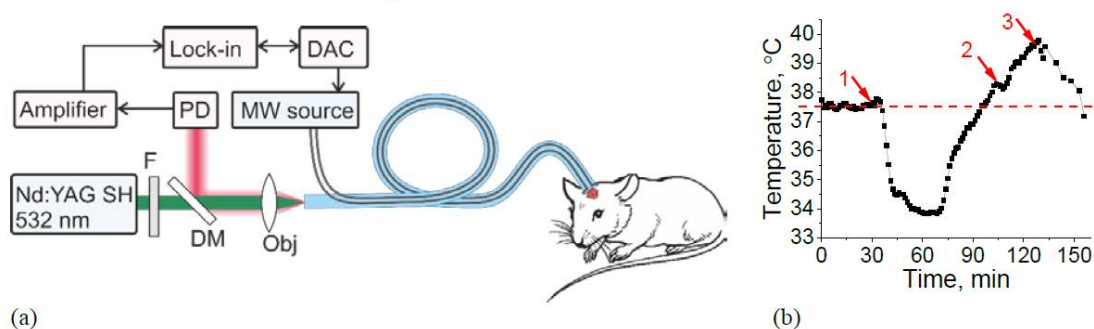


Figure 2. (a) Diagram of the experimental setup: PD, photodetector; DAC, digital-to-analog converter; PC, computer (b) temperature of the brain measured as a function of time in response to the injection of anesthesia.

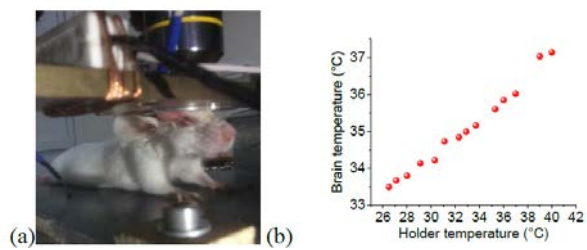


Figure 3. (a) Photo of head restricted mouse (b) temperature of the mouse brain as a function of holder temperature.

## RECONNECTABLE FIBERSCOPES FOR CHRONIC *IN VIVO* DEEP-BRAIN IMAGING

**Fedotov I.V.<sup>1,3,4,5</sup>, Pochechuev M.S.<sup>1,2</sup>, Ivashkina O.I.<sup>2,4</sup>, Roshchina M.A.<sup>2,4</sup>, Sidorov-Biryukov D.A.<sup>1,2,4,5</sup>, Fedotov A.B.<sup>1,2,4,5</sup>, Anokhin K.V.<sup>2,4,6</sup>, Zheltikov A.M.<sup>1,2,3,4,5</sup>**

<sup>1</sup>*Physics Department, International Laser Center, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia,*

<sup>2</sup>*Kurchatov Institute National Research Center, Moscow, Russia,*

<sup>3</sup>*Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station, Texas,*

<sup>4</sup>*Russian Quantum Center, Skolkovo, Russia,*

<sup>5</sup>*Kazan Quantum Center, A.N. Tupolev Kazan National Research Technical University, Kazan, Russia,*

<sup>6</sup>*P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia*

*E-mail: fedotovilyaeg@mail.ru*

Reconnectable bundles consisting of thousands of optical fibers are shown to enable high-quality image transmission, offering a platform for the creation of implantable fiberscopes for minimally invasive *in vivo* brain imaging. Experiments on various lines of transgenic mice verify the performance of this fiberscope as a powerful tool for chronic *in vivo* neuroimaging using genetically encoded calcium indicators, neuronal activity markers as well as brain-specific protein drivers in deep regions of live brain.

Imaging through bundles of optical fibers is one of the earliest inventions in the modern age of optical science [1]. This pioneering concept of imaging had to wait, however, for several decades before fiber fabrication technologies and low-loss fiber materials became mature enough to support the creation of practical fiber imaging systems, providing powerful imaging tools for biophotonics [2, 3]. Bundles of optical fibers have been shown to enable imaging of neural structures in living animals, multicolor *in vivo* fluorescence and Raman brain imaging, as well as molecular neuroimaging of postinjury neural plasticity. In combination with metal electrodes, bundles of optical fibers have been employed to demonstrate *in vivo* control of neural activity by means of photostimulation of light-sensitive protein channels in transgenic mice [4]. When integrated with a spatial light modulation technique, optical fiber bundles provide a tool for a spatially selective photoactivation and functional fluorescence imaging in freely behaving mice [5].

In a widely used fiber-optic interface for optogenetic work [6], an optical fiber is inserted into a living brain through a guiding cannula right before the experiment. Such a fiber-optic interface has been a crucial milestone for the establishment of optogenetics as a method for the control of deep-brain neuron circuits and behavioral studies. However, as the optical methods in brain research are advancing toward challenging goals of understanding the cell biology behind learning and memory, fiber-optic interfaces have to be adapted to the needs of long-term neuroimaging on deep-brain neuron circuits.

In this work, we demonstrate reconnectable bundles consisting of thousands of optical fibers, which enable, as our experiments show, high-quality image transmission, offering a platform for the creation of implantable fiberscopes for minimally invasive *in vivo* brain imaging. The concept of reconnectable fiberscopes demonstrated in this work extends the idea of reconnectable implantable single-fiber optical neurointerfaces [7-10] to the fiber-bundle imaging technology. Experiments on various lines of transgenic mice presented below in this paper verify the performance of this fiberscope as a powerful tool for chronic *in vivo* neuroimaging using genetically encoded calcium indicators, neuronal activity markers as well as axon growth regulators and brain-specific protein drivers in deep regions of awake brain.

A reliable and robust reconnection of 2 segments of a fiber bundle that have once been disconnected is challenging both physically and technically (Fig.1). One of the problems is appearance of moiré-pattern artifacts when the light is transmitted through 2 fiber-bundle segments with an identical regular-lattice arrangement of individual fibers in each of the segments. In our experiments, randomized fiber bundles are used. When 2 segments of such a fiber bundle are rotated with respect to each other upon reconnection by an angle  $\phi$ , the short-range order of individual fibers in the fiber bundle gives rise to a noticeable nonuniformity in the spatial distribution of transmitted light. To characterize 2 connected fiber-bundles as an optical system, image contrast of objects with different spatial frequencies (grids) must be compared (Fig.2). Calculations show that object contrast decreases with increasing fiber to object distance due to diffraction-induced beam divergence. This leads to resolution deterioration, similar to unfocusing in conventional microscopy.

Beam divergence, however, can be used to reduce transmitted light intensity variations without significant resolution deterioration. It is achieved, when beams diverge enough so they optimally fill a plane without significant overlap. When an object is placed in this plane, resolution is not deteriorated, while high spatial frequencies that can lead to aliasing artifacts, are smoothed out. The same principle can be used to increase image quality by placing the second fiber bundle at the specific distance from the first one. Optimal distance is defined not only by the beam divergence angle but also by angular acceptance efficiency of the cores of the second fiber. Dependence of core-to-core coupling efficiency on the distance between them and relative shift was measured experimentally and used in the numerical model. Our calculations show that if approximately a 10  $\mu\text{m}$ -thick spacer is placed between fiber bundles the variance of core-to-core coupling can be reduced by a factor of 2 with contrast reduction of only 20% (Fig.3). These findings will be used in future work to increase image quality in fiber-bundle neuroimaging.

### References

- 1) C.W. Hansell, Picture transmission, US Patent 1,751,584, filed 13 August 1927, issued 25 March 1930.
- 2) B. A. Flusberg, E. D. Cocker, W. Piyawattanametha, J. C. Jung, E. L. Cheung, M. J. Schnitzer, *Nat. Methods* 2005, 2, 941.
- 3) D. Yelin, I. Rizvi, W. M. White, J. T. Motz, T. Hasan, B. E. Bouma, G. J. Tearney, *Nature* 2006, 443, 765.
- 4) Y. Hayashi, Y. Tagawa, S. Yawata, S. Nakanishi, K. Funabiki, *Eur. J. Neurosci.* 2012, 36, 6.
- 5) V. Szabo, C. Ventalon, V. De Sars, J. Bradley, V. Emiliani, *Neuron* 2014, 84, 1157.
- 6) A. M. Aravanis, L.-P. Wang, F. Zhang, L. A. Meltzer, M. Z. Mogri, M. B. Schneider, K. Deisseroth, *J. Neural Eng.* 2007, 4, S143.
- 7) D. R. Sparta, A. M. Stamatakis, J. L. Phillips, N. Hovelsø, R. van Zessen, G. D. Stuber, *Nat. Protoc.* 2012, 7, 12.
- 8) G. D. Stuber, D. R. Sparta, A. M. Stamatakis, W. A. van Leeuwen, J. E. Hardjopajinto, S. Cho, K. M. Tye, K. A. Kempadoo, F. Zhang, K. Deisseroth, A. Bonci, *Nature* 2011, 475, 377.
- 9) L. V. Doronina-Amitonova, I. V. Fedotov, O. I. Ivashkina, M. A. Zots, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, A. M. Zheltikov, *Sci. Rep.* 2013, 3, 3265.
- 10) I. V. Fedotov, O. I. Ivashkina, M. S. Pochechuev, M. A. Roshchina, K. A. Toropova, A. B. Fedotov, K. V. Anokhin, A. M. Zheltikov, *J. Biophotonics* 2017, 10, 1485.

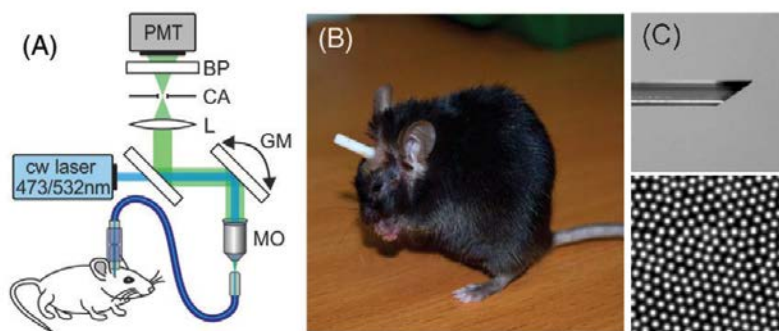


Figure 1. (A) Chronic deep-brain imaging with a reconnectable fiberscope: BP, bandpass filter; CA, confocal aperture; GM, galvanoscanned mirror; L, lens; MO, microscope objective; PMT, detection system. (B) Transgenic mouse with an implanted reconnectable fiberscope (C) Front view of a fragment of the fiber bundle used in experiments and side view of the angle-cut distal end of the fiberscope.

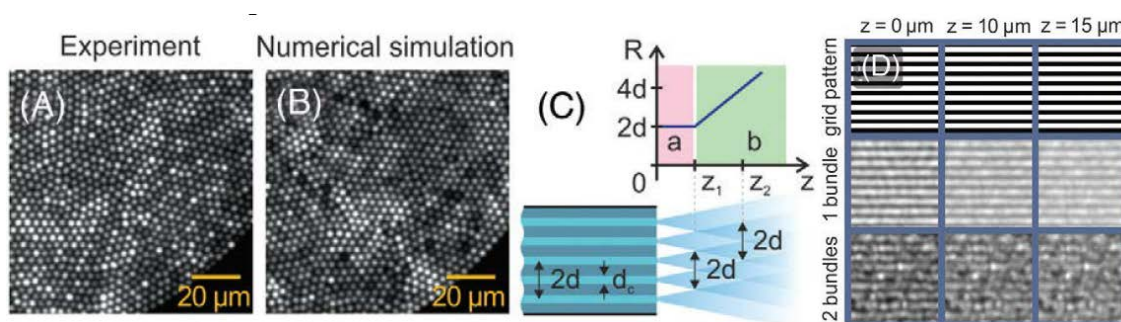


Figure 2. (A) Experimental and (B) theoretical transmission patterns of a fiber bundle consisting of 2 parts connected with a random rotation angle. (C) Diffraction-induced divergence of laser radiation delivered by a fiber bundle with a qualitative, geometric-optic picture of the behavior of the radius of the diverging laser beam  $R$  as a function of the distance  $z$  from the fiber tip. Images of a grating with a spacing (D)  $\Lambda = 5 \mu\text{m}$ , shown in the upper row, transmitted through a single fiber bundle (middle row) and a fiber bundle consisting of 2 randomly connected sections (lower row). The grating is located at a variable distance  $z$  (as specified in the figure panels) from the tip of the fiber bundle.

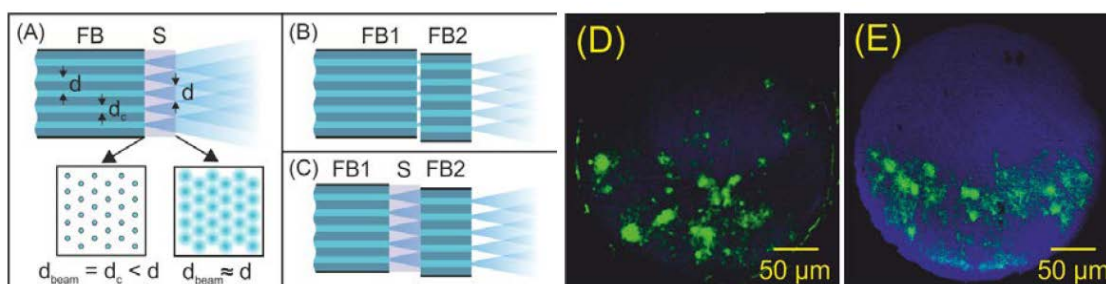


Figure 3. (A) Qualitative picture of diverging beams delivered by a fiber bundle (FB). Insets show how laser radiation fills fiber end plane (left) and spacer end plane (right). Increased beam size helps smoothing high spatial frequencies of the object without reducing resolution. (B) Connected fiber bundles (FB1 and FB2). Local misalignment of individual cores leads to low light coupling. (C) Connected fiber bundles with spacer (S) between them. Contribution of local misalignment into coupling efficiency is reduced thanks to larger beam size. Images of neural tissues in an amygdala (A) and upper cortical layers (B) taken with the fiberscope in awake Fos-EGFP (A) and GCaMP3 (B) mice. The scale bar is  $50 \mu\text{m}$

## **OPTOGENETICALLY-INDUCED TONIC DOPAMINE RELEASE FROM VTA-NUCLEUS ACCUMBENS PROJECTIONS INHIBITS REWARD CONSUMMATORY BEHAVIORS**

**Mikhailova M.A.<sup>1,2</sup>, Gainetdinov R.R.<sup>1,3</sup>, Budygin E.A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia;*

<sup>2</sup>*Department of Neurobiology and Anatomy, Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA;*

<sup>3</sup>*Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia*

*E-mail: maria.m.vita@gmail.com*

Recent optogenetic studies demonstrated that phasic dopamine release in the nucleus accumbens may play a causal role in multiple aspects of natural and drug reward-related behaviors. The role of tonic dopamine release in reward consummatory behavior remains unclear. The current study used a combinatorial viral-mediated gene delivery approach to express ChR2 on mesolimbic dopamine neurons in rats. We used optical activation of this dopamine circuit to mimic tonic dopamine release in the nucleus accumbens and to explore the causal relationship between this form of dopamine signaling within the ventral tegmental area (VTA)-nucleus accumbens projection and consumption of a natural reward. Using a two bottle choice paradigm (sucrose vs. water), the experiments revealed that tonic optogenetic stimulation of mesolimbic dopamine transmission significantly decreased reward consummatory behaviors. Specifically, there was a significant decrease in the number of bouts, licks and amount of sucrose obtained during the drinking session. Notably, activation of VTA dopamine cell bodies or dopamine terminals in the nucleus accumbens resulted in identical behavioral consequences. No changes in the water intake were evident under the same experimental conditions. Collectively, these data demonstrate that tonic optogenetic stimulation of VTA-nucleus accumbens dopamine release is sufficient to inhibit reward consummatory behavior, possibly by preventing this circuit from engaging in phasic activity that is thought to be essential for reward-based behaviors.

## EUROPEAN AND INTERNATIONAL SOCIETIES FOR NEUROCHEMISTRY AND THEIR ROLE IN PROMOTING NEW DEVELOPMENTS IN NEUROSCIENCE

**Nalivaeva N.N.<sup>1,2</sup>, Turner A.J.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*I.M.Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,  
Saint-Petersburg, Russia,*

<sup>2</sup>*School of Biomedical Sciences, University of Leeds, Leeds, U.K.*

*E-mail: n.n.nalivaeva@leeds.ac.uk*

The European Society for Neurochemistry (ESN) was founded in the mid-1970s at a time when Europe was a divided continent and neurochemistry a rapidly growing discipline. The guiding principles on which ESN was built were: being open to members from all European countries, East and West, and aiming to bridge basic and clinical neurochemistry. Over four decades ESN has promoted excellence in research through its neurochemistry initiatives and by supporting promising young neurochemists with travel and lectureship awards. ESN Council always made sure that it facilitates collaboration between Western and Eastern countries and organises its meetings widely in Europe. Since its foundation, ESN has held 22 conferences in 20 different locations, including one in 1998 in Saint Petersburg. The most recent ESN meeting was held in Paris in August 2017 together with the International Society for Neurochemistry (ISN) at which ESN celebrated its 40th Anniversary, alongside 50 years of the ISN and 60 years of Journal of Neurochemistry.

ESN, being a sister society of ISN and also member of FENS, benefits from providing its members with all the support and developments in science that ISN and FENS have in their agendas. Thus, ISN has a programme for funding organisation of small conferences on neurochemical topics as well as symposia in a conference of another society or scientific group to promote all relevant aspects of molecular and cellular neuroscience. ISN Schools Initiative provides financial support for the organization of neurochemistry schools worldwide, with a focus on emerging nations. The main purpose of these schools is to train inexperienced neuroscientists or provide updates on latest developments in neurochemistry, as well as to encourage interactions amongst scientists in developing and developed countries that may result in scientific exchanges, collaborative research opportunities and mentoring. ISN also provides funds towards travelling to another laboratory to develop new technical or conceptual expertise.

Both ISN and ESN are focusing their activity on attracting young members and providing them with an opportunity to gain organisational skills by participating in the Young Scientists Steering Committee. ESN members are also eligible for being nominated to the FENS-Kavli Network of Excellence which is a prestigious network of 30 outstanding young European neuroscientists who represent the most talented researchers among their peers. ESN and ISN promote development in all new areas of neuroscience research and, as an example, this School on Optogenetics has received some funds from ESN via its Neurochemistry Initiative. This presentation will highlight the origins, development and current activity of ESN and ISN and preparations for the forthcoming 23<sup>rd</sup> ESN Biennial Meeting - 7th Conference on Molecular Mechanisms of Regulation in the Nervous System, which will be held on September 1-4, 2019 in Milan, Italy.



## SCREENING OF NOVEL OPTOPHARMACOLOGICAL COMPOUNDS: CONVENIENT EXPERIMENTAL MODELS OF PHOTORECEPTOR DEGENERATION

Rotov A.Yu.<sup>1</sup>, Sitnikova V.S.<sup>1,2</sup>, Ryazantsev M.N.<sup>3</sup>, Firsov M.L.<sup>1</sup> & Astakhova L.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,*

<sup>2</sup>*Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University,*

<sup>3</sup>*Saint-Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia*

*E-mail: aur107@rambler.ru*

Common retinal disorders, such as retinitis pigmentosa and age-related macular degeneration, result in progressing photoreceptor loss, while the inner retinal neurons (bipolar, amacrine and ganglion cells) survive. Remaining neurons can serve as a basis for restoration of visual function. Particular therapeutic strategies are aimed to make these cells sensitive to light, so they can function as pseudo-photoreceptors. There are two different approaches to solve the task: optogenetic, which manipulate cells' genetic material, and optopharmacological, which use synthetic photoisomerizable small molecules, or photoswitches (Tochitsky & Kramer, 2015). These molecules, once being introduced into the retina, bind and block cation channels in the membrane of survived retinal neurons. Absorbing the light quantum by photoswitch molecule leads to its isomerization and unblocking of the ion channel. This results in generation of action potential i.e. electric response to light stimuli, which can be transmitted to subsequent neuronal layers.

Several azobenzene-based photoswitches were shown to restore photosensitivity of retina of photoreceptor-lacking *rd1* mice (Polosukhina et al., 2012, Tochitsky et al., 2014, 2017). While perspective in some aspects, these compounds have some disadvantages that makes need for search of new photoswitches with improved spectral and kinetic properties. Here we describe new animal models that allow fast screening of a large number of candidate photoswitches.

**Methods:** The animal models of degenerated retina were based on the marsh frog *Rana ridibunda*. **Model I** - mechanical removal of photoreceptor layer from isolated retina using filter paper. **Model II** - inducing photoreceptor-specific degeneration in the live frog by intraocular injection of antibiotic tunicamycin (1  $\mu\text{g}/10$  mg of body weight in DMSO; Fliesler et al., 1984, Fliesler & Basinger, 1985). The degeneration process was checked by recording in vivo electroretinogram (ERG) from the anaesthetized animals after the injection with 7 days interval, up to complete disappearance of any response to light stimulation. Extent of retinal degeneration in **Model II** was also assessed by light microscopy of retinal sections.

Isolated retina preparations from both models of photoreceptor degeneration were tested for absence of response to light stimuli by ERG recording in Ussing-type perfusion chamber. Then retinas were incubated in normal Ringer solution containing 1 mM AAQ (Acrylamide-azobenzene-quaternary ammonium, see Fig.1), a photoswitch, which was shown to restore the light sensitivity of retina of *rd1* mice (Polosukhina et al., 2012). After 30 minutes of incubation, the preparations were once more tested for response to brief flashes and steps of light in the ERG rig.

**Results:** ERG from isolated retina of **Model I** (mechanically removed photoreceptors) showed either no response to light stimulus, or extremely weak residual response (up to few  $\mu\text{V}$ ). This indicates that our approach provides appropriate model of the degenerated retina. In the **Model II** (injection of tunicamycin) degeneration developed within 2-3 weeks. Gradual decrease of in vivo recorded ERG amplitude from injected eye and light microscopy suggests loss of photoreceptor layer in retina but surviving of inner retinal neurons. Thus, retina preparations from frogs exposed to tunicamycin injections also represent reliable model of photoreceptor degeneration (Fig. 2: A, B).

After retina incubation in AAQ-containing solution, brief light flashes induced no photoresponse. UV light step (365 nm, duration 5 or 10 s), which corresponds to the peak of AAQ's absorbance, led to a gradual decrease in the total transretinal potential by 10 to 100  $\mu\text{V}$  in the **Model I** of the degenerated retina and by 10 to 30  $\mu\text{V}$  in the **Model II**. After light turn-off, ERG potential either stayed steady or very slowly returned back to baseline (**Fig. 2: C, D**). The amplitude of the resulting response demonstrated the dependence on the intensity of the UV stimulus: the higher intensity results in greater transretinal potential change. These results prove that both our models became photosensitive after photoswitch exposure, so they can be considered suitable for further screening of candidate compounds.

**Conclusion:** Both models of degenerated retina, mechanical removal of photoreceptor layer and tunicamycin-induced degeneration, are suitable for mass screening of the new candidate photoswitches. The approach involving the mechanical removal of photoreceptors (**Model I**) allows the degenerated retina preparation to be rapidly obtained, which speeds up the screening process. Meanwhile, the process of tunicamycin-induced degeneration of photoreceptors occurs gradually coming with the structural changes in the retina. Thus, **Model II** allows one to investigate the effect of molecular photoswitches on the remodeled degenerated retina, which make this model closer to retinitis pigmentosa and age-related macular degeneration (*Marc et al., 2014*).

We showed the presence of AAQ-mediated photosensitivity of degenerated retina in UV range, which is in agreement with the data on *rd1* mice retina (*Polosukhina et al., 2012*). According to our results, the turn-off kinetics of AAQ-mediated photoresponses after the light step stimuli is too slow, so AAQ cannot be considered as perspective compound for human optopharmacological therapy.

*Study was supported by Russian Foundation for Basic Research (15-29-03872 ofi\_m) and Academic Program for Basic Research grant.*

## References

- 1) Tochitsky I., Kramer R. H. Optopharmacological tools for restoring visual function in degenerative retinal diseases //Current opinion in neurobiology. – 2015. – V. 34. – P. 74-78.
- 2) Polosukhina A., Litt J., Tochitsky I., Nemargut J., Sychev Y., De Kouchkovsky I., Huang T., Borges K., Trauner D., Van Gelder R.N., Kramer R.H. Photochemical restoration of visual responses in blind mice //Neuron. – 2012. – V. 75. – №. 2. – P. 271-282.
- 3) Tochitsky I., Polosukhina A., Degtyar V.E., Gallerani N., Smith C.M., Friedman A., Van Gelder R.N., Trauner D., Kaufer D., Kramer R.H. Restoring visual function to blind mice with a photoswitch that exploits electrophysiological remodeling of retinal ganglion cells //Neuron. – 2014. – V. 81. – №. 4. – P. 800-813.
- 4) Tochitsky, I., Trautman, J., Gallerani, N., Malis, J. G., & Kramer, R. H.. Restoring visual function to the blind retina with a potent, safe and long-lasting photoswitch //Scientific reports. – 2017. – V. 7. – P. 45487.
- 5) Fliesler S. J., Rapp L. M., Hollyfield J. G. Photoreceptor-specific degeneration caused by tunicamycin // Nature. – 1984. – V. 311 (5986). – P. 575-577.
- 6) Fliesler S. J., Basinger S. F. Tunicamycin blocks the incorporation of opsin into retinal rod outer segment membranes // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1985. – V. 82 (4). – P. 1116-1120.
- 7) Marc, R., Pfeiffer, R., Jones, B. Retinal prosthetics, optogenetics, and chemical photoswitches // ACS chemical neuroscience. – 2014. – V. 5 (10). – P. 895-901.

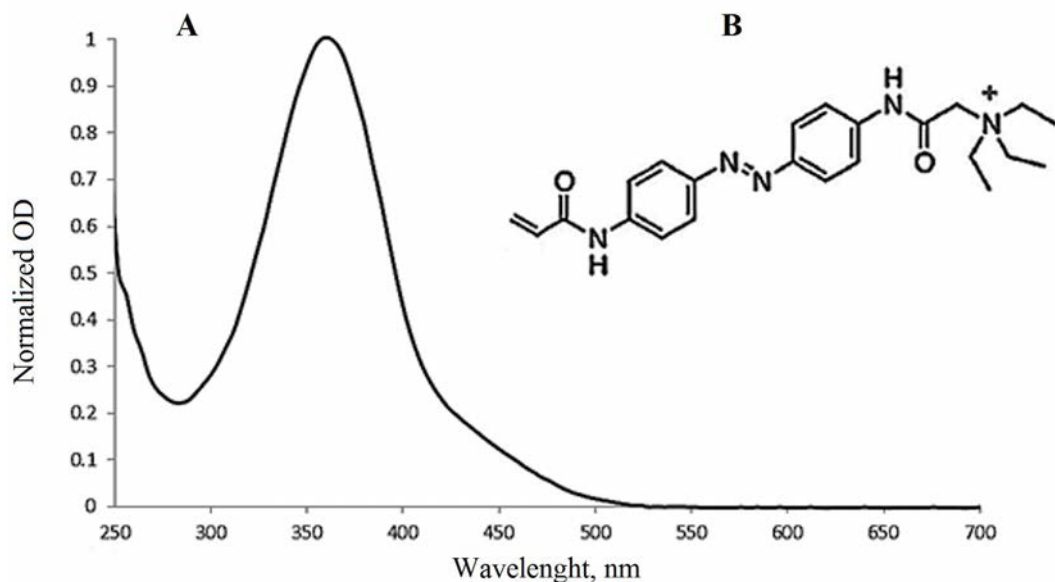


Figure 1. Acrylamide-azobenzene-quaternary ammonium (AAQ): the photoswitch that was used to test the models of photoreceptor degeneration. A -- absorbance spectrum of AAQ solution in normal Ringer, which has a peak on 360 nm. B -- AAQ structural formula.

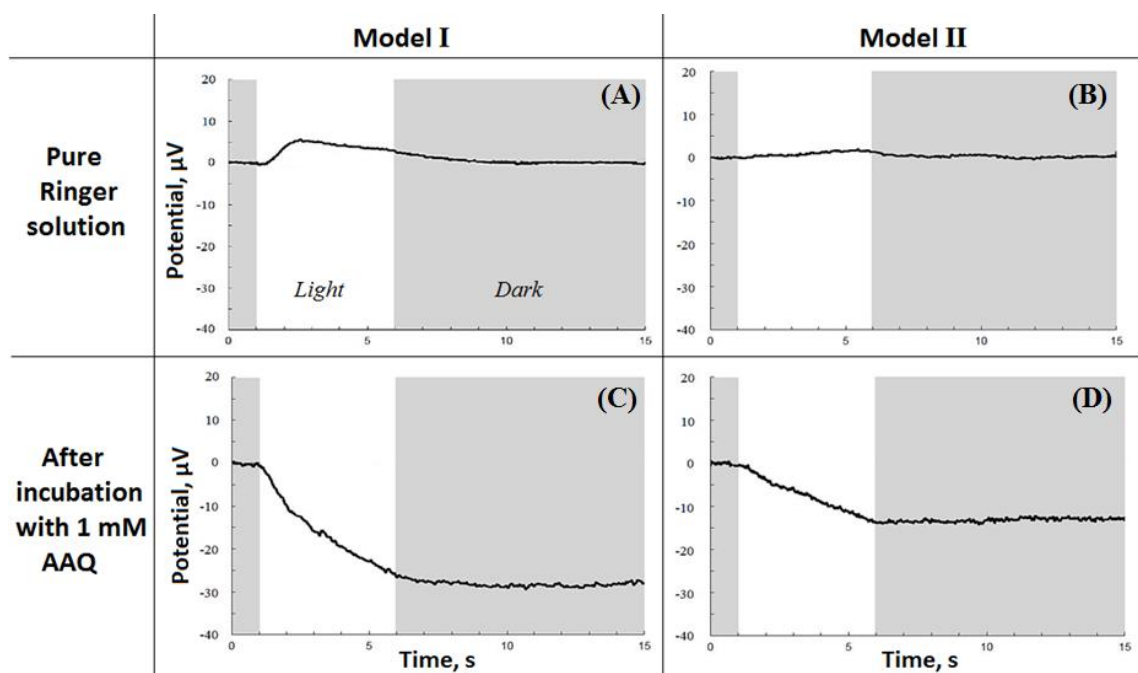


Figure 2. Testing models of photoreceptor degeneration with AAQ, a photoswitch with well-known effect on degenerated retina. A, B -- control ERG recordings in normal Ringer solution show absence of photoresponse or weak response of residual photoreceptors. C, D -- ERG recordings after retina preparations incubation in Ringer solution, containing 1 mM AAQ show decreasing of transretinal potential in response to steps of UV light for both models. Grey shading on the graphs indicates the darkness, white areas -- the light stimulation period. Applied stimuli were 365 nm LED, intensity  $\approx 10^8$  photons/ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ , duration 5 s.

## АНАЛИЗ ФУНКЦИЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ С ПОМОЩЬЮ СВЕТА

**Брежестовский П.Д.**

*Казанский Государственный Медицинский Университет, г. Казань, Россия;  
Aix Marseille University, INSERM, Institute of System Neurosciences, Marseille, France  
E-mail: pbreges@gmail.com*

Развитие молекулярной биологии, создавшее возможности для специфического встраивания белков в определенные типы клеток, а также обнаружение светочувствительных белков и, более того, возможность создания новых светочувствительных молекулярных модулей определили взрыв в развитии направлений, где главным действующим лицом является свет. Оптогенетические методы, фотохромные переключатели и генетически кодируемые биосенсоры открыли беспрецедентные возможности для мониторинга и модуляции функций клеток. Это и привело к радикальным изменениям в экспериментальных подходах. Исследователи ищут пути, позволяющие управлять активностью клеток и даже поведением живых организмов с помощью светочувствительных белков, а для неинвазивной регистрации клеточных параметров создают генетически кодируемые светорегулируемые сенсоры.

В результате в последние годы возникло три новых направления - *оптогенетика*, *оптосенсорика* и *оптофармакология*, благодаря которым с помощью света можно исследовать функции клеток и клеточных ансамблей, управлять их активностью, измерять концентрации ионов и других клеточных соединений, управлять поведением живых организмов, а также искать пути для лечения некоторых заболеваний.

**Оптогенетика** - это научно-технологическое направление, в котором используются *генетически кодируемые светочувствительные молекулы* для оптической регистрации и контроля генетически визуализированных клеток разных типов возбудимых тканей.

Основными инструментами являются *светочувствительные бактериальные белки*, которые при встраивании в мембраны способны вызывать возбуждение или торможение клеток.

**Оптосенсорика** - это регистрация и анализ изменений концентраций ионов и других клеточных компонент с помощью специфических генетически кодируемых биосенсоров. *Генетически кодируемые сенсоры* - это белковые макромолекулярные комплексы, имеющие флуорофорные группы, способные избирательно изменять флуоресценцию при взаимодействии с определенными ионами, специфическими молекулярными группами или белками.

При создании биосенсоров необходимо, чтобы эти молекулярные комплексы:

- были высокочувствительны и избирательны к иону или молекуле, присутствие которых нужно исследовать в клетке;
- позволяли определять не только присутствие, но и концентрацию, а также динамику изменений внутриклеточной концентрации;
- не нарушали функционального состояния клеток, т.е. не были токсичными;
- были достаточно яркими, чтобы избежать артефактов, связанных с автофлуоресценцией некоторых белков клеток и тканей;
- были стабильными при длительных экспериментах;
- позволяли включение в промоторы, обеспечивающие их экспрессию в определенных типах клеток, или содержали специализированные <<якорные>> участки аминокислот, позволяющие локализовать сенсоры в определенных клеточных пространствах.

Используются две основные категории генетически кодируемых биосенсоров:

- а) состоящие из одного флуоресцентного белка, чувствительного к определенной молекуле или иону (single FP-сенсоры);
- б) состоящие из двух флуоресцентных белков и работающие по принципу резонансной передачи энергии от донорного флуоресцентного белка к акцепторному (FRET-сенсоры) (FRET - передача энергии посредством флуоресцентного резонанса).

**Оптофармакология** - это направление, в котором используются химически синтезируемые фотохромные соединения способные избирательно активировать или угнетать определённые молекулы (рецепторы, ионные каналы, ферменты) клеток биологических организмов. При этом методе лиганд подсоединяется ковалентно к молекуле, являющейся <<светоуправляемым химическим переключателем>>, т.е. молекулой, которая способна изменять свою конформацию при действии света. Одним из таких широко используемых светопереключателей является азобензен, который при действии ультрафиолета быстро переходит из *транс*- в *цис*-конформацию. В общем, фотохромные переключатели можно разделить на две основные категории: I) молекулы, которые действуют как растворимые фотохромные лиганды; II) молекулы, способные ковалентно привязываться к цели-белку. Для этого к светопереключателю присоединяется группа, способная образовывать ковалентные связи с определенными молекулами ионного канала или рецептора, который необходимо активировать. Как правило, к азобензену присоединяется малеимид, способный образовывать ковалентные связи с цистеинами.

### Литература

- 1) Брежестовский П.Д. (2015) Оптогенетика в неврологии: обзор направлений и перспективы // Неврология XXI века: диагностические, лечебные и исследовательские технологии. В 3-х т. (под. ред. М.А. Пирадова, С.Н. Иллариошкина, М.М. Танащян). Т. III: Современные исследовательские технологии в экспериментальной неврологии. М.: АТМО, 315-349.
- 2) Bregestovski P., Mukhtarov M. (2016) Optogenetics: perspectives in biomedical research (review). *Sovremennye tehnologii v medicine (Rus)* 8(4): 212--221
- 3) Bregestovski, P., Maleeva, G. and Gorostiza, P. (2017). Light-induced regulation of ligand-gated channel activity. *British journal of pharmacology*.
- 4) Брежестовский П. Д., Малеева Г. В. (2017) Фотофармакология: краткий обзор на примере управления калиевыми каналами *ЖУРНАЛ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ*, том 67, № 5, с. 41--52

## ФОТОУПРАВЛЯЕМАЯ МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ТОРМОЗНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

Брежестовский П.Д.

Казанский Государственный Медицинский Университет, г. Казань, Россия

E-mail: pbreges@gmail.com

Фотохромные молекулы представляют собой уникальные инструменты для точного пространственного и временного управления многочисленными биологическими процессами, включая нейрональную активность. Методика основана на способности некоторых молекул (азобенzenов, спиропиранов, диарилетенов) изменять свою конформацию под воздействием определенных волн света. В поисках создания эффективных фотомодуляторов тормозных рецептор-управляемых хлорных каналов, мы разработали новое соединение Азо-Диазепам-1 (Azo-Dz1), которое представляет собой диазепамовую основу в сочетании диазепамной моиты и фотоизомеризируемой группы азобензола. Влияние Azo-Dz1 на ионные токи, генерируемые разными субъединицами ГАМКА и ГАМКС рецепторов экспрессируемых в линии СНО клеток, анализировали с помощью пэтч-кламп метода. На клетках экспрессирующих гетеромерный ГАМКА рецептор, формируемый субъединицами  $\alpha 1/\beta 2/\gamma 2$ , Azo-Dz1 (50  $\mu$ M) в транс-конфигурации угнетал амплитуду ионных токов, вызываемых как низкими, так и насыщающими концентрациями ГАМК. При освещении светом длиной волны 360 нм, переводящим Azo-Dz1 в цис-конфигурацию, блокирующий эффект прекращался. Эффективность действия фотохрома зависела от мембранного потенциала и была гораздо более выражена при положительных потенциалах.

Мы проанализировали также эффект Azo-Dz1 на активность гомомерных  $\rho 1$  и  $\rho 2$  ГАМКС рецепторов. Оказалось, что в транс-конфигурации Azo-Dz1 угнетает амплитуду токов, генерируемых  $\rho 2$  ГАМКС рецепторами, в то время, как на клетках экспрессирующих  $\rho 1$  ГАМКС рецепторы, фотохром был не активен. Потенциал зависимость, а также высокая эффективность действия Azo-Dz1 при насыщающих концентрациях агониста, позволили предположить, что фотохром блокирует ион-проводящую пору ГАМК рецепторов. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей во втором трансмембранном домене (ТМ2), формирующих хлор-избирательный ионный канал, указывает, что в этом участке субъединицы различаются всего одной аминокислотой на уровне 2' (пролин (P) в  $\rho 1$  субъединице и серин (S) в  $\rho 2$  рецепторе).

Для проверки гипотезы каналоблокирующего действия Azo-Dz1, были произведены точечные мутации в ТМ2  $\rho 1$  и  $\rho 2$  субъединиц. Было показано, что  $\rho 1$  рецептор с P2'S мутацией в ТМ2 становится чувствительным к действию Azo-Dz1, в то время, как замена серина в  $\rho 2$  на пролин или глицин делает эту субъединицу нечувствительной к фотохрому. В общем, полученные результаты показывают, что новый фотохромный модулятор активности ГАМК рецепторов функционирует как управляемый светом каналоблокатор, имеющий преимущественное действие в нижней области хлор-избирательного трансмембранного домена.

## ПРИМЕНЕНИЕ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К ИССЛЕДОВАНИЮ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ НЕЙРОНОВ У МЫШЕЙ-МОДЕЛЕЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Власова О.Л.<sup>1</sup>, Артамонов Д.Н.<sup>1</sup>, Ерофеев А.И.<sup>1</sup>, Безпрозванный И.Б.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория молекулярной нейродегенерации Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (СПбПУ), г. Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> Отделение физиологии Юго-Западного медицинского центра Университета Техаса, Даллас, Техас, США

E-mail: olvlasova@yandex.ru

**В Лаборатории Молекулярной Нейродегенерации СПбПУ** под руководством И.Б. Безпрозванного на моделях трансгенных животных изучают молекулярные механизмы развития нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера - БА, болезнь Хантингтона - БХ, спиноцеребеллярная атаксия - СЦА), связанные с нарушением кальциевого обмена в нейронах. Проведенные исследования с использованием конфокальной микроскопии показали изменения морфологии клеток с нарушенной кальциевой сигнализацией по отношению к контролю, а именно: изменяется как общее количество дендритных шипиков, так и их распределение по группам (грибовидные, тонкие, пеньковые) [1,2]. Вместе с тем, нейродегенеративные отклонения могут сопровождаться не только изменением морфологии нейронов, но и изменением их электрической активности и ослаблением синаптических контактов. Токи и потенциалы действия, генерируемые нейронами, стандартно регистрируют с помощью известного метода локальной фиксации потенциала (патч-кламп). Однако данный метод не позволяет достаточно тонко регулировать активность клеток и силу синаптических контактов. На сегодняшний день, одним из самых современных и эффективных по временному и пространственному разрешению подходов, позволяющих изучать и регулировать электрофизиологическое состояние нейронов, является оптогенетика [3]. Она базируется на генетической модификации клеток с образованием в плазмалемме светочувствительных ионных каналов (белки опсины) и их дальнейшей световой стимуляции.

**Целью работы** явилась оценка возможностей применения оптогенетики для сравнения электрофизиологической активности нейронов гиппокампа в норме и у мышей-моделей болезни Альцгеймера, а также, сравнение функциональности синаптических связей между нейронами коры и стриатума в норме и у мышей-моделей болезни Хантингтона.

Работа проведена на культуре клеток гиппокампа, а также, на смешанной кортико-стриатной культуре. Использовали следующие трансгенные линии мышей: PS1-M146V knock-in (KI) - БА, YAC128 - БХ. Для экспрессии опсинов в нейронах использовали плазмиды, кодирующие каналородопсин ChR2 (в ряде экспериментов галородопсин NpHR), слитые с геном белка GFP, под контролем промотора CMV (Addgene plasmids 15814, 14750) [4]. Спонтанную и индуцированную электрическую активность нейронов в смешанной кортико-стриатной культуре и в культуре гиппокампальных клеток регистрировали с помощью метода локальной фиксации потенциала в конфигурации <<cell-attached>> или <<whole-cell>>. Световое воздействие проводили с помощью источника света с рабочей длиной волны 470 нм (ChR2) и 590 нм (NpHR).

Совместные морфологические и электрофизиологические, в том числе, с применением оптогенетических подходов, исследования позволили понять особенности в поведении нейронов, выделенных из мышей-моделей нейродегенеративных заболеваний. Общее количество дендритных шипиков у нейронов экспериментальных животных на начальном этапе соответствовало или даже несколько превышало аналогичный показатель контрольных групп. Как нейроны кортекса, так и нейроны гиппокампа модельных животных обладали повышенной

электрофизиологической активностью по отношению к клеткам дикого типа на ранних стадиях созревания культуры или на начальных этапах световой стимуляции. Ситуация кардинально изменялась с течением времени, а именно: количество шипиков, число генерируемых потенциалов действия (ПД), а в случае гиппокампальных нейронов и амплитуда ПД, существенно уменьшалось, т.е. при более активном электрофизиологическом поведении на ранних этапах, экспериментальные клетки, в отличие от нейронов дикого типа, не сохраняли его постоянство с течением времени (рис.1).

Следует отметить, что оптогенетические подходы позволили обнаружить различия в электрофизиологической активности нейронов уже на 14 день культивирования, в то время как явные различия в спонтанной активности и в морфологии проявились только на более поздних этапах созревания культуры (19 день). Этот факт позволяет сделать вывод о практической важности оптогенетики как диагностического метода, позволяющего на более ранних стадиях обнаружить отклонения от нормы.

Кроме того, только при оптогенетической стимуляции (проводилась еще электрическая и химическая стимуляция) у нейронов К1 с нарушением внутриклеточной регуляции кальция, наблюдалось увеличение числа ПД и уменьшение их амплитуды. Мы предполагаем, что данный эффект связан с неизбирательным поступлением катионов в клетку с последующим изменением внутриклеточного рН и активацией нейрона на стадии относительной рефрактерности [5].

В случае кортико-стриатной культуры оптогенетика позволила, также, регулировать силу синаптической связи, а именно: более длительное воздействие светом тождественное генерации большего количества потенциалов действия внутри одной пачки в кортикальном нейроне существенно повышала активацию средних шипиковых нейронов [4].

Таким образом, оптогенетика показала себя как хороший стимулирующий и диагностический метод, позволяющий на ранних этапах развития нейродегенерации обнаружить различия в электрофизиологической активности клеток.

*Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-25-00024-П.*

## Литература

- 1) Elena Popugayeva, Ekaterina Pchitskaya, Anastasiya Speshilova, Hua Zhang, Olga Vlasova, Sergey Alexandrov and Ilya Bezprozvanny . STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity. *Molecular Neurodegeneration* (2015) Volume 10, Issue 1, Article number 37.
- 2) Jun Wu, Daniel Ryskamp, Xia Liang, Polina Egorova, Olga Zaharova, Gene Hung, and Ilya Bezprozvanny. Enhanced store-operated calcium entry leads to striatal synaptic loss in Huntington's disease mouse model. *Journal of Neuroscience*. 2016 vol 36, pp 125--141.
- 3) Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K. 2005. *Nat. Neurosci.* Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. 8 (9), 1263--1268.
- 4) Artamonov, D.N., Korzhova, V.V., Vlasova, O.L., Bezprozvannyi, I.B. Optogenetic approach to the studies of synaptic transmission. 2014. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 157 (3), pp. 404-407.
- 5) Ерофеев А. И., Захарова О. А., Терехин С. Г., Плотникова П. В., Безпрозванный И. Б., Власова О. Л. Оптогенетическое исследование электрофизиологических особенностей нейронов гиппокампа транспозонных мышей линии PS1-M146V (модель болезни Альцгеймера). *Журнал высшей нервной деятельности*, 2017, том 67, № 5, с. 63--74.



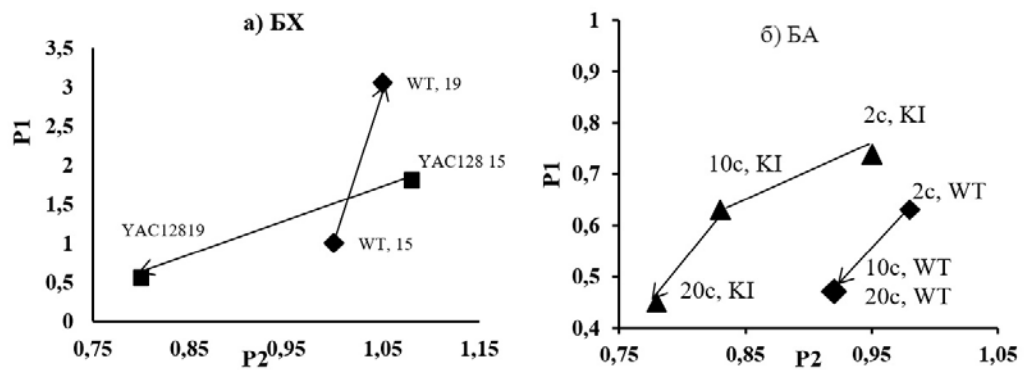


Рис. 1. Параметрическое представление различий в морфологии и электрической активности нейронов: а) нейроны кортекса [4], P1 -- параметр, характеризующий число спонтанно генерируемых ПД, P2 -- параметр, характеризующий общее количество шипиков (15 и 19 дней культивирования), за единицу приняты значения для WT 15; б). нейроны гиппокампа (14 дней культивирования)[5], P1 -- параметр, характеризующий число генерируемых ПД, P2 -- параметр, характеризующий величину амплитуды ПД в ответ на световую стимуляцию, за единицу приняты значения в начальный момент (затем измерения по завершении 2с, 10с и 20 с светового облучения).

## **ОПТИЧЕСКИЙ ИМИДЖИНГ НЕЙРОНОВ МОЗГА, УЧАСТВОВАВШИХ В ПОЛУЧЕНИИ НОВОГО ОПЫТА: НОВЫЕ *IN VIVO* И *EX VIVO* ПРИМЕНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ СЕНСОРОВ**

Груздева А.М.<sup>1,2</sup>, Ивашкина О.И.<sup>1,2</sup>, Субач Ф.В.<sup>1,3</sup>, Анохин К.В.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>НИЦ "Курчатовский институт",

<sup>2</sup>Центр нейронаук и когнитивных наук, МГУ им. Ломоносова,

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт,

<sup>4</sup>НИИ нормальной физиологии имени П.К. Анохина, Москва, Россия

E-mail: [annadronova@mail.ru](mailto:annadronova@mail.ru)

В настоящее время считается, что формирование памяти сопровождается образованием нейронных популяций, кодирующих данную память, или энграмм. Наиболее применимыми способами визуализации нейронов энграммы являются подходы, основанные на оценке экспрессии немедленного раннего гена *c-fos* (Josselyn et al., 2015; Tonegawa et al., 2015). Так, оптический *in vivo* имиджинг нейронов мозга мышей трансгенной линии *fos-eGFP* позволяет оценивать активацию одних и тех же нейронов во время различных когнитивных эпизодов (Czajkowski et al., 2014). Другим способом оценки активации нейронов является оптогенетическая регистрация изменения концентрации кальция в цитоплазме нейронов, которая отражает изменения электрической активности. Прижизненная визуализация кальциевой активности нейронов в настоящее время широко распространена для исследования изменения активности нейронов во время различных когнитивных эпизодов (Jercog et al., 2016, Dombeck et al., 2010). Оптическую регистрацию кальциевой активности с помощью генетически кодируемых применяют для исследования активности нейронов различных структур или нейронов различных типов (Pinto, Dan, 2016). Однако исследований, в которых специфически регистрировали кальциевую активность в нейронах энграммы, ранее не проводили. Также вопрос о соотношении кальциевой активности нейронов и их геномного ответа остается открытым. В связи с этим в данной работе предложена трансгенная линия мышей, использование которой позволит исследовать кальциевую активность в нейронах, в которых происходила экспрессия гена *c-fos* при получении нового опыта. Кроме того, представлен новый кальций-зависимый созревающий сенсор, использование которого в сочетании с методами иммуногистохимии позволяет проводить сопоставление кальциевой активности и геномного ответа нейронов при получении нового опыта.

Нами были получены двойные трансгенные мыши *Fos-Cre-GCaMP*, у которых экспрессия *Cre*-рекомбиназы находится под контролем промотора немедленного раннего гена *c-fos*, а ген *gscamp3* находится под *loxP*-фланкированным стоп-кодоном. Для последующего проведения кальциевого имиджинга, трансгенным мышам вживляли транскраниальное окно над теменной ассоциативной областью неокортекса (PtA) Через месяц после операции мышам внутрибрюшинно вводили тамоксифен в дозе 150 мг/кг для активации *Cre*-рекомбинации и запуска экспрессии гена *gscamp3*. Через день мышей обучали в задаче условно-рефлекторного замирания на звук (УРЗ). Таким образом, в клетках, в которых происходила экспрессия гена *c-fos* во время обучения, в дальнейшем экспрессировался кальциевый сенсор *GCaMP3*.

Для оценки временной динамики накопления *GCaMP3* в нейронах коры головного мозга мышей, проводили двухфотонный *in vivo* имиджинг одной и той же области PtA каждый день в течение 7 дней после обучения. Через два часа после обучения не было выявлено *GCaMP3*-положительных нейронов, через день после обучения было выявлено около 15% *GCaMP3*-положительных нейронов от максимального количества, которое было выявлено на третий день после обучения и сохранялось при дальнейших эпизодах визуализации в течение семи дней.

Таким образом, показано, что максимальная экспрессия GCaMP3 в нейронах, вовлекавшихся в когнитивный эпизод, происходит на третий день после эпизода Cre-рекомбинации, и сохраняется в дальнейшем.

В работе провели исследование кальциевой активности нейронов, участвовавших в формировании памяти, при ее извлечении. Для этого через три дня после обучения в задаче УРЗ на звук проводили *in vivo* имиджинг, во время которого мышам предъявляли тот же звуковой сигнал, который использовали в качестве условного сигнала при обучении. Была проведена регистрация кальциевой активности в 28 нейронах, в результате которой были идентифицированы три типа нейронов, выделенные в соответствии с их ответом на условный сигнал: нейроны, в которых активность не изменялась в течение регистрации, нейроны, демонстрирующие активность в отсутствие звукового сигнала, и нейроны, отвечающие во время предъявления звука. Также была проведена регистрация изменения флуоресценции GCaMP3 в отдельных шипиках нейронов. Было зарегистрировано локальное увеличение кальциевой активности в дендритном шипике и последующие увеличение флуоресценции GCaMP3 в дендритной ветви. Таким образом, использование двойной трансгенной линии Fos-Cre-GCaMP позволяет проводить долговременные исследования кальциевой активности в телах и дендритных отростках нейронов, участвовавших в обучении.

Для оценки возможности использования разработанного кальций-зависимого созревающего сенсора проводили *ex vivo* визуализацию сенсора в бочонковых полях соматосенсорной коры в ответ на стимуляцию вибрисс. Мышам линии C57Bl/6 вводили аденоассоциированные вирусные частицы, несущие ген кальций-зависимого созревающего сенсора (pRm3 #39) и ген зеленого флуоресцентного белка GFP под промотором CAG (AAV-CAG-pRm3#31-P2A-GFP) в L2/3 области бочонковых полей соматосенсорной коры. Данный конструктор позволяет определить процент активировавшихся клеток среди зараженных вирусными частицами клеток: GFP синтезируется во всех зараженных клетках, красный кальций-зависимый созревающий сенсор флуоресцирует в клетках, в которых происходило увеличение концентрации кальция в цитоплазме.

В качестве сенсорной стимуляции была использована модель обогащения среды в домашней клетке. Для этого через три дня после операции экспериментальным мышам в домашнюю клетку вешали нити с бусинами, так чтобы они равномерно заполняли клетку. Контрольных мышей оставляли в стандартных домашних клетках. Через пять дней нахождения в обогащенной среде животных наркотизировали, проводили интракардиальную перфузию, извлекали мозг и изготавливали фронтальные срезы мозга. Изображения области бочонковых полей соматосенсорной коры получали с помощью конфокального микроскопа. Для оценки процента клеток, в которых происходило увеличение кальциевой активности, от количества зараженных клеток, анализировали количество колокализаций сенсора pRm3 #39 с GFP.

Клетки области бочонковых полей соматосенсорной коры успешно заразились в результате трансфекции используемыми вирусными частицами. Во всех исследуемых мышах выявлены GFP-положительные клетки. У мышей, которым проводили сенсорную стимуляцию, выявлен высокий процент колокализаций кальций-зависимого созревающего сенсора pRm3 #39 с GFP (около 80%). Для контрольных мышей показан низкий процент колокализаций pRm3 #39 (около 35%). Таким образом, с помощью разработанного созревающего сенсора выявлено, что у мышей экспериментальной группы большая часть клеток специфически активировалась по кальцию во время длительной сенсорной стимуляции, что соотносится с литературными данными, полученными с помощью других методов (Kerr et al., 2007).

В данной работе предложены новые оптогенетические методы, позволяющие проводить имиджинг активности нейронов, участвовавших в получении нового опыта. *In vivo* имиджинг активности нейронов мозга мышей трансгенной линии Fos-Cre-GCaMP, в отличие от других современных оптогенетических методов кальциевого имиджинга, позволяет адресоваться к ней-

ронам, вовлекавшимся в получение нового опыта. Ex vivo визуализация кальций-зависимого созревающего сенсора совместно с иммуногистохимической окраской на белок c-Fos может позволить сопоставить кальциевую активность и геномный ответ одних и тех же нейронов.

*Работа поддержана грантами: РНФ №14-15-00685, РНФ №16-15-10323.*

### Литература

- 1) S. A. Josselyn, S. Köhler, P. W. Frankland Finding the engram, Nature reviews. 16 (2015) 521-534.
- 2) S. Tonegawa, M. Pignatelli, D.S. Roy, T.J. Ryan Memory engram storage and retrieval, Current Opinion in Neurobiology. 35 (2015) 101--109.
- 3) R. Czajkowski, B. Jayaprakash, B. Wiltgen, T. Rogerson, M. Guzman-Karlsson, A. Barth, J. Trachtenberg, A. Silva Encoding and storage of spatial information in the retrosplenial cortex, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 111 (2014) 8661-8666.
- 4) P. Jercog, T. Rogerson, M.J. Schnitzer Large-Scale Fluorescence Calcium-Imaging Methods for Studies of Long-Term Memory in Behaving Mammals, Cold Spring Harb Perspect Biol. 8 (2016).
- 5) D.A. Dombeck, C.D. Harvey, L. Tian, L.L. Looger, D.W. Tank Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation, Nature neuroscience. 13 (2010) 1433--1440
- 6) L. Pinto, Y. Dan Cell-Type-Specific Activity in Prefrontal Cortex during Goal-Directed Behavior, Neuron. 87 (2015) 437-50.
- 7) J.N.D. Kerr, C.P.J. de Kock, D.S. Greenberg, R.M. Bruno, B. Sakmann and F. Helmchen Spatial Organization of Neuronal Population Responses in Layer 2/3 of Rat Barrel Cortex, The Journal of Neuroscience. 27 (2007) 13316 --13328.

## ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО И НЕЙРОХИМИЧЕСКОГО ОТВЕТОВ НА ОПТОГЕНЕТИЧЕСКУЮ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКУЮ МОДУЛЯЦИЮ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ НЕЙРОТРАНСМИССИИ

Дыгало Н.Н.<sup>1,2</sup>, Калинина Т.С.<sup>1,2</sup>, Дрозд У.С.<sup>1,2</sup>, Сухарева Е.В.<sup>1,2</sup>, Булыгина В.В.<sup>1</sup>, Коншу Д.А.<sup>1,2</sup>, Шишкина Г.Т.<sup>1</sup>, Ланшаков Д.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского Отделения Российской академии наук,

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, кафедра физиологии, г. Новосибирск, Россия  
E-mail: dygalo@bionet.nsc.ru

Цель работы заключалась в выявлении роли глутаматергической нейротрансмиссии гиппокампа и, прежде всего, его дорзального отдела в регуляции психоэмоциональных ответов на стресс. Депрессивно-подобное состояние, индуцированное у взрослых самцов крыс 2-недельным ограничением подвижности в тесных клеточках или вынужденным плаванием, сопровождалось снижением экспрессии субъединиц AMPA и NMDA ионотропных рецепторов глутамата в гиппокампе. Отсутствие таких последствий при кратковременном стрессе, который еще не сопровождается выраженными симптомами депрессивного состояния, позволяют предполагать, что изменения, возникающие при продолжительном действии стрессоров, могут быть участниками механизма формирования индуцированной стрессом психопатологии. Оптогенетическая активация пирамидных нейронов CA1 дорзального гиппокампа способствует проявлению депрессивно-подобного поведения. Обнаружено изменение экспрессии белка раннего ответа c-Fos и белка Vcl-xL, увеличение уровня которого в гиппокампе ассоциируется с психоэмоциональной устойчивостью к стрессу в результате оптогенетической стимуляции глутаматергических нейронов области CA1 гиппокампа в условиях стрессорного теста на депрессивно-подобное поведение (tail suspension test). Изменение экспрессии этих маркеров активации нейронов имеет динамический характер. Через 2 часа после завершения стрессорного и светового воздействий у животных, экспрессирующих каналородопсин (ChR2), иммунореактивность c-Fos повышена по сравнению с контролем в CA1 гиппокампа, а также в дорсальных слоях префронтальной коры. Иммунореактивность Vcl-xL у светочувствительных животных была снижена по сравнению с контролем во всех областях гиппокампа. Следовательно, стимуляция пирамидных нейронов гиппокампа, вызывающая депрессивно-подобное поведение, ассоциирована со специфической активацией нейронов CA1 гиппокампа и префронтальной коры, которая в постстрессорный период сопровождается снижением экспрессии нейропротекторного белка Vcl-xL в гиппокампе. Противоположное по сравнению с оптогенетической активацией CA1 нейронов - понижающее депрессивно-подобное поведение действие антагониста NMDA рецепторов глутамата кетамина наблюдалось уже через 2 часа после его введения и сопровождалось снижением адренкортикального ответа на острый стресс, обусловленный условия tail suspension test, что, судя по выявленной достоверной положительной корреляции между уровнем кортикостерона и временем неподвижного состояния в тесте, может быть обусловлено менее выраженным депрессивно-подобным поведением животных, получавших кетамин. Стресс, вызванный условиями tail suspension test, достоверно повышал уровень мРНК гена раннего ответа c-fos через час после теста в коре, миндалине, гиппокампе, среднем мозге, а также в стволовой его части у животных, которым перед тестом вводили физиологический раствор по сравнению с нестрессированной группой, получавшей аналогичное введение. Кетамин повышал уровень мРНК c-fos у нестрессированных животных в коре, и в стволовой части мозга. При этом, индуцируемое стрессом повышение уровня мРНК c-fos у животных, которым перед тестом вводили кетамин не было достоверным в гиппокампе и стволовой части мозга, в котором этот

уровень, также как и в миндалине, был ниже чем в этих структурах мозга стрессированных крыс, которым перед тестом вводили физиологический раствор. Наибольший уровень мРНК c-fos после введения кетамина и снижение степени его повышения при стрессе наблюдалось в коре. Паттерн вызываемых кетамином изменений уровня мРНК гена раннего ответа согласовался с выявленным иммуногистохимически повышением числа клеток, экспрессирующих белок c-Fos в префронтальной коре в базальном состоянии и ослаблением его ответа на стресс в результате введения животным этого антагониста NMDA рецепторов. Такой эффект кетамина наблюдался как для всей популяции клеток префронтальной коры, так и для глутаматергических нейронов этого отдела мозга, маркированных транскрипционным фактором SATB2. Между эффектами кетамина и оптогенетической активации глутаматергических нейронов CA1 области дорзального гиппокампа наблюдается согласованность. Действительно, кетамин повышал базальный уровень экспрессии c-Fos во фронтальной коре и, тем самым, резко снижал его активацию при стрессе вплоть до полного ее отсутствия, что сопровождалось снижением проявлений депрессивно-подобного поведения. Напротив, опто-активация CA1 нейронов непосредственно во время теста повышала экспрессию c-Fos, иными словами стимулировала ответ этого гена на стресс, в префронтальной коре, которая оставалась повышенной и после теста, что ассоциировалось с депрессивно-подобным поведением животных. В целом, результаты свидетельствуют, что нейроны префронтальной коры вовлекаются в продепрессантный эффект оптогенетической стимуляции глутаматергических нейронов CA1 области дорзального гиппокампа и антидепрессантное действие кетамина. Следовательно, ключевой структурой, вовлеченной в поведенческий эффект оптогенетической стимуляции CA1 области дорзального гиппокампа, очевидно является префронтальная кора и, в частности, глутаматергические нейроны этого отдела мозга.

*Работа поддержана грантами РФФИ 14-15-00115-П и РФФИ 17-04-00587.*

## РЕЖИМЫ СВЕТОВОЙ СТИМУЛЯЦИИ НЕЙРОНОВ В КУЛЬТУРЕ

Ерофеев А.И.<sup>1</sup>, Безпрозванныи И.Б.<sup>1,2</sup>, Власова О.Л.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория молекулярной нейродегенерации Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (СПбПУ), г. Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>Отделение физиологии Юго-Западного медицинского центра Университета Техаса, Даллас, Техас, США

E-mail: alexandr.erofeev@gmail.com

Головной мозг состоит из различных типов нейронов, формирующих нейронные связи и паттерны. Возрастное нарушение взаимосвязей между нейронами на разных уровнях организации может приводить к возникновению нейродегенеративных заболеваний. Лечение нейродегенеративных заболеваний с каждым годом совершенствуется, при этом, в связи с большими успехами современной медицины процент пожилого населения неуклонно возрастает. Поэтому нейродегенеративные заболевания становятся актуальной проблемой современного общества. На передний план выходят задачи по поиску причин, механизмов и возможных путей восстановления нарушенных нейронных паттернов. Основной проблемой стимуляции нейронов, приводящей к восстановлению утраченных связей, является трудность параллельного стимулирования определенной группы нейронов. Однако эту проблему удалось разрешить, когда появились методы оптической стимуляции (оптогенетика). Оптогенетика привлекает в последнее время пристальное внимание из-за таких преимуществ по сравнению с обычными методами стимуляции, как: высокое пространственное и временное разрешение, параллельная стимуляция конкретных участков головного мозга [1, 2]. Главная идея этого метода - использование светочувствительных ионных каналов, названных опсинами. Наиболее часто используемый из семейства опсинов - каналродопсин-2 (ChR2) и его химеры. Этот светочувствительный белок выделен из глазного пятна зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Активация каналродопсина-2 происходит при возбуждении синим светом с длиной волны 470 нм, что в свою очередь вызывает мгновенные фоторецепторные токи из-за неселективного прохождения в цитоплазму клетки катионов [3, 4]. В 2005 году была продемонстрирована быстрая фотостимуляция генетически модифицированных нейронов, содержащих ChR2 [5]. Так как активация нейронов существенно зависит от параметров светового возбуждения, важной задачей и становится количественное определение этих параметров и поиск зависимостей между световым потоком и нейрональной активностью.

Целью работы явилась количественная оценка светиндуцированных мембранных токов у нейронов гиппокампа при разных параметрах светового возбуждения.

Работа проведена на культуре нейронов гиппокампа выделенных из линии мышей Рапполово. Рост культуры осуществлялся в инкубаторе с 5% содержанием CO<sub>2</sub> при температуре +37 °C в 24-луночной планшете на стеклах диаметром 12 мм. Для экспрессии опсинов в нейронах использовали плазмиду FCK-ChR2-GFP (Addgene plasmids 15814), кодирующую каналродопсин-2. Доставка плазмиды в клетку проводилась методом кальций-фосфатной трансфекции. Процедура проводилась на седьмой день после получения первичной культуры при помощи набора (Clontech Laboratories Inc., #631312,) по протоколу производителя с рекомендациями, согласно статье [6]. Запись активности нейронов в культуре осуществлялась методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации целая клетка (whole-cell). Для проведения экспериментов использовался омывающий раствор искусственной спинномозговой жидкости (ACSF) следующего состава: (124 mM) NaCl, (26 mM) NaHCO<sub>3</sub>, (10 mM) glucose, (5 mM) KCl, (2.5 mM) CaCl<sub>2</sub>, (1.3 mM) MgCl<sub>2</sub>, (1 mM) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Для записи использовались стеклянные микроэлектроды с сопротивлением 3-5 МОм заполненные следующим раствором: K-Gluconate (140 mM), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), NaCl (2 mM), ATP-Na<sub>2</sub> (2 mM), GTP-Mg (0.3 mM), HEPES (10 mM). Световая стимуляция осуществлялась с помощью синего светодиода, встроенного в микроскоп.

По полученным результатам построены зависимости амплитуды ответного тока нейронов гиппокампа от частоты и длительности световой стимуляции (ChR2) при разных интенсивностях. Выявлены границы оптимальных параметров светового воздействия.

Для определения параметров светового воздействия были проведены эксперименты по влиянию интенсивности воздействующего света, частоты следования и длительности импульсов. В первой серии экспериментов оценивалось влияние длительности светового импульса (1- 5мс, 10-50мс, 100-500мс) на амплитуду мембранного тока. Кривая зависимости имела характерный колоколообразный вид. На длительностях от 1мс до 20мс был замечен рост амплитуды мембранного тока, однако, начиная с 30мс до 500мс происходило падение амплитуды, что, возможно, связано с потерей чувствительности каналродопсина-2 к фотонам при больших дозах облучения.

Во второй серии экспериментов оценивалось изменение амплитуды мембранного тока при различных интенсивностях. В качестве длительности светового импульса выбрано значение, при котором амплитуда тока была максимальной, т.е. 20мс. Полученные данные демонстрировали линейную зависимость между изменением амплитуды ионного тока и интенсивностью светового воздействия.

В третьей серии оценивалось влияние частоты светового воздействия на количество ответных потенциалов действия (ПД), измерения проводились в режиме фиксации тока (current-clamp) конфигурации целая клетка (whole-cell). С повышением частоты воздействия количество генерируемых потенциалов стремительно падает.

Таким образом, в результате проведенных исследований определен оптимальный интервал длительностей светового импульса - 10-30 мс, при котором амплитуда ответного тока является максимальной. Показано, что зависимость амплитуды мембранного тока от интенсивности света является линейной, а оптимальная частота следования импульсов должна быть не более 5Hz. Полученные результаты позволят в дальнейшем подобрать необходимые условия для проведения исследований, в том числе для выявления патологии в активности нейронов у мышей в норме и с нейродегенеративными заболеваниями.

*Работа поддержана грантом Российского научного фонда. № 14-25-00024-П.*

### Литература

- 1) Callaway, E.M., Yuste, R., 2002. Stimulating neurons with light. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 587-592.
- 2) Miesenbock, G., 2004. Genetic methods for illuminating the function of neural circuits. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 395-402.
- 3) Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A.M., Bamberg, E., Hegemann, P., 2002. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296, 2395-2398.
- 4) Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., Bamberg, E., 2003. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13940-13945.
- 5) Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., Deisseroth, K., 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263-1268.
- 6) Jiang M., Chen G. High Ca<sup>2+</sup>-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. *Nature Protocols.* 2006. 1(2):695-700.



## СУБКЛЕТОЧНОЕ ТАРГЕТИРОВАНИЕ ОПСИНОВ В ОПТОГЕНЕТИКЕ

Мальшев А.Ю.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва, Россия

E-mail: malyshev.ihna@gmail.com

В подавляющем большинстве оптогенетических экспериментов используется нетаргетированная экспрессия светоактивируемых белков, при которой эти белки равномерно распределяются по всей поверхности нейрона, включая тело клетки, дендриты и аксоны. Как правило, подобный подход работает хорошо, однако существует ряд случаев, когда нетаргетированная экспрессия может накладывать существенные ограничения на возможности светового управления активностью нейронов и приводить зачастую к непредсказуемым последствиям. Так, например, как мы недавно продемонстрировали, нетаргетированная экспрессия хлорного родопсина GtACR2 приводит к тому, что световая стимуляция нейронов, экспрессирующих этот светоактивируемый белок, помимо торможения нейронов может также вызывать в них генерацию потенциалов действия (Malyshev et al., 2017). Мы обнаружили, что генерация потенциалов действия происходит только при световой стимуляции аксонных терминалей нейрона. Происходит это по-видимому вследствие высокой концентрации ионов хлора, поддерживаемой локально в аксонных терминалях, что приводит к тому, что открытие светоактивируемого хлорного канала в этих компартментах вызывает не вход ионов хлора внутрь клетки, как это происходит в соме и в дендритах, а выход хлора наружу, что ведет к деполяризации мембраны и локальной генерации потенциалов действия, которые затем ретроградно распространяются по направлению к соме.

Другим подходом, также проигрывающим от нетаргетированной экспрессии светоактивируемого белка, является оптогенетическое картирование нейронных сетей. При использовании данной методики в сети пресинаптических нейронов (например, пирамидных нейронов 2/3 слоя коры) экспрессируется каналородопсин2. Экспрессия может осуществляться как методом *in utero* электропорации, так и при помощи вирусной трансдукции. После этого на срезах мозга постсинаптический нейрон (в данном случае пирамидный нейрон 5го слоя) регистрируется внутриклеточно; при этом осуществляется световая стимуляция области пресинаптических нейронов небольшими по размеру (порядка 30мкм) короткими (1-2 мс) световыми стимулами в случайном порядке таким образом, чтобы по окончании стимуляции все поле пресинаптических нейронов было простимулировано. В результате на световой стимул, при условии нахождения в этом месте пресинаптического нейрона, экспрессирующего каналородопсин2 (CHR2), в постсинаптической клетке будет регистрироваться ВПСП. В результате такой стимуляции можно получить карту сети пресинаптических нейронов (Симонова и др., 2017). Однако равномерная экспрессия каналородопсина2 по всей поверхности нейрона приводит к тому, что один пресинаптический нейрон может стимулироваться в нескольких разных местах, в результате чего один оптический стимул может вызывать суммарный ВПСП от двух или более соседних клеток. Для исправления данной ситуации в литературе было предложено использовать фьюжн того или иного опсина с фрагментом калиевого канала Kv2.1. В норме данный канал экспрессируется преимущественно в соме и проксимальных дендритах нейрона. Было показано, что использование фьюза светоактивируемого белка с фрагментом молекулы Kv2.1. также приводит к таргетированию всей конструкции в мембрану тела клетки и проксимальных дендритов. Так, например, использование фьюза Kv2.1. с хлорным светоактивируемым каналом GtACR2 приводит к резкому снижению светоактивируемой генерации потенциалов действия в аксонных терминалях, а также к значительному улучшению встраивания GtACR2 в мембрану нейрона (Mahn et al., 2017). Использование химерного белка Kv2.1-CHR2 позволяет значительно улучшить пространственное разрешение при оптогенетическом картировании сетей пресинап-

тических нейронов (Baker et al., 2016).

Другой областью применения субклеточного таргетирования опсинов является оптогенетическое протезирование дегенеративной сетчатки, а именно подход, при котором проводится воссоздание рецептивного поля ганглиозного нейрона путем экспрессии возбуждающего и тормозного опсинов в центральном и периферическом отделах клетки соответственно. Для соматической локализации опсина здесь также успешно используется мотив Kv2.1. Однако попытки обеспечить периферическое таргетирование светоактивируемого белка сталкиваются с определенными трудностями. Внимательный анализ опубликованных данных показывает, что большинство испытанных мотивов для периферической (дендритной) локализации опсинов не элиминируют соматическую локализацию опсина, но обеспечивают лишь частичное увеличение его количество в дендритах (Greenberg et al., 2011; Wu et al., 2013). В связи с этим для воссоздания рецептивного поля ганглиозной клетки в одном из направлений нашей работы мы решили отказаться от периферического таргетирования тормозного опсина и применить несколько иную стратегию. Наш подход заключается в том, чтобы воссоздать возбуждающий ON-центр рецептивного поля путем таргетирования каналородопсина2 в центральную область ганглиозной клетки при помощи мотива Kv2.1, а тормозный мотив экспрессировать безтаргетно с низким, но строго контролируемым уровнем экспрессии. Для точного контроля уровня экспрессии тормозного опсина относительно возбуждающего гены обоих светоактивируемых белков были помещены в одну генетическую конструкцию, с использованием в качестве разделителя участка внутренней посадки рибосомы (IRES) вируса энцефаломиокардита. Предварительно мы показали, что IRES дикого типа снижает эффективность экспрессии второго гена в нейронах млекопитающих на 40% (Петровская и др., 2017). Кроме того, из литературы известна библиотека мутантных IRES последовательностей, при использовании которой можно обеспечить снижение эффективности экспрессии второго гена в бицистронной матрице в практически любое количество раз, зная эффект IRES дикого типа в данном типе клеток (Koh et al, 2013). Испытав несколько разных мутантов IRES, мы выбрали такой вариант вставки, при использовании которого световая стимуляция тела клетки, экспрессирующей конструкцию вида CHR2-Kv2.1-IRES-GtACR2, вызывает ее возбуждение, в то время как световая стимуляция периферии нейрона приводит к его торможению.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-15-00291.*

#### Литература

- 1) Петровская Л.Е., Штефанюк В.С., Балабан П.М., Островский М.А., Малышев А.Ю. Изучение влияния участка внутренней посадки рибосомы (IRES) вируса энцефаломиокардита на экспрессию второго гена в бицистронной матрице в нейронах первичной культуры гиппокампа. *Нейрохимия*, 2017, Т34, №4, С. 275--280
- 2) Симонова Н.А., Баль Н.В., Балабан П.М., Волгушев М.А., Малышев А.Ю. Оптогенетический подход к изучению механизмов гетеросинаптической пластичности в нейронах неокортекса. *Журн. высш. нервн. деят.* 2017. Т67. №5. С. 75-85.
- 3) Baker C.A., Elyada Y.M., Parra A., Bolton M.M. Cellular resolution circuit mapping with temporal-focused excitation of soma-targeted channelrhodopsin. *Elife*. 2016 Aug 15;5. pii: e14193.
- 4) Greenberg K.P., Pham A., Werblin F.S. Differential targeting of optical neuromodulators to ganglion cell soma and dendrites allows dynamic control of center-surround antagonism. *Neuron*. 2011 V.69:713--720.
- 5) Koh E.Y., Ho S.C., Mariati, Song Z., Bi X., Bardor M., Yang Y. An internal ribosome entry site (IRES) mutant library for tuning expression level of multiple genes in mammalian cells. *PLoS One*. 2013 Dec 9; V8(12):e82100.

- 6) Mahn M., Gibor L., Cohen-Kashi Malina K., Patil P., Printz Y., Oring S., Levy R., Lampl I., Yizhar O. High-efficiency optogenetic silencing with soma-targeted anion-conducting channelrhodopsins. bioRxiv 2017 225847.
- 7) Malyshev A.Y., Roshchin M.V., Smirnova G.R., Dolgikh D.A., Balaban P.M., Ostrovsky M.A. Chloride conducting light activated channel GtACR2 can produce both cessation of firing and generation of action potentials in cortical neurons in response to light. *Neurosci Lett.* 2017 Feb 15; V.640:76-80.
- 8) Wu C., Ivanova E., Zhang Y., Pan Z.H. rAAV-mediated subcellular targeting of optogenetic tools in retinal ganglion cells in vivo. *PLoS One.* 2013 V.8. P.e66332.

## НЕЙРОИМПЛАНТАТ С АДАПТИВНОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗЬЮ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Матвеев М.В.<sup>1</sup>, Власова О.Л.<sup>1,2</sup>, Безпрозванный И.Б.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Кафедра медицинской физики Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого

<sup>2</sup>Лаборатория молекулярной нейродегенерации Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Отделение физиологии юго-западного медицинского центра Техасского университета, Даллас, США

E-mail: m.v.matveev@bk.ru

Исследование нашей рабочей группы направлено на выявление особенностей электрической активности нейронов трансгенных животных - моделей нейродегенеративных заболеваний с использованием, в том числе, имплантируемых систем и приемов межклеточной регистрации генерируемых потенциалов [1,2]. Ориентируясь на перспективы внедрения оптогенетических подходов в исследование проблем и, в дальнейшем, на разработку технологий лечения нейродегенеративных заболеваний, в качестве альтернативы глубокой электростимуляции мозга (Deep Brain Stimulation), деструктивным операциям и медикаментозному лечению, одним из основополагающих параметров в работе мы рассматривали стабильный нейрональный ответ клеток на оптическую стимуляцию.

Изучив конструктивное исполнение получивших широкое практическое распространение за рубежом нейро- и кардиостимуляторов с вживляемым электродом, наш исследовательский коллектив поставил перед собой цель разработать оптогенетическую имплантируемую систему с автоматической подстройкой стимулирующего оптического воздействия.

В работе тестируется алгоритм стимуляции и регистрации нейронального ответа с возможностью подстройки командных сигналов оптического источника и, опционально, системы введения фармакологических препаратов. Принципиальная схема комплекса была подробно представлена в работе [3].

В онлайн-режиме сигнал нейрональной активности регистрируется, обрабатывается и сравнивается с заданным калибрующим сигналом. Калибровка сигнала задается оператором, для этого вводятся рабочие диапазоны: интенсивность воздействия, частота следования импульсов, длительность межимпульсных интервалов. После сравнения программа формирует управляющий сигнал, меняющий один из выбранных параметров светодиода (частоту, интенсивность светового излучения), а в случае генетической модификации нейронов одновременно с помощью различных опсинов, еще и переключение комбинированного световода на одну из необходимых рабочих длин волн. В случае вхождения нейронального ответа в установленный диапазон подстройка не производится.

Дальнейшей перспективой развития аппаратной части разрабатываемой опто-электродной системы является использование беспроводной связи управляющего, стимулирующего и регистрирующего модулей, адресная доставка света и минимизация опто-электродных артефактов.

*Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-25-00024-П.*

### Литература

- 1) Erofeev A. I., Zakharova O.A., Matveev M.V. Terekhin S.G., Bezprozvanny I. B., Vlasova O. L. Use of optogenetic technology in cell culture models. Journal of Physics: Conference Series. 2016. 741(1).
- 2) Матвеев М.В., Ерофеев А.И., Терехин С.Г., Плотникова П.В., Воробьев К.В., Власова О.Л. Имплантируемые устройства для оптогенетических исследований и стимуляции возбу-

димых тканей. Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2015. 3(225): 75-85.

- 3) Матвеев М.В., Ерофеев А.И., Пятышев Е.Н., Акульшин Ю.Д., Безprozванный И.Б., Власова О.Л. Опто-электродная система нейростимуляции с адаптивной обратной связью. Журн. Высш. нервн. деят. Им. И.П.Павлова, 2017. 5 (67): 86--93

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДЕЛЬНОГО БИОПЕЙСМЕКЕРА, ПОЛУЧЕННОГО ИМПЛАНТАЦИЕЙ СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК HL-1 В ПЕРВИЧНУЮ КУЛЬТУРУ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ**

**Низамиева А.А.**

*Московский физико-технический институт, г. Москва, Россия.*

*E-mail: aygulnizamieva@gmail.com*

Болезни сердечно-сосудистой системы являются постоянным лидером причин смертности в развитых странах. В связи с этим, актуальной задачей является совершенствование методов терапии, а также выявление механизмов возникновения патологий ССС. Например, уже на протяжении более 50 лет при терапии брадикардий золотым стандартом является электрокардиостимуляция, однако этот метод имеет некоторые недостатки. Среди ограничений этого метода можно выделить постоянную потребность в мониторинге системы, возможность инфицирования кардиостимулятора, неприспособленность к возрастным изменениям (в том числе к росту) и пр. В связи с этим, ученые и медики всего мира бьются над созданием биологического пейсмейкера, который подразумевает пожизненную стимуляцию сердца. Но в процессе работы над подобным биологическим устройством возникает ряд проблем, связанных с критическими условиями и определением эффективности пейсмейкерной активности. Также остается открытым вопрос о возможности неинвазивной оптической стимуляции сердечных клеток и эффективности оптогенетического подхода при создании биопейсмейкера.

Данное исследование направлено на определение условий возможного существования и эффективности биологического пейсмейкера, способного к возбуждению путем оптической стимуляции. Работа проводится на монослое культуры неонатальных крысиных кардиомиоцитов, выступающих в качестве модели сердечной ткани. Для моделирования пейсмейкера производится сокультурирование фотовозбудимой клеточной линией HL-1. Сокультурирование неонатальной культуры и HL-1 дает полноценную модель для изучения функциональной активности и возможностей биологического пейсмейкера непосредственно в соединении с сердечной тканью. Светочувствительность и световозбудимость достигается путем модификации генома и встраивания канального родопсина - белка, реагирующего возбуждением на световое раздражение. В ходе исследования подбираются оптимальные условия сокультурирования и выявляются параметры, при которых возможна стимуляция модельного монослоя посредством оптического возбуждения. Подобное исследование приблизит создание принципиально новой концепции терапии аритмий.

## МИКРОБНЫЕ РОДОПСИНЫ И ОПТОГЕНЕТИКА

Петровская Л.Е.<sup>1,2</sup>, Некрасова О.В.<sup>1,3</sup>, Долгих Д.А.<sup>1,2,3</sup>, Кирпичников М.П.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,

<sup>3</sup>Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия  
E-mail: lpetr65@yahoo.com

Ретинальные белки, осуществляющие светозависимый транспорт ионов, сенсорные и другие функции, широко распространены среди различных микроорганизмов. Наиболее хорошо изученным ретинальным белком является бактериородопсин *Halobacterium salinarum* (BR). Актуальность изучения BR, сочетающего свойства фотохромизма и трансмембранного переноса протонов, связана с возможностью его использования в био-оптоэлектронике (оптические носители памяти, сверхбыстрые детекторы света, фотохромные полимеры), энергетике (нанокompозитные полупроводниковые материалы), в оптогенетике (регуляция электрической активности клетки). Нами был разработан высокоэффективный биоинженерный способ продукции BR, основанный на супер-экспрессии рекомбинантного белка в *E. coli* и оптимизированной процедуре его выделения, очистки и ренатурации. Изучение физико-химических свойств и фотохимических превращений рекомбинантного BR подтвердило применимость этого белка для решения исследовательских и прикладных задач [1].

Нами впервые исследован ретинальный белок психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (ESR), уникальной чертой которого является наличие остатка лизина в положении, соответствующем донору протонов (функцию которого в большинстве микробных родопсинов выполняют Asp или Glu). Изучение мутантных вариантов ESR, содержащих замены этого остатка, продемонстрировало, что лизин обеспечивает быструю доставку протонов к основанию Шиффа. Поглощение протонов на цитоплазматической поверхности белка предшествует репротонированию основания Шиффа, позволяя предположить, что Lys96, незаряженный в исходном состоянии, приобретает протон в течение короткого промежутка времени после образования интермедиата M [2]. Выделение H<sup>+</sup> происходит в конце цикла с участием акцептора протонов Asp85 и, вероятно, взаимодействующего с ним остатка His57 [3].

Благодаря простоте структуры и быстрой кинетике, микробные родопсины могут быть использованы в качестве инструментов локального оптического контроля над разнообразными клеточными процессами. Развитие этого направления за последнее десятилетие привело к разработке технологий оптогенетики. Электрическая активность клеток может быть инициирована благодаря экспрессии деполаризующих мембрану катионных канальных родопсинов, например, ChR2, а ее ингибирование - за счет гиперполяризующих анионных канальных родопсинов, недавно обнаруженных у криптофитовых водорослей. С целью восстановления зрительного ответа в поврежденных клетках сетчатки нами ведется разработка комплексной технологии экспрессии микробных родопсинов, сочетающей регуляцию уровня синтеза, клеточной локализации и спектральных характеристик используемых белков.

Работа проводится при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-00-00165 комфи, программы РАН <<Молекулярная и клеточная биология>>, а также в рамках Государственного задания ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

### Литература

- 1) Smitienko OA, Nekrasova OV, Kudriavtsev AV, Yakovleva MA, Shelaev IV, Gostev FE, Dolgikh DA, Kolchugina IB, Nadtochenko VA, Kirpichnikov MP, Feldman TB, Ostrovsky MA. Biochemistry (Mosc), 2017, 82, 490-500.

- 2) Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Imasheva E.S., Lukashev E.P., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. J. Biol. Chem., 2013, 288, 21254-21265.
- 3) Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Imasheva E.S., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. Biochemistry, 2012, 51, 5748-5762.



## ВЛИЯНИЕ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ ТНУ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ ОБЛАСТИ СА1 ГИППОКАМПА НА НЕЙРОНАЛЬНУЮ ЭКСПРЕССИЮ РАННИХ ГЕНОВ И ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ

Писклова М.В.<sup>1</sup>, Ивашкина О.И.<sup>2,3</sup>, Анохин К.В.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ <<НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина>>,

<sup>2</sup>НИЦ <<Курчатовский институт>>,

<sup>3</sup>МГУ имени М.В.Ломоносова, г. Москва, Россия

E-mail: pisklova\_maria@mail.ru

### Введение:

В последние годы на стыке физики и молекулярной генетики, появились принципиально новые инструменты для решения задач адресной стимуляции активности нервной системы: оптогенетика, магнетогенетика, термогенетика (Bernstein et al., 2016; Rajasethupathy et al., 2016; Pama et al., 2013). Совместное использование таких подходов с технологиями создания трансгенных животных позволяет решать уникальные биомедицинские проблемы, в том числе, касающиеся клеточных и сетевых механизмов формирования и поддержания долговременной памяти.

Считается, что материальной основой памяти, то есть энграммой, - служит распределенная популяция нейронов в мозге с сохраняющимися морфологическими и/или биохимическими изменениями, вызванными получением новой информации (Poo et al., 2016). Известно, что клеточный состав энграммы меняется со временем, при этом также изменяется роль различных структур в хранении и извлечении содержащейся в энграмме информации. Точные механизмы таких изменений до сих пор не установлены, но считается, что в первоначальное хранение памяти вовлечены различные области гиппокампа (Nadel et al., 2007). При извлечении этой информации нейроны энграммы активируются, что сопровождается индукцией экспрессии немедленных ранних генов, в частности гена *c-fos* (Kawashima et al., 2014). В последнее время были получены данные, демонстрирующие возможность вызвать определенное поведение путем оптогенетической активации нейронов одного из участков энграммы (Liu et al., 2012; Cowansage et al., 2014). Однако при этом остается неизвестным, что происходит с энграммой при ее искусственной стимуляции: возможно ли активировать всю энграмму стимуляцией отдельного ее участка, например, гиппокампа?

На первом этапе такого исследования нашей было необходимо проверить, приводит ли оптогенетическая стимуляция участка гиппокампа к системным сдвигам в активности распределенных нейронных сетей гиппокампа и коры больших полушарий головного мозга и изменениям в поведении животных.

**Цель** настоящей работы состояла в оценке эффектов оптогенетической стимуляции нейронов СА1 области гиппокампа мышей линии Thy1-ChR2 на поведение животных в стандартных поведенческих тестах и экспрессию немедленного раннего гена *c-fos* в гиппокампе и различных областях неокортекса.

### Материалы и методы:

Для проведения оптогенетической стимуляции нейронов области СА1 гиппокампа мышам линии B6.Cg-Tg(Thy1-COP4/EYFP)18Gfng (Thy1-ChR2) вживляли оптоволокно по заранее выбранным координатам согласно стереотаксическому атласу мозга мышей (Paxinos, Franklin, 2007). Для стимуляции использовали стабилизированный лазерный источник Nd:YAG, генерирующий излучение на длине волны 473 нм.

Для оценки влияния оптогенетической стимуляции гиппокампа на спонтанное поведение животных проводили тесты <<открытое поле>>, <<приподнятый крестообразный лабиринт>>, <<ротарод>>. Для этого мышей с имплантированным оптоволокном помещали в одну из арен,

регистрируя поведение без оптической стимуляции, после чего начинали оптическую стимуляцию. В дальнейшем проводили сопоставление поведения животных во время оптической стимуляции и при ее отсутствии.

Для анализа экспрессии немедленного раннего гена *c-fos* оптическую стимуляцию области CA1 проводили унилатерально. Для этого проводили иммуногистохимическое окрашивание на белок c-Fos, после чего с помощью конфокального микроскопа получали микрофотографии окрашенных срезов. В программе Image-Pro Plus 6.0. производили подсчет количества c-Fos-положительных клеток в структурах, а также площади структуры на каждом срезе в пяти областях коры больших полушарий: ретроспленциальной гранулярной коре (RSG), ретроспленциальной дисгранулярной коре (RSD), медиальной париетальной ассоциативной коре (MPtA), латеральной париетальной ассоциативной коре (LPtA) и бочонковых полях соматосенсорной коры (S1BF), и в двух областях гиппокампа: CA1 и CA3. Для оценки эффективности активации нейронов сопоставляли плотность c-Fos-положительных клеток в структуре в стимулированном полушарии и в нестимулированном полушарии.

Статистический анализ проводили в программном пакете GraphPad Prism v. 6.0. с использованием критерия знаковых рангов Вилкоксона, а также t-критерия для связанных выборок.

### **Результаты и их обсуждения:**

В тесте <<открытое поле>> такие показатели поведения мышей, как общий пройденный путь ( $p=0.625$ ), количество выходов в центральную зону ( $p=0.875$ ), количество стоек без опоры ( $p=0.75$ ), количество принюхиваний к стенкам ( $p=0.625$ ) статистически значимо не отличались от таковых в отсутствие стимуляции. (Рис. 1). Таким образом, оптогенетическая активация нейронов области CA1 гиппокампа не приводила к изменению исследовательского поведения у мышей.

В тесте <<приподнятый крестообразный лабиринт>> фотостимуляция области CA1 не приводила к изменению количества заходов в открытые рукава ( $p=0.8125$ ) и актов замирания ( $p=0.6875$ ) (Рис. 2). Таким образом, мы продемонстрировали, что оптогенетическая стимуляция Thy1-положительных пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа у необученных специфической задаче животных не оказывает влияние на тревожность животных.

В тесте <<ротарод>> при оптогенетической стимуляции области CA1 латентный период падения мышей с вращающегося стержня не изменялся ( $p>0.9999$ ) (Рис. 3). Таким образом, нами было показано, что стимуляция CA1 не влияет на моторную координацию животных в данной модели.

При анализе полученных микрофотографий было обнаружено, что фотостимуляция области CA1 приводит к статистически значимому увеличению плотности c-Fos-положительных клеток в ряде структур стимулированного полушария (Рис. 4) по сравнению с нестимулированным (RSG:  $p<0,0001$ ; RSD:  $p=0,0017$ ; MPtA:  $p=0,0018$ ; LPtA:  $p=0,0043$ ; S1BF:  $p=0,0016$ ; CA1:  $p=0,0095$ ; CA3:  $p=0,0406$ ). Интересно, что данное наблюдение преимущественно касается ипсилатерального полушария. Природа такого события является предметом дискуссии. Можно предположить, что это связано с активацией клеток-мишеней на низком, физиологическом, а не когнитивном уровне, основанном на имеющихся связях нейронов области CA1 с другими структурами в мозге (дисгранулярная ретроспленциальная кора, бочонковые поля соматосенсорной коры, область CA3) (Allen brain atlas, 2018; Shetty, 2002; Rolls, 2015). Любопытно, что увеличение количества активированных нейронов наблюдалось и в париетальной коре, так как эта область неокортекса имеет входящие в CA1 связи, но аксонов из CA1 в париетальную кору нет (Rockland, Van Hoesen, 1999; Cabeza et al., 2008).

### **Выводы:**

В данной работе мы показали, что оптическая стимуляция Thy-положительных нейронов области CA1 гиппокампа не влияет на исследовательское поведение, тревожность и моторную координацию мышей. При этом в ответ на стимуляцию данной области наблюдается значительное

увеличение количества активированных нейронов в различных областях коры и гиппокампе. Наблюдаемая активация нейронов в ответ на оптическую стимуляцию вместе с отсутствием эффектов на спонтанное поведение животных предоставляет возможность для проведения дальнейших исследований, связанных с модуляцией нейрональной активности в мозге у животных, подвергшихся обучению.

*Работа поддержана грантами: РФФ №14-15-00685, РФФИ № 17-00-00215.*

### Литература

- 1) Rajasethupathy P., Ferenczi E., Deisseroth K. Targeting neural circuits //Cell. -- 2016. -- Т. 165. -- №. 3. -- С. 524-534.
- 2) Bernstein J. G., Garrity P. A., Boyden E. S. Optogenetics and thermogenetics: technologies for controlling the activity of targeted cells within intact neural circuits //Current opinion in neurobiology. -- 2012. -- Т. 22. -- №. 1. -- С. 61-71.
- 3) Pama E. A., Colzato L. S., Hommel B. Optogenetics as a neuromodulation tool in cognitive neuroscience //Frontiers in psychology. -- 2013. -- Т. 4. -- С. 610.
- 4) Poo M. et al. What is memory? The present state of the engram //BMC biology. -- 2016. -- Т. 14. -- №. 1. -- С. 40.
- 5) Nadel L. et al. Systems consolidation and hippocampus: two views //Debates in Neuroscience. -- 2007. -- Т. 1. -- №. 2-4. -- С. 55-66.
- 6) Kawashima T., Okuno H., Bito H. A new era for functional labeling of neurons: activity-dependent promoters have come of age //Frontiers in neural circuits. -- 2014. -- Т. 8. -- С. 37.
- 7) Liu X. et al. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall //Nature. -- 2012. -- Т. 484. -- №. 7394. -- С. 381.
- 8) Cowansage K. K. et al. Direct reactivation of a coherent neocortical memory of context //Neuron. -- 2014. -- Т. 84. -- №. 2. -- С. 432-441.
- 9) Paxinos G., Franklin K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. -- Gulf professional publishing, 2007
- 10) Shetty A. K. Entorhinal axons exhibit sprouting in CA1 subfield of the adult hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy //Hippocampus. -- 2002. -- Т. 12. -- №. 4. -- С. 534-542.
- 11) Atlas D. M. B. Allen brain atlas. -- 2018.
- 12) Rolls E. T. Diluted connectivity in pattern association networks facilitates the recall of information from the hippocampus to the neocortex //Progress in brain research. -- Elsevier, 2015. -- Т. 219. -- С. 21-43
- 13) Rockland K. S., Van Hoesen G. W. Some temporal and parietal cortical connections converge in CA1 of the primate hippocampus //Cerebral Cortex. -- 1999. -- Т. 9. -- №. 3. -- С. 232-237.
- 14) Cabeza R. et al. The parietal cortex and episodic memory: an attentional account //Nature Reviews Neuroscience. -- 2008. -- Т. 9. -- №. 8. -- С. 613.

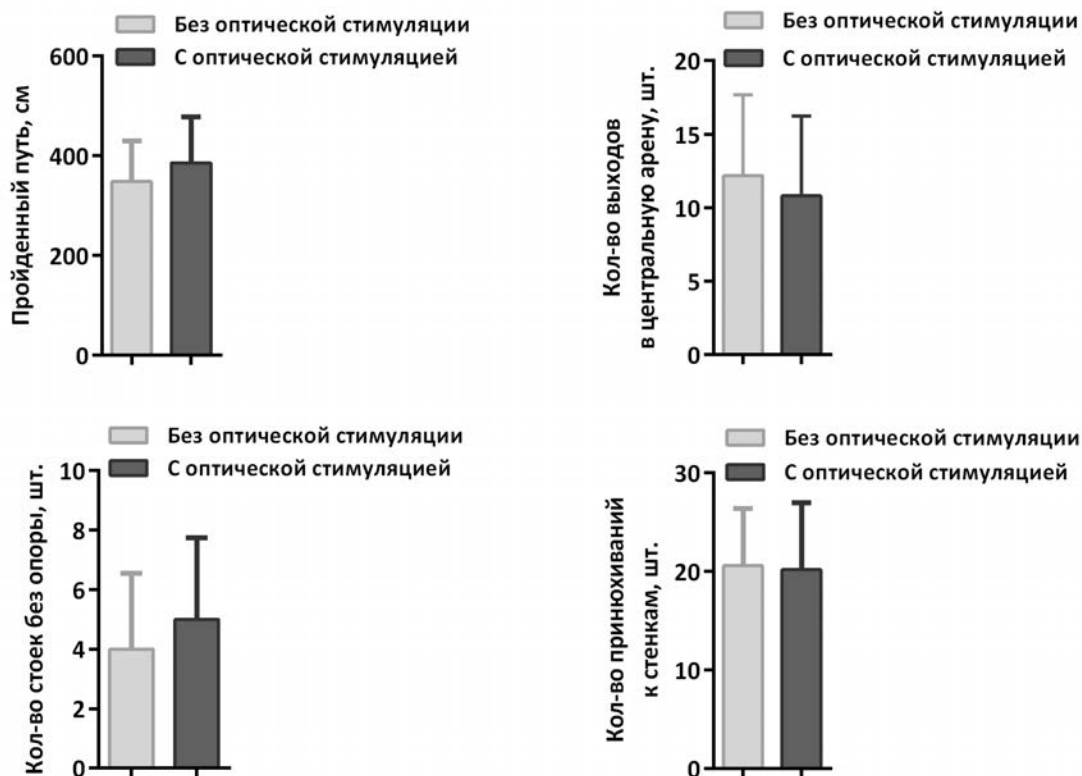


Рис. 1. Эффекты оптической стимуляции нейронов области CA1 Thy1-ChR2 мышей на спонтанное исследовательское поведение в тесте <<открытое поле>>. Данные представлены как среднее значение анализируемого параметра  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

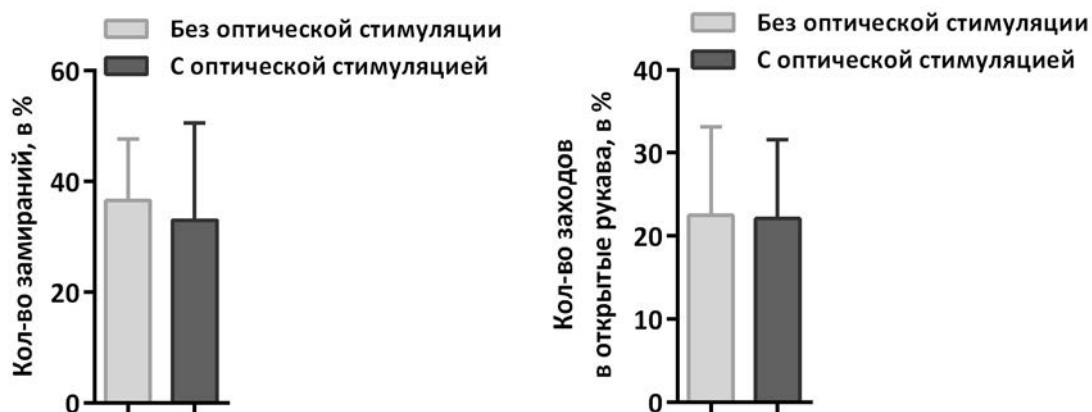


Рис. 2. Эффекты оптической стимуляции нейронов области CA1 Thy1-ChR2 мышей на тревожность в тесте <<приподнятый крестообразный лабиринт>>. Данные представлены как среднее значение анализируемого параметра  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

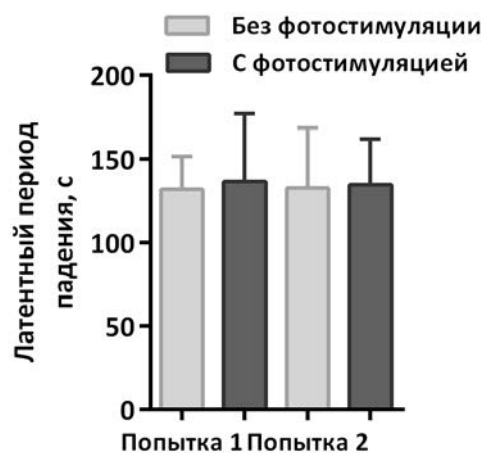


Рис. 3. Эффект оптической стимуляции нейронов области CA1 Thy1-ChR2 мышей на моторную координацию в тесте <<ротарод>>. Данные представлены как среднее значение латентного периода падения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

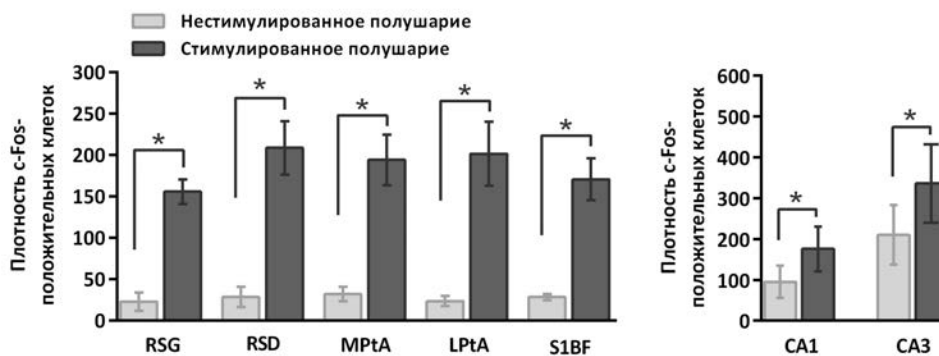


Рис. 4. Эффекты оптической стимуляции нейронов области CA1 Thy1-ChR2 мышей на плотность c-Fos-положительных клеток в различных областях коры и гиппокампа. Данные представлены как средняя плотность c-Fos-положительных клеток  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ ХИМИИ И СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И ОПТОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

Рязанцев М.Н.

Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет РАН, г.

Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [mikhail.n.ryazantsev@gmail.com](mailto:mikhail.n.ryazantsev@gmail.com)

Управление активностью нейронов является важной задачей, имеющее огромное количество применений в нейрофизиологии и в лечении различных нейрофизиологических заболеваний. На сегодняшний день для этого существует два подхода: оптогенетический и фотофармакологический.

В оптогенетическом подходе методами генной инженерии в изучаемые нейроны встраивают белок из семейства бактериальных родопсинов. При освещении нейрона со встроенным белком, последний контролирует поток ионов-нейромедиаторов. Например, освещение канального родопсина, одного из наиболее широко используемых для оптогенетики белков, приводит к возникновению тока ионов натрия внутрь нейрона, что ведет к возбуждению нейрона. Другой оптогенетической задачей является обратная: визуализация нейронного электрического потенциала. В данном подходе электрический сигнал от нейрона контролирует флуоресценцию встроенного бактериального родопсина, и таким образом, по флуоресцентному сигналу можно судить об активности нейрона. Наиболее широко используемым для подобной визуализации является археородопсин-3.

В оптофармакологическом подходе используются органические фотохромные молекулы-переключатели, которые прикрепляются к ионным каналам целевых клеток. В основном состоянии молекулы блокируют ток ионов сквозь канал. При освещении светом, переключатель переходит в другую форму, например, из транс- в цис-, что приводит к разблокировке канала, возникновению потока ионов, деполяризации клетки и возникновению электрического сигнала, идущего в мозг. Затем термически молекулы переключателя возвращаются в основное блокирующее состояние. Данный подход используется, например, для протезирования сетчатки.

Важной задачей обоих подходов является дизайн новых инструментов. В первом случае, это дизайн вариантов бактериальных родопсинов, во втором случае - фотохромных переключателей. Так, важной для оптогенетики задачей является получение белка со спектром поглощения в ИК диапазоне. Это связано с "медицинским спектральным окном" от 700 до 900 нм.

Для изменения свойств белка требуется поменять её аминокислотную последовательность. Для этого на данный момент используются в основном экспериментальные методики, которые требуют больших материальных и временных затрат. Альтернативой является использование вычислительных методов. Для этого требуется возможность *in silico* методами предсказать спектральные свойства белков с достаточной точностью. Подобные расчеты на данный момент осуществимы.

Так, использование методологии квантово-механических расчетов  $SORCI(6,6)+Q/6-31g^*//B3LYP/6-31g^*$  позволило рассчитать максимум поглощения 11-цис и транс-ретинала в газовой фазе с отклонениями от эксперимента 6 и 4 нм соответственно. Использование квантово-механической/молекулярно-механической методологии  $SORCI(6,6)+Q/6-31g^*//B3LYP/6-31g^* : AMBER98$  для расчета максимумов поглощения ретинала в белковой среде позволило не только рассчитать сдвиг спектра поглощения, происходящего в N. Pharaonis халородопсине после присоединения иона хлора, но и объяснить его происхождение. С хорошей точностью были рассчитаны также и максимумы поглощения зрительного бычьего родопсина и его метастабильного состояния bathorhodopsin.

Подобные расчеты требуют использование качественной трехмерной структуры белка. Та-

кая структура не всегда доступна. В таких случаях требуется её предсказать на основании аминокислотной последовательности. Наиболее качественных результатов для решения подобной задачи добиваются при помощи методов сравнительного моделирования, когда структура предсказывается на основании уже имеющейся трехмерной структуры эволюционно схожего белка.

Проведенное нами исследование различных методологий сравнительного моделирования показало, что правильный подбор метода и шаблона позволяет получить структуры с качеством, схожим с качеством кристаллографических структур. Для полученных при помощи данной методологии структур целого ряда зрительных и бактериальных родопсинов, в том числе и перспективного для оптогенетики археородопсина-3, были рассчитаны максимумы полос поглощения, которые также показали хорошее согласие с экспериментом. Это позволило, например, объяснить красный спектральный сдвиг, возникающий в *N. salinarum* халородопсине после присоединения иона хлора. Структура формы без иона была предсказана на основании формы без иона халородопсина из *N. pharaonis*.

Одним из успешных методов, применяющихся для нахождения вариантов белка с измененными свойствами, является направленная эволюция. В данном подходе итеративно создаются поколения "мутантов" белка, затем проводят скрининг этих мутантов, чтобы определить те, у которых заданное свойство наиболее сдвинуто в нужную область. "Наилучшие" варианты служат базой для создания нового поколения. Так, в работе группы Арнольд (Engqvist et al, 2015) были найдены мутанты родопсина из бактерии *Gloebacter violaceus* со спектром, сдвинутым в красную область на 81 нм относительно белка дикого типа. Использование направленной эволюции экспериментально требует больших материальных и временных затрат. Альтернативным подходом является проведение направленной эволюции *in silico*. В нашей работе мы базировались на экспериментальных данных группы Арнольд. Используя то же множество одиночных мутаций, что и в экспериментальной работе, и создавая новые поколения при помощи генетического алгоритма, мы не только нашли наиболее успешные двойные и тройные мутанты, найденные в работе Арнольд, но и более сдвинутые в красную область четверные мутанты. Дальнейшим развитием данного подхода должно быть применение методов машинного обучения.

Методы вычислительной химии также необходимы при молекулярном дизайне новых фотохромных переключателей для оптофармакологии. Так, в зависимости от области применения, необходимы различные спектральные и кинетические свойства подобных молекул. Например, для применений в протезировании сетчатки необходимо, чтобы молекулы а) поглощали свет зрительного диапазона человека; б) имели достаточно быстрое (около 1 мкс) время термического изомеризации из неблокирующей канал цис-формы в транс-форму.

Компьютерное моделирование позволяет изучить механизмы термической изомеризации и определить основные факторы, ответственные за ускорение или замедление этого процесса. При этом важным является правильный выбор используемой квантово-химической методологии. Проведенный нами сравнительный анализ разных методов на модельных соединениях позволил определить наиболее оптимальную (во времени/точности расчетов) методологию. Базирясь на этих методах мы изучили механизм термической изомеризации для ряда фотохромных соединений. Эти расчетные данные находятся в хорошем согласии с экспериментальными данными, полученными нами с использованием спектроскопии высокого временного разрешения.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗАЯКОРИВАЮЩИХ МОТИВОВ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ИЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ОПСИНОВ В ЦЕЛЯХ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОТЕЗИРОВАНИЯ СЕТЧАТКИ

Смирнова Г.Р., Колотова Д.Е., Рошин М.В., Винарская А.Х., Балабан П.М., Малышев А.Ю.

*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва, Россия  
E-mail: tugu@mail.ru*

Одним из многообещающих подходов в генетической терапии пигментного ретинита - заболевания, сопровождающегося гибелью фоторецепторов сетчатки, - является ее оптогенетическое протезирование. Принцип данного подхода состоит в том, что сохранившиеся нейронные элементы сетчатки (биполярные или ганглиозные клетки) искусственно наделяются фоточувствительностью путем гетерологической экспрессии в них бактериальных или эукариотических родопсинов. Однако при этом значительная часть зрительной информации, обработка которой происходит за счет внутрисетчаточных взаимодействий, оказывается утраченной. В связи с этим был предложен подход к оптогенетическому протезированию сетчатки, связанный с воссозданием ON/OFF рецептивного поля ганглиозных клеток путем таргетированной экспрессии возбуждающего светоактивируемого белка в центральной части ганглиозной клетки, а тормозного - в периферической (Greenberg et al., 2011; Wu et al., 2013). Для таргетирования родопсинов в различные части клетки используются мотивы некоторых клеточных белков, имеющих поляризованный паттерн экспрессии. Эти мотивы узнаются транспортными системами клетки и направляются в соответствующие компартменты нейрона. Для центральной локализации опсинов широко используется мотив калиевых каналов Kv2.1. Было показано, что небольшая часть молекулы канала достаточна для обеспечения центрального (сoma и проксимальные дендриты) таргетирования конструкции (Lim et al., 2000). Мы создали экспрессионный вектор вида рCAG-CHR2-Venus-Kv2.1, который был экспрессирован в первичной культуре нейронов гиппокампа методом электропорации в суспензии, а также в пирамидных нейронах коры мозга крыс и мышей посредством *in utero* электропорации. Мы использовали нейроны центральной нервной системы в качестве первого этапа тестирования созданных генетических конструкций, которые в дальнейшем предполагается экспрессировать в ганглиозных нейронах сетчатки мышей линии RD1, являющихся генетической моделью пигментного ретинита. Нейроны в культуре были подвергнуты морфологическому и электрофизиологическому анализу начиная с 14-го дня культивирования, пирамидные нейроны коры анализировались на переживающих срезах мозга на 21-30-й постнатальный день. Анализ распределения флуоресцентного белка Venus показал, что приблизительно 2/3 трансфицированных нейронов (как в культуре, так и на срезах мозга) демонстрируют свечение исключительно в соме и проксимальных отростках нейронов, включая дендриты и аксон. Однако в оставшейся 1/3 трансфицированных клеток флуоресценция прослеживалась на значительном расстоянии от сомы, при этом попадались нейроны, в которых Venus был распределен по всему дендритному дереву клетки. Подобная картина наблюдалась как в культивируемых нейронах гиппокампа, так и в пирамидных нейронах коры, трансфицированных *in utero*. Таким образом, <<правильное>> центральное таргетирование конструкции обеспечивается лишь в приблизительно 2/3 трансфицированных нейронов. Такой результат можно объяснить чрезмерной оверэкспрессией конструкции, обеспечиваемой сильным промотором CAG, а также, возможно, трансфекцией эмбриональных нейронов, которая использовалась во всех наших экспериментах. Оверэкспрессия приводит к <<истощению>> таргетирующей способности Kv2.1, после чего продукт распространяется безадресно по всей поверхности клетки, как это наблюдалось при таргетировании метаболитных глутаматных



рецепторов, экспрессированных в нейронах гиппокампа при помощи дефектных вирусных векторов (Stowell and Craig, 1999). Решение данной проблемы нам видится в использовании более слабых промоторов (таких как CamKII, синапсин) и/или в использовании вирусной трансдукции для экспрессии конструкции в более зрелых нейронах.

Для периферической локализации тормозных светоактивируемых белков в целях воссоздания OFF-компоненты рецептивного поля ганглиозных клеток был предложен целый ряд таргетирующих мотивов, наиболее многообещающими из которых оказались белок постсинаптических уплотнений PSD95 (Greenberg et al., 2011) и мотив молекулы клеточной адгезии, функционирующей в постсинаптической части клетки, - нейролигина (Wu et al., 2013). Однако анализ доступных литературных данных показывает, что предложенные для периферической локализации опсины не элиминируют таргетируемые светоактивируемые белки из сомы, но лишь незначительно увеличивают их содержание в дистальных дендритах нейрона. Поэтому особенно актуальным для оптогенетического воссоздания OFF-компоненты рецептивного поля ганглиозных клеток становится поиск таргетирующего мотива, способного обеспечить значительное снижение экспрессии тормозного опсина в соме и проксимальных дендритах нейрона. В нашей работе мы исследовали возможность использования в качестве такого таргетирующего мотива другого белка, входящего в состав постсинаптического уплотнения, - Homer1. Homer1 является тетрамерным скаффолд белком, принимающим участие в формировании постсинаптической структуры нейронов. Трансфекция культивируемых гиппокампальных нейронов плазмидным вектором pLU-CamKII-Homer1-tdTomato приводила к возникновению флуоресценции в виде ярких точек, очевидно соответствующих шипикам, по всему дендритному дереву клетки (Рис. 1). Особенно ценно, что при умеренном уровне экспрессии конструкции в клетке флуоресценция сомы оставалась на низком уровне. После этого нами были созданы фьюжены Homer1 с каналородопсином2 (в дальнейшем планируется замена CHR2 на хлорный каналальный родопсин GtACR2) вида pCAG-CHR2-Venus-Homer1. Между Venus и Homer1 был помещен серин-глициновый линкер вида GSGGGSGG для уменьшения напряжения между белками. Данная конструкция была экспрессирована в пирамидных нейронах коры мыши методом *in utero* электропорации. Морфологический анализ трансфицированных нейронов показал, что клетки демонстрируют яркую флуоресценцию в соматической области с образованием внутриклеточных светящихся конгломератов. Однако по ходу дендритов нейронов наблюдались яркие флуоресцентные точки, в целом соответствующие расположению дендритных шипиков. Световая стимуляция трансфицированных нейронов на переживающих срезах мозга показала, что общая амплитуда светоиндуцированного тока в нейронах, экспрессирующих CHR2-Venus-Homer1, значительно ниже, чем у контрольных клеток, экспрессирующих нетаргетированный каналородопсин2. Однако при этом амплитуда тока, возникающего при световой стимуляции периферических отделов нейрона, была в два раза выше, чем амплитуда тока, вызванного соматической стимуляцией, в то время как у контрольных нейронов центральный и периферический светоактивируемые токи были близки по амплитуде. Таким образом, в созданной нами конструкции Homer1 обеспечивал перераспределение родопсина из центральной области нейрона на периферию клетки, хотя при этом наблюдалось значительное снижение встраивания каналородопсина2 в мембрану. Мы предполагаем, что решение данной проблемы может быть достигнуто увеличением длины аминокислотного линкера между Homer1 и CHR2.

Таким образом, в нашей работе мы продемонстрировали, что при использовании мотива калиевого канала Kv2.1 возможно нарушение центральной локализации созданных конструкций, по всей видимости, вследствие их оверэкспрессии. Мотив Homer1 является весьма перспективным для обеспечения периферической локализации опсинов в целях воссоздания OFF-компоненты рецептивного поля ганглиозных клеток.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 16-15-00291.*

## Литература

- 1) Greenberg K.P., Pham A., Werblin F.S. Differential targeting of optical neuromodulators to ganglion cell soma and dendrites allows dynamic control of center-surround antagonism. *Neuron*. 2011 V.69:713--720.
- 2) Lim, S. T., Antonucci, D. E., Scannevin, R. H. & Trimmer, J. S., A novel targeting signal for proximal clustering of the Kv2.1 K<sup>+</sup> channel in hippocampal neurons. *Neuron* 25 (2), 385-397 (2000).
- 3) Stowell J.N, Craig A.M Axon/dendrite targeting of metabotropic glutamate receptors by their cytoplasmic carboxy-terminal domains *Neuron*, 22 (1999), pp. 525-536
- 4) Wu C., Ivanova E., Zhang Y., Pan Z.H. rAAV-mediated subcellular targeting of optogenetic tools in retinal ganglion cells in vivo. *PLoS One*. 2013 V.8. P.e66332.

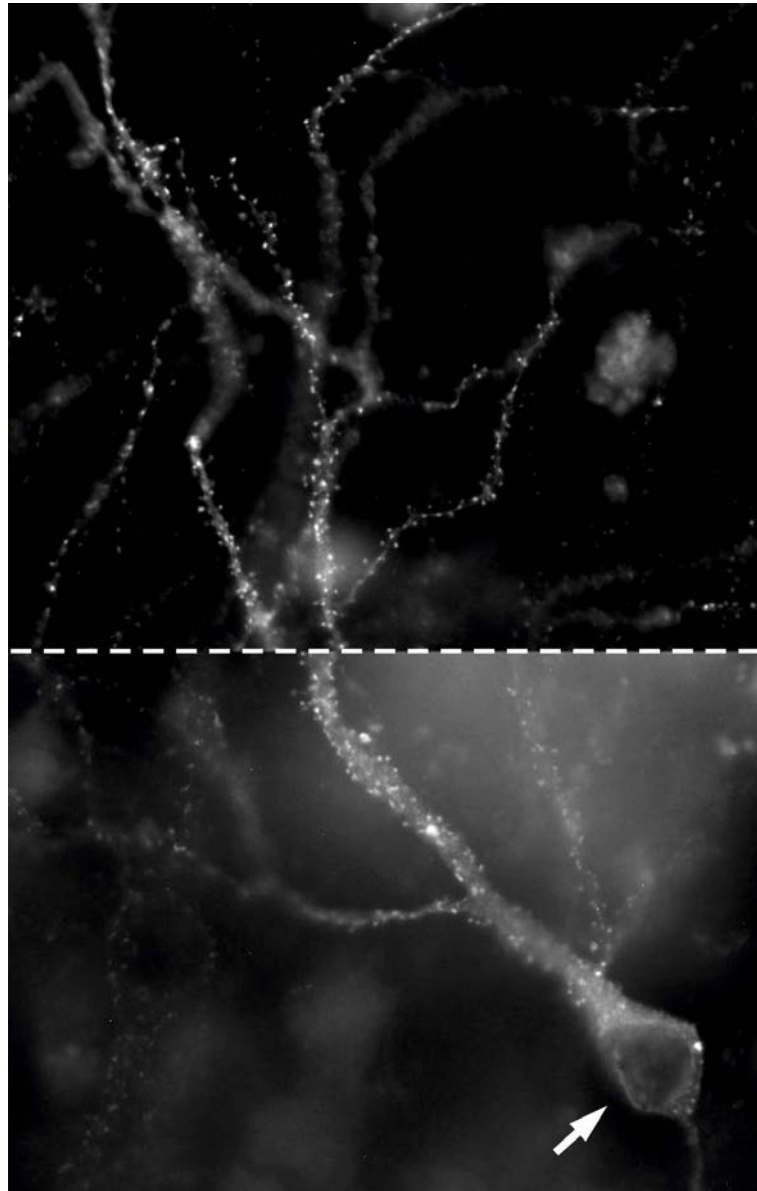


Рис. 1. Нейрон первичной гиппокампальной культуры, экспрессирующий рLU-SamKII-Nomer1-tdTomato. Обращает на себя внимание почти полное отсутствие флуоресценции в соме клетки (стрелка) и наличие большого количества светящихся точек (шипиков) по ходу дендритов. Показаны центральный и периферический фрагменты одного и того же нейрона.

## СИСТЕМА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ В ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Смирнова Е.Ю.<sup>1,2</sup>, Ерофеев А.И.<sup>3</sup>, Власова О.Л.<sup>3</sup>, Чижев А.В.<sup>1,2</sup>, Зайцев А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,

<sup>2</sup> Физико-Технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, г. Санкт-Петербург,  
Россия E-mail: elena.smirnova@mail.ioffe.ru

Применение биологической обратной связи в оптогенетическом эксперименте может быть с успехом использовано как при изучении фундаментальных проблем нейробиологии, например, выяснении механизмов генерации потенциалов действия, так и для более эффективного решения прикладных задач, например, подавления эпилептической активности путем стимуляции очага генерации в случае повышения вероятности возникновения икctalного разряда.

В электрофизиологическом эксперименте система обратной связи компьютера с нейроном была впервые реализована в начале 90-х годов (Sharp et al., J Neurophysiol. 67:1691-1694, 1992) и названа динамическим пэтч-клатпом. В данном методе внутриклеточная стимуляция нейрона током зависит от текущего состояния клетки. Стимуляции происходит в режиме реального времени. Поскольку разрешающая способность определяется частотой оцифровки сигнала, то при использовании современных карт оцифровки это время обычно составляет 30 мкс, что позволяет воздействовать практически на любую электрическую активность нейронов.

За последние 10 лет электрофизиология поднялась на качественно новый уровень в связи с развитием оптогенетического подхода (Boyden et al. Nat Neurosci 8:1263-1268, 2005). Оптогенетика позволяет деполяризовать (возбудить) или гиперполяризовать (ингибировать) нейрон, воздействуя лучом света определенной длины волны на различные типы родопсинов. За счет правильно подобранного промотора можно обеспечить экспрессию родопсина только в определенной группе клеток. Помимо специфичности и различного типа действия (возбуждающего и тормозного) воздействие на нейрон светом отличается еще и скоростью воздействия: изменение конфигурации светочувствительного канала или помпы (родопсинов), которое его открывает, происходит за фемтосекунды.

В данной работе мы поставили перед собой цель совместить два подхода и реализовать систему биологической обратной связи в оптогенетическом эксперименте. Разрабатываемая система ориентирована на изучение и подавление эпилептической активности в ЦНС. Одной из альтернатив медикаментозному методу лечения эпилепсии является низкочастотная стимуляция мозга. Однако непрерывная стимуляция мозга может иметь побочные действия: ухудшение памяти, нежелательные эмоциональные реакции, нейроэндокринные расстройства. Поэтому для уменьшения побочных эффектов необходимо сократить длительность стимуляции, запуская ее только в случае высокой вероятности возникновения эпилептического приступа. Еще большую эффективность воздействия может обеспечить применение оптогенетического подхода, позволяющего стимулировать только необходимый тип клеток. В данной работе мы сосредоточились на разработке собственно системы обратной связи для оптогенетического эксперимента. Наши усилия были направлены на решение следующих задач:

- 1) разработать детектор эпилептической активности (на примере *in vitro* модели эпилепсии);
- 2) написать программное обеспечение, реализующее мониторинг сетевой активности и детекцию эпилептических событий;
- 3) реализовать выход управляющего сигнала с разработанного программного обеспечения на электрический стимулятор на драйвер светодиода, используемого для воздействия светом на канал родопсины;
- 4) протестировать работу системы сначала в режиме электрической стимуляции срезов мозга,

а затем в режиме воздействия светом на первичную культуру клеток гиппокампа.

Чтобы разработать детектор, были выделены ключевые характеристики эпилептической активности на примере 4-аминопиридиновой модели эпилепсии *in vitro*. В данной модели при внутриклеточной регистрации активности нейрона можно выделить иктальные и интериктальные события. Интериктальное событие представляет собой одну короткую пачку спайков, тогда как иктальное событие - это пачка пачек потенциалов действия суммарной длительностью около 20-50 с.

В срезах мозга спайковая активность нейрона наблюдается только в случае синхронизации синаптических входов нейронов сети, поэтому генерация потенциала действия может служить надежным индикатором начала эпилептического события. Был предложен следующий алгоритм детекции эпилептических событий в режиме реального времени: при постоянном мониторинге мембранного потенциала нейрона глубоких слоев энторинальной коры рассчитывается прирост мембранного потенциала за шаг оцифровки сигнала (30 мкс). Превышение порогового значения в 10 мВ/мс свидетельствует о возникновении потенциала действия нейрона, то есть о начале иктального или интериктального события в сети. Для реализации алгоритма детекции эпилептических событий была написана программа в среде Delphi (программа успешно протестирована с картой оцифровки National Instruments PCI-6221). Программа считывает мембранный потенциал нейрона с частотой оцифровки 20 кГц (допустимые значения - до 33.3 кГц), фильтрует сигнал с помощью RC-фильтра и рассчитывает скорость прироста мембранного потенциала. В случае превышения порогового значения программа запускает режим стимуляции с заданными заранее параметрами. После завершения стимуляции программа вновь переходит в режим детекции эпилептических событий. Выход управляющего сигнала с разработанного программного обеспечения успешно протестирован на электрическом стимуляторе Isostim A320, а также на драйвере DC4104 четырехканального светодиода фирмы Thorlabs.

Разработанная программа для реализации биологической обратной связи с сетью нейронов была апробирована на переживающих срезах мозга (энторинальной коры и гиппокампа) трехнедельных крыс. Использовалась электрическая стимуляция коллатералей Шаффера в зоне CA1 гиппокампа, начало эпилептических событий отслеживалось по мембранному потенциалу. С задержкой в 50 мкс после превышения порога спайка включалась низкочастотная электрическая стимуляция с частотой 1 Hz (10 импульсов). В дальнейшем мы планируем применить разработанную систему обратной связи для детального изучения зависимости эффективности низкочастотной стимуляции от таких параметров, как задержка начала стимуляции и ее продолжительность.

Система биологической обратной связи была также протестирована на первичной культуре клеток гиппокампа после трансфекции с FCK-ChR2-GFP плазмидой. Поставленная задача: посредством стимуляции светом с длиной волны 470 нм перевести нейрон из регулярного режима генерации спайков в пачечный режим. Для этого деполяризующим током различной амплитуды вызывали потенциалы действия у нейрона. С помощью разработанной системы обратной связи детектировался порог первого спайка и с задержкой, зависимой от характеристик нейрона, включался светодиод. Световая стимуляция посредством воздействия на каналородопсины приводила к генерации второго потенциала действия, в результате чего наблюдалась пачечная активность нейрона.

Таким образом, нами реализована биологическая обратная связь с нейроном или сетью нейронов в оптогенетическом эксперименте. На данном этапе система биологической обратной связи была протестирована на срезах энторинальной коры и гиппокампа с электрической стимуляцией и на первичной гиппокампальной культуре клеток, экспрессирующих каналородопсин, со стимуляцией светом длиной волны 470 нм. На следующем этапе работы планируется применить этот метод для подавления эпилептической активности в срезах мозга с избирательной экспрессией археородопсинов (протонных помп, открытие которых приводит к гиперполяри-

зации клетки) в парвальбуминовых интернейронах в момент повышенной вероятности возникновения эпилептической активности.

*Работа выполнена при поддержке РФФ 17-75-10082.*

## ПРИМЕНЕНИЕ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ (ОБЗОР)

Смирнова Е.Ю.<sup>1,2</sup>, Зайцев А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,

<sup>2</sup> Физико-Технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

E-mail: elena.smirnova@mail.ioffe.ru

Несмотря на длительную историю изучения эпилепсии, до сих пор почти треть случаев заболеваний не поддается медикаментозной терапии. Чтобы помочь пациентам с фармакорезистентной эпилепсией, нередко проводятся нейрохирургические операции по удалению эпилептогенных областей мозга и рассечению комиссуральных связей, что может сопровождаться достаточно тяжелыми последствиями для их здоровья.

В клинике применяют и более щадящие методы воздействия: низкочастотную электрическую стимуляцию блуждающего нерва и некоторых областей мозга, для чего используют как транскраниальную стимуляцию, так и вживленные электроды (Wendling et al., 2016; Fisher, Velasco, 2014). К сожалению, и у этого терапевтического метода есть недостатки. Среди побочных эффектов электрической стимуляции мозга выделяют ухудшение памяти (Coleshill et al., 2004), нежелательные эмоциональные реакции (Lanteaume et al., 2007; Liu et al., 2012), нейроэндокринные расстройства (Fink, Jamieson, 1974). Это обусловлено тем, что электрическая стимуляция оказывает неспецифическое воздействие на ткань мозга, локально возбуждая различные типы нейронов и расположенные рядом волокна.

Для уменьшения побочных эффектов стимуляции необходимо с одной стороны минимизировать воздействие на мозг, а с другой сделать его максимально направленным на подавление эпилептической активности. Чтобы достичь этой цели, необходимо досконально понимать механизм действия низкочастотной стимуляции на активность мозга. Надежда разрешить эти проблемы и разобраться в механизме действия появилась благодаря оптогенетике (Boyden et al., 2005). Используя оптогенетический подход, можно экспрессировать различные родопсины (светочувствительные ионные каналы или помпы) в специфических группах нейронов, что позволяет не только возбуждать, но и тормозить эти нейроны, воздействуя на них светом определенной длины волны.

Наибольший интерес в области исследования эпилепсии представляют такие родопсины как:

- катионные каналородопсины (Boyden et al., 2005), которые под действием синего (465 нм) света пропускают через клеточную мембрану различные катионы (преимущественно ионы натрия), тем самым деполяризуя (возбуждая) нейрон;
- хлорные каналородопсины (Wietek et al., 2014), они под действием синего (465 нм) света селективно пропускают в клетку анионы хлора, гиперполяризуя (шунтируя) нейрон;
- галородопсины, или хлорные помпы (Zhang et al., 2007), под действием желтого света (580 нм) пропускают анионы хлора в клетку;
- археродопсины, или протонные помпы (Chow et al., 2010), под действием зеленого света (532 нм) выводят протоны из клетки, гиперполяризуя ее;
- Cl-out (Alfonsa et al., 2016), это гибрид из хлорного каналородопсина и протонной помпы, воздействие на которого лучами (561 нм и 488 нм одновременно) приводит к выводу анионов хлора при относительно постоянном уровне мембранного потенциала. Разработка новых типов родопсинов продолжает стремительно развиваться.

Экспрессия родопсина в определенной группе клеток обеспечивается благодаря специфическим промоторам: CAF (во всех клетках); Syn, hSyn, hSyn1 (во всех нейронах); CaMKII, hThy1 (в возбуждающих глутаматергических нейронах); GFAP (в глиальных клетках). Для специфиче-

ской экспрессии в парвальбуминовых или соматостатиновых ГАМКергических интернейронах обычно используют Cre-loxP систему, для которой требуется скрещивание трансгенных линий мышей с геном Cre-рекомбиназы в парвальбуминовых/соматостатиновых нейронах с линией мышей с геном родопсина, который считывается только при наличии Cre-рекомбиназы, альтернативно может быть использована вирусная доставка такого гена родопсина.

Оптогенетический подход в настоящее время успешно применяется для изучения механизмов эпилептической активности и ее подавления в различных моделях. Первая работа в этом направлении была выполнена на органотипической культуре гиппокампа (Tonnesen et al., 2009). Было показано, что непрерывная активация светом галородопсинов в CaMKII нейронах во время эпилептоподобной активности, вызванной высокочастотной электрической стимуляцией, приводит к сокращению ее длительности. Минусом такого подхода является большая длительность внешнего воздействия и неспособность повлиять на первую, наиболее травмирующую стадию иктального разряда - активацию интернейронов.

Чтобы сократить время воздействия, было предложено использовать систему биологической обратной связи, когда оптическая стимуляция проводится только в периоды, критические для возникновения эпилептической активности, или низкочастотную оптическую стимуляцию. Paz с соавторами (2013) впервые реализовали принцип обратной связи для подавления таламокортикальной эпилепсии путем воздействия светом на галородопсины, экспрессированные в таламических нейронах. В этом типе эпилепсии в коре возникает эпилептическая активность из-за входа от гипервозбужденных нейронов таламуса. Подавить такой тип эпилептической активности можно, погасив гиперактивность нейронов таламуса. Paz et al. подавали длительную ступеньку света, определяя начало эпилептического события с помощью метода Line Length (Esteller et al., 2001) по ЭЭГ сигналу с частотой оцифровки 6 кГц, и таким способом им удалось добиться полного исчезновения электрографических и поведенческих эпилептических приступов. Принцип обратной связи необходимо применить для более эффективного подавления приступов и при других формах эпилепсии.

Эффект избирательной низкочастотной оптической стимуляции различных групп нейронов для подавления эпилептической активности сильно зависит от используемой модели. Так, Ladas с соавторами (2015), используя 4-аминопиридиновую модель эпилепсии *in vitro*, сравнили противосудорожный эффект при возбуждении всех нейронов гиппокампа и только интернейронов. Оказалось, что низкочастотное оптическое возбуждение интернейронов сильнее подавляет интериктальную активность сети.

Используя модель эпилепсии электрического киндлинга, Xu с соавторами (2016) обнаружили, что низкочастотная активация светом CaMKII-нейронов, но не тормозных ГАМКергических интернейронов, оказывает антиэпилептический эффект подобный низкочастотной электрической стимуляции. Shiri с соавторами (2017) на 4-аминопиридиновой модели эпилепсии *in vitro* показали, что низкочастотная активация как парвальбуминовых/соматостатитновых интернейронов, так и CaMKII нейронов приводит к подавлению иктальных разрядов, однако эффект сильнее при стимуляции CaMKII нейронов.

Таким образом, механизм антиэпилептического эффекта низкочастотной стимуляции требует дальнейшего изучения, хотя оптогенетические исследования указывают на то, что стимуляция именно возбуждающих нейронов, а не тормозных интернейронов эффективнее подавляет иктальную активность.

Несмотря на большой потенциал оптогенетического подхода для подавления эпилептической активности, прежде чем он сможет быть использован в клинике, должен быть преодолен целый ряд проблем. Среди них можно выделить: иммунный ответ организма на родопсины, маленькую площадь воздействия светом и сложность его подведения, отсутствие неинвазивных способов экспрессии родопсинов (Tonnesen et al., 2017). В настоящее время для оптической глубоинной стимуляции мозга (инвазивной) предлагается имплантировать оптоволокно (Stauffer



et al., 2016). Однако недавно был предложен неинвазивный способ стимуляции после разовой доставки генов родопсина в необходимую область мозга (Chen et al., 2018). Суть метода заключается в том, что используются сверхконверсионные наночастицы, преобразующие инфракрасный свет в свет нужной длины волны. Инфракрасные лучи способны проникать в ткань, а сверхконверсионные наночастицы меняют длину волны на требуемую.

Таким образом, применение оптогенетического метода для подавления эпилептической активности в ЦНС является перспективным подходом, который требует дальнейшего изучения.

*Работа выполнена при поддержке РФФ 17-75-10082.*

### Литература

- 1) Alfonsa H, Lakey JH, Lightowers RN, Trevelyan AJ. Cl-out is a novel cooperative optogenetic tool for extruding chloride from neurons. Nat Commun. 2016 Nov 17;7:13495. doi: 10.1038/ncomms13495.
- 2) Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. Nat Neurosci. 2005 Sep;8(9):1263-8. PubMed PMID: 16116447.
- 3) Chen S, Weitemier AZ, Zeng X, He L, Wang X, Tao Y, Huang AJY, Hashimoto-dani Y, Kano M, Iwasaki H, Parajuli LK, Okabe S, Teh DBL, All AH, Tsutsui-Kimura I, Tanaka KF, Liu X, McHugh TJ. Near-infrared deep brain stimulation via upconversion nanoparticle-mediated optogenetics. Science. 2018 Feb 9;359(6376):679-684. doi: 10.1126/science.aag1144
- 4) Chow BY, Han X, Dobry AS, Qian X, Chuong AS, Li M, Henninger MA, Belfort GM, Lin Y, Monahan PE, Boyden ES. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. Nature. 2010 Jan 7;463(7277):98-102. doi: 10.1038/nature08652
- 5) Coleshill SG, Binnie CD, Morris RG, Alarcón G, van Emde Boas W, Velis DN, Simmons A, Polkey CE, van Veelen CW, van Rijen PC. Material-specific recognition memory deficits elicited by unilateral hippocampal electrical stimulation. J Neurosci. 2004 Feb 18;24(7):1612-6. PubMed PMID: 14973245
- 6) Esteller R, Echaz J, Tchong T, Litt B, Pless B. Line length: an efficient feature for seizure onset detection. Engineering in Medicine and Biology Society, 2001. Proceedings of the 23rd Annual International Conference of the IEEE. 2001:1707--1710
- 7) Fink G, Jamieson MG. Effect of electrical stimulation of the preoptic area on luteinizing hormone releasing factor in pituitary stalk blood. J Physiol. 1974 Mar;237(2):37P-38P. PubMed PMID: 4596601.
- 8) Fisher RS, Velasco AL. Electrical brain stimulation for epilepsy. Nat Rev Neurol. 2014 May;10(5):261-70. doi: 10.1038/nrneurol.2014.59.
- 9) Ladas TP, Chiang CC, Gonzalez-Reyes LE, Nowak T, Durand DM. Seizure reduction through interneuron-mediated entrainment using low frequency optical stimulation. Exp Neurol. 2015 Jul;269:120-32. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.04.001.
- 10) Lanteaume L, Khalifa S, Régis J, Marquis P, Chauvel P, Bartolomei F. Emotion induction after direct intracerebral stimulations of human amygdala. Cereb Cortex. 2007 Jun;17(6):1307-13. Epub 2006 Jul 31. PubMed PMID: 16880223.

- 11) Liu X, Ramirez S, Pang PT, Puryear CB, Govindarajan A, Deisseroth K, Tonegawa S. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature*. 2012 Mar 22;484(7394):381-5. doi: 10.1038/nature11028. PubMed PMID: 22441246
- 12) Paz JT, Davidson TJ, Frechette ES, Delord B, Parada I, Peng K, Deisseroth K, Huguenard JR. Closed-loop optogenetic control of thalamus as a tool for interrupting seizures after cortical injury. *Nat Neurosci*. 2013 Jan;16(1):64-70. doi: 10.1038/nn.3269
- 13) Shiri Z, Lévesque M, Etter G, Manseau F, Williams S, Avoli M. Optogenetic Low-Frequency Stimulation of Specific Neuronal Populations Abates Ictogenesis. *J Neurosci*. 2017 Mar 15;37(11):2999-3008. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2244-16.2017
- 14) Stauffer WR, Lak A, Yang A, et al. Dopamine Neuron-Specific Optogenetic Stimulation in Rhesus Macaques. *Cell*. 2016;166(6):1564-1571.e6. doi:10.1016/j.cell.2016.08.024
- 15) Tønnesen J, Sørensen AT, Deisseroth K, Lundberg C, Kokaia M. Optogenetic control of epileptiform activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 21;106(29):12162-7. doi: 10.1073/pnas.0901915106
- 16) Tønnesen J, Kokaia M. Epilepsy and optogenetics: can seizures be controlled by light? *Clin Sci (Lond)*. 2017 Jun 30;131(14):1605-1616. doi: 10.1042/CS20160492.
- 17) Wendling F, Gerber U, Cosandier-Rimele D, Nica A, De Montigny J, Raineteau O, Kalitzin S, Lopes da Silva F, Benquet P. Brain (Hyper)Excitability Revealed by Optimal Electrical Stimulation of GABAergic Interneurons. *Brain Stimul*. 2016 Nov - Dec;9(6):919-932. doi: 10.1016/j.brs.2016.07.001.
- 18) Wietek J, Wiegert JS, Adeishvili N, Schneider F, Watanabe H, Tsunoda SP, Vogt A, Elstner M, Oertner TG, Hegemann P. Conversion of channelrhodopsin into a light-gated chloride channel. *Science*. 2014 Apr 25;344(6182):409-12. doi: 10.1126/science.1249375
- 19) Xu Z, Wang Y, Chen B, et al. Entorhinal Principal Neurons Mediate Brain-stimulation Treatments for Epilepsy. *EBioMedicine*. 2016;14:148-160. doi:10.1016/j.ebiom.2016.11.027
- 20) Zhang F, Wang LP, Brauner M, Liewald JF, Kay K, Watzke N, Wood PG, Bamberg E, Nagel G, Gottschalk A, Deisseroth K. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*. 2007 Apr 5;446(7136):633-9. PubMed PMID: 17410168

## ВИЗУАЛИЗАЦИЯ АКТИВНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ОПТОГЕНЕТИКА: НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

Цыцарев В.Ю.

Мэрилендский университет в Колледж-Парке, г. Вашингтон, США

E-mail: [ttsytsarev@umaryland.edu](mailto:ttsytsarev@umaryland.edu)

В последние годы оптогенетика - методика исследования нервной системы, основанная на внедрении в мембрану нейронов фоточувствительных пептидов или же пептидов, изменяющих свои оптические свойства в ответ на изменения мембранного потенциала - заняла лидирующие позиции в нейронауках. Параллельно развиваются и другие методы визуализации активности работы головного мозга, среди которых важное место занимают методики визуализации нейронной активности мозга с использованием потенциал-зависимых оптических индикаторов. Комбинация этих методических подходов была применена нами при исследовании нейронной сети вибриссной системы мыши.

Вибриссная система грызунов характеризуется высокой степенью соматотопической организации - через тригеминальный нерв фациальные вибриссы посылают информацию в соответствующие микроанатомические структуры - барреллеты - ствола мозга, которые, в свою очередь, передают сигнал в противоположное полушарие - к баррелоидам таламуса. Таламические нейроны передают сигнал на высший уровень - к баррелям первичной соматосенсорной коры.

Вибриссная система грызунов традиционно используется в качестве удобной модели при исследованиях нейронных сетей, пластичности и развития нервной системы. Паттерн-образующая структура вибриссной системы (вибрисса - барреллетта - баррелоид - баррел) является генетически детерминированной. Ее развитие в онтогенезе может корректироваться внешними факторами лишь в определенных пределах, причем ее иерархическая основа не может быть изменена - речь может идти лишь о некоторых изменениях в рамках пластичности. Один из генов, регулирующих развитие этой системы у грызунов - *Robo3* - отвечает за перекрест сенсорных путей. Выключение данного гена приводит к аномалиям в развитии соматосенсорной системы: в каждом полушарии генетически модифицированного животного появляется дополнительное вибриссное поле, имеющее не только контралатеральные, но и ипсилатеральные сенсорные входы.

Генетическая линия мышей с нокаутом гена *Robo3* является удобным объектом для изучения сенсорных, таламических и кортико-кортикальных связей вибриссной системы, так как серьезные отличия генетически модифицированных животных сопровождаются существенными изменениями поведенческих паттернов, связанных с использованием вибрисс. Сравнительный анализ поведения, микроанатомической структуры и данных, полученных в результате визуализации нейрональной активности мутантных и контрольных мышей позволяет определить ключевые факторы, ответственные за обработку сенсорной информации и формирования соответствующих нейронных сетей.

При помощи потенциал-зависимых оптических индикаторов мы провели функциональное картирование соматосенсорной коры мутантных мышей с выключенным геном *Robo3*. Были получены данные о функционировании <<нормального>> и <<мутантного>> вибриссных полей соматосенсорной коры, которые были дополнены данными гистологических и поведенческих экспериментов. Как выяснилось, <<мутантное>> вибриссное поле функционирует параллельно <<нормальному>>, однако его наличие существенно меняет поведенческие паттерны животного: мутанты применяют иную стратегию при преодолении препятствий, исследовании новых объектов, а также в процессе социального поведения. Гистологический анализ показал, что дополнительные, т.е. <<мутантные>> барреллеты и баррелоиды имеются в стволе мозга и таламусе генетически модифицированных животных. Полученные данные проливают свет на

онтогенез нейронной сети соматосенсорной коры и ее роль в формировании поведения животного.

Вибриссные фолликулы содержат дирекционно-селективные механорецепторы, реагирующие на направление отклонения вибриссы. Для исследования кортикальных представительства дирекционно-селективных клеток, с помощью искусственного вируса мы экспрессировали кальций-чувствительный оптический индикатор в нейроны II-III слоя вибриссного поля соматосенсорной коры и, используя 2-фотонную микроскопию на бодрствующем животном, провели регистрацию нейрональной активности в ответ на механическое отклонение одиночной вибриссы в ортогональных направлениях - горизонтально и вертикально. Как оказалось, ориентационно-специфически отвечающие нейроны неокортекса организованы пространственно гетерогенно, что вероятно, связано с механизмами обработки соматосенсорной информации. Такая гетерогенность не является неожиданной - топическая организация является одним из характеризующих признаков организации центральной нервной системы. Вместе с тем, во II-III слое соматосенсорной коры локализация ориентационно-специфически отвечающих нейронов достаточно сложна, и на данном этапе было бы излишне смело делать выводы о ее биологическом значении. Тем не менее, полученные результаты серьезно углубляют наше понимание того, как функционирует и формируется в онтогенезе нейронная сеть. Наши данные, полученные при исследовании вибриссной системы грызунов, продемонстрировали высокую эффективность использования методов оптогенетики и визуализации нейронной активности. Сочетание этих методик безусловно может быть применено в различных областях нейронаук.

#### Литература

- 1) Kwon SE, Tsytsarev V, Erzurumlu RS, O'Connor DH. Organization of orientation-specific whisker deflection responses in layer 2/3 of mouse somatosensory cortex. *Neuroscience*. 2018; 1;368:46-56
- 2) Tsytsarev V, Arakawa H, Zhao S, Chedotal A, Erzurumlu RS. Behavioral Consequences of a Bifacial Map in the Mouse Somatosensory Cortex. *J Neurosci*. 2017; 26;37(30):7209-7218

## МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ КАК ЭЛЕМЕНТ ПРОТЕЗИРОВАНИЯ ЗРЕНИЯ ПОСРЕДСТВОМ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЫ

**Чижов А.В.**

*Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной  
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,  
г. Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: anton.chizhov@mail.ioffe.ru*

При патологиях с подкорковыми нарушениями и сохранной функцией зрительной коры зрение может быть восстановлено путём стимуляции непосредственно нейронов первичной зрительной коры (Рис. 1). Современные методики решают принципиальные вопросы такого протезирования. Во-первых, оптогенетическая стимуляция позволяет создавать необходимые сигналы, которыми управляются нейроны. Это - ток и мембранная проводимость, имитирующая синаптические ток и проводимость. Например, канал-родопсин позволяет имитировать возбуждающий ток, а светууправляемый хлорный канал [Berndt et al. // Science 2014] изменяет мембранную проводимость. Во-вторых, временное разрешение современных светууправляемых каналов соответствует кинетике синаптических сигналов. В третьих, пространственное разрешение 3d-паттернов стимуляции светом (порядка 10 мкм) позволяет стимулировать сомы нейронов отдельными световыми пучками [Szabo et al. // Neuron 2014]. Достигается это с помощью голографической оптики. И последнее, сигналы, которые получает зрительная кора в случае нормального зрения, -- распределённые по коре токи и проводимости синаптических каналов на мембранах возбуждающих и тормозных нейронов -- могут быть реконструированы из видеопотока с помощью математической модели.

В качестве перспективного подхода к моделированию предлагается популяционный подход, представляющий кору как слоистый континуум, состоящий из непрерывно распределённых вдоль поверхности коры популяций возбуждающих и тормозных нейронов с учётом функциональной структуры ориентационных гиперколонок и ретино-таламических проекций [Chizhov // J.Comp.Neurosc. 2014]. Такая модель биофизически детальна и воспроизводит множество наиболее существенных эффектов функционирования зрительной коры, отражающих свойства рецептивных полей, ориентационную и дирекциональную настройку, эффекты удержания стимула и нелинейного взаимодействия вызванной активности, эффекты саккад и др.

Непротиворечивое описание механизмов этих эффектов достигается в рамках единой математической модели, охватывающей множество данных, полученных в различных экспериментальных условиях *in vivo* и на переживающих срезах. Предлагаемая математическая модель обеспечивает биофизически-подробное описание механизмов работы первичной зрительной коры в терминах активности нейрональных популяций и на основе модели одиночной популяции, выведенной для нейронов типа Хождкина-Хаксли (conductance-based refractory density - CBRD-подход) [Chizhov and Graham // Phys. Rev. E 2007, 2008]. На основе CBRD-подхода построена комплексная модель коры как слоистого гетерогенного континуума с учётом структуры ориентационных гиперколонок. Модель воспроизводит ряд известных экспериментальных внутриклеточных и оптических записей в первичной зрительной коре кошек и обезьян, в частности: эффекты настройки на ориентацию и направление движения элементов зрительного стимула; эффект удержания активности, вызванной кратким стимулом; эффект кажущегося движения стимула; и влияние саккадического перемещения стимула на характер спайковой активности. Согласно модели, наиболее важным фактором проявления эффектов выступает сила возбуждающих внутрикорковых связей. С точки зрения приложения модели к протезированию важно, что модель может преобразовывать входной сигнал с видеокамеры в выходные

сигналы - возбуждающую и тормозную проводимости на пирамидных нейронах слоя 2/3, которые, по предположению, должны служить сигналами, управляющими системой оптической стимуляции. Нерешенными со стороны математического моделирования являются вопросы о воспроизведении эффектов стереоскопического зрения и упрощения модели для достижения быстрогодействия, необходимого в системах обработки сигналов в реальном времени.

Таким образом, математическое моделирование и оптогенетическая стимуляция представляются главными необходимыми элементами протезирования зрения на уровне коры.

### Литература

- 1) Berndt A, Lee SY, Ramakrishnan C, Deisseroth K. Structure-guided transformation of channelrhodopsin into a light-activated chloride channel. *Science*. 344(6182):420-4, 2014.
- 2) Szabo V, Ventalon C, De Sars V, Bradley J, Emiliani V. Spatially selective holographic photoactivation and functional fluorescence imaging in freely behaving mice with a fiberscope. *Neuron* 84(6):1157-69, 2014.
- 3) Chizhov AV. Conductance-based refractory density model of primary visual cortex. *J Comput Neurosci*. 36(2):297-319, 2014.
- 4) Chizhov AV, Graham LJ. Efficient evaluation of neuron populations receiving colored-noise current based on a refractory density method. *Phys Rev E* 77(1 Pt 1):011910, 2008.
- 5) Chizhov AV, Graham LJ. Population model of hippocampal pyramidal neurons, linking a refractory density approach to conductance-based neurons. *Phys Rev E* 75(1 Pt 1):0119246 2007.

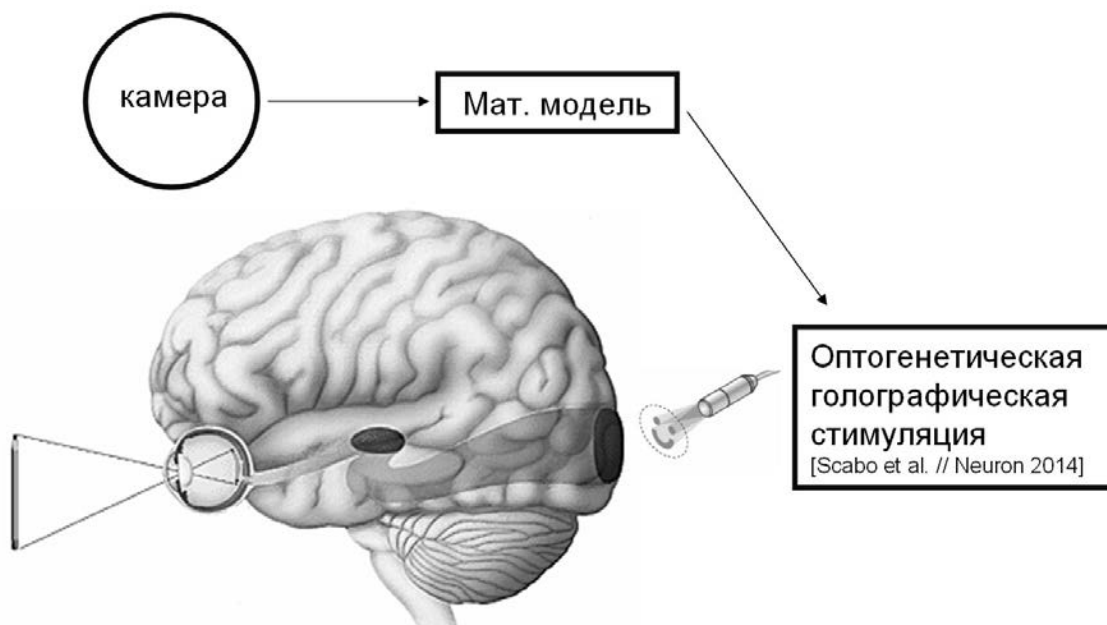


Рис. 1. Гипотетическая схема протезирования зрения на уровне зрительной коры.

## **ДИЗАЙН ФОТОХРОМНЫХ БЛОКАТОРОВ ИОННЫХ КАНАЛОВ С КОРОТКИМ ВРЕМЕНЕМ ТЕРМИЧЕСКОЙ РЕЛАКСАЦИИ ИЗ ЦИС-ФОРМЫ В ТРАНС-ФОРМУ**

**Штыров А. А.**

*Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет  
Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: andriei.shtyrov@mail.ru*

Использование органических фотохромных молекулярных переключателей для управления активностью нейронов является перспективной задачей, имеющей множество применений, в том числе в лечении нейрофизиологических заболеваний. Подобные молекулы присоединяются к ионным каналам клетки и в основном (транс) состоянии блокируют ток ионов через канал. Поглощение фотона света переводит молекулу переключателя в цис- форму, которая не препятствует току ионов, что приводит к деполяризации клеточной мембраны и возникновению электрического сигнала. Затем молекула при помощи термической релаксации возвращается обратно в основное состояние. Использование подобных переключателей для практических применений накладывает определенные ограничения на их свойства, в том числе на время термической релаксации из цис- в транс-форму. Так, одним из наиболее перспективных направлений является использование подобных переключателей при протезировании сетчатки глаза. В данном случае наиболее оптимальным является очень короткое время релаксации (порядка 1 мкс). Молекулярный дизайн переключателей с подобной кинетикой изомеризации требует в первую очередь понимания механизмов изомеризации, что можно достигнуть только при помощи современных методов квантовой химии. Определение механизма изомеризации и основных факторов, вносящих вклад в кинетику перехода, позволяет моделировать, а затем и синтезировать молекулы с заданным временем релаксации. В данной работе мы сконцентрировались на изучении основных факторов, определяющих время термической релаксации производных азобензолов, широко используемых при протезировании сетчатки. Предварительно было проведено сравнительное исследование различных квантово-химических методологий для моделирования изомеризации с целью найти наиболее оптимальные, то есть позволяющие получить точную картину перехода при оптимальных вычислительных затратах. Выбранный на основании результатов этого сравнения метод был использован для определения факторов, влияющих на кинетику перехода ряда производных азобензола. Рассчитанные данные показывают, что на скорость изомеризации влияет наличие в переключателе положительно заряженных электрон-акцепторных групп.

# ИМИДЖИНГ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

## ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ ПРИВОДИТ К УСИЛЕНИЮ ВЫРАБОТКИ БЕЛКА ТРАНСИРЕТИН В СОСУДИСТОМ СПЛЕТЕНИИ КРЫС В ПЕРВЫЙ МЕСЯЦ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

Васильев Д.С.<sup>1,2</sup>, Туманова Н.Л.<sup>1</sup>, Дубровская Н.М.<sup>1,2</sup>, Алексеева О.С.<sup>1</sup>, Журавин И.А.

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет  
Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург, Россия.

E-mail: [dvasilyev@bk.ru](mailto:dvasilyev@bk.ru)

Белок транстиретин (ТТР) является транспортным белком жидких сред организма, основным переносчиком тироксина и ретинола. В литературе показано, что ТТР способствует повышению выживаемости нейронов при ишемии (Santos et al. 2010) и играет заметную роль в обеспечении выживаемости при гипоксическом стрессе (Ahmad et al. 2014). В организме человека и животных ТТР синтезируется главным образом в печени и сосудистом сплетении мозга, откуда секретируется в плазму крови и спинномозговую жидкость. Однако в литературе отсутствуют данные об экспрессии и распределении данного белка в сосудистом сплетении головного мозга животных, перенесших гипоксию в период эмбриогенеза, что определило задачу настоящего исследования.

**Материал и методы.** Для создания гипоксических условий самок крыс линии Вистар на 14 день беременности подвергали действию гипоксии (7% O<sub>2</sub>, 3 часа). Контрольных животных содержали при нормальной концентрации кислорода. На 20 и 50 сутки постнатального онтогенеза исследовали распределение белка ТТР в ткани сосудистого сплетения желудочков полушарий головного мозга потомков гипоксических и контрольных самок. Ткань фиксировали раствором 10%-го нейтрального формалина на 0,1М фосфатном буфере (pH 7,4), затем изготавливали фронтальные срезы на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Германия). Иммуногистохимическое исследование ТТР проводили с использованием первичных моноклональных антител LS-B2607-50 (Life Bioscience) в разведении 1:100. Визуализацию осуществляли с помощью FITC-конъюгированных вторичных антител против IgG кролика (ab96902, разведение 1:500). Иммунофлюоресцентное исследование сосудистого сплетения на уровне +0.20 mm от Bregma (по Paxinos, Watson 2007) выполняли на микроскопе Leica DMR, оборудованном конфокальным сканером Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флюорохрома FITC было вызвано светом Ar/He лазера при длине волны 488 нм, флюоресценцию наблюдали в диапазоне 496-537 нм. Из уровня интенсивности свечения флюорохрома FITC вычитали фоновое свечение, средние величины свечения по всей площади профильного поля сосудистого сплетения желудочков конечного мозга сопоставляли у контрольных и <<гипоксических>> крыс.

**Результаты и их обсуждение.** Иммунофлюоресцентное исследование распределения ТТР в сосудистом сплетении мозга 20-суточных крысят позволило выявить различие между пред-



ставителями контрольной и <<гипоксической>> групп. У молодых крыс, перенесших пренатальную гипоксию, иммунореактивность к ТТР в сосудистом сплетении была выше на 75% ( $p \leq 0,05$ ), чем у контрольных животных соответствующего возраста. При этом, у половозрелых <<гипоксических>> животных (P50) уровень иммунореактивности к данному белку снижался и достигал контрольных величин. Полученные данные в целом согласуются с имеющимися в литературе представлениями об участии ТТР в реакции организма на гипоксию и другие повреждающие факторы, а также о его роли в повышении толерантности организма к гипоксии (Patel et al. 2012; Ahmad et al. 2014). Однако наличие такого компенсаторного механизма в сосудистом сплетении головного мозга крыс после пренатальной гипоксии было показано нами впервые. Таким образом, нами были получены данные, свидетельствующие, о повышенном уровне содержания ТТР в сосудистом сплетении головного мозга 20-суточных крысят, перенесших пренатальную гипоксию. Такое повышение может являться следствием увеличения экспрессии данного белка, оказывающего нейропротективное действие.

*Благодарность: Работа выполнена по госзаданию ФАНО России (АААА-А18-118012290373-7) при частичной поддержке РФФИ (16-04-00694). Конфокальная микроскопия выполнена на базе Центра коллективного пользования ИЭФБ РАН.*

### Литература

- 1) Santos S.D., Lambertsen K.L., Clausen B.H., Akinc A., Alvarez R., Finsen B., Saraiva M.J. CSF Transthyretin Neuroprotection in a Mouse Model of Brain Ischemia // J Neurochem, 2010, 115: 1434-1444
- 2) Ahmad Y., Sharma N.K., Ahmad M.F., Sharma M., Garg I., Bhargava K. Proteomic Identification of Novel Differentiation Plasma Protein Markers in Hypobaric Hypoxia-Induced Rat Model // PLOS ONE. 2014. 9(5): e98027
- 3) Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Edition. 2007. Elsevier Inc. 456 p.
- 4) Patel J., Landers K A, Mortimer R H, Richard K. Expression and uptake of the thyroxine-binding protein transthyretin is regulated by oxygen in primary trophoblast placental cells // J. Endocrinol. 2012. 212(2): 159--167

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ХОЛИНОМИМЕТИКОВ И ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ НА УРОВЕНЬ КАЛЬЦИЯ В ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЯХ МЫШИ

Жиляков Н.В.<sup>1,2</sup>, Хазиев Э.Ф.<sup>1,2,3</sup>, Маломуж А.И.<sup>1,2</sup>, Бухараева Э.А.<sup>1,2</sup>, Никольский Е.Е.<sup>1,2</sup>,  
Самигуллин Д.В.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр  
"Казанский научный центр Российской академии наук"

<sup>2</sup> Казанский федеральный (Приволжский) университет;

<sup>3</sup> Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева г.  
Казань, Россия

E-mail: kiosk71@gmail.com

Основным нейромедиатором в периферическом отделе нервной системы является ацетилхолин (АХ), тогда как в синапсах центрального отдела наиболее распространенным нейромедиатором является глутамат и его производные, включая гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК). К настоящему моменту установлено, что на пресинаптической нервной терминали нередко экспрессируются рецепторы к нейромедиатору, активация которых способна приводить к облегчению или угнетению процессов нейросекреции. Так, на двигательном нервном окончании активация холинорецепторов способна как снижать, так и увеличивать интенсивность выделения АХ [1]. Недавно нами было установлено, что и ГАМК, претендующая на роль нейромодулятора в моторных синапсах [2], также способна снижать квантовый состав вызванных ответов концевой пластинки [3]. В связи с этим, встал вопрос о механизме действия холиномиметиков и ГАМК на процесс квантового выделения АХ из двигательных нервных окончаний. Было предположено, что активация холинорецепторов и рецепторов к ГАМК будет тем или иным образом влиять на уровень кальция в нервной терминали. Проверка этого предположения и стала целью настоящего исследования.

Влияние холиномиметиков и ГАМК на уровень кальция в нервных терминалях оценивали с использованием флуоресцентного метода. Нами была разработана техника загрузки красителя в двигательные нервные окончания теплокровных через культю нерва [4]. Все эксперименты выполняли на изолированном нервно-мышечном препарате *m. Levator auris longus* (LAL) мыши. Перерезанный нерв засасывался в стеклянную пипетку, заполненную высокоаффинным флуоресцентным кальций чувствительным красителем Oregon green BAPTA-1 hexapotassium salt, который, путем антероградного транспорта и самодиффузии, проникал в нервные терминали. Для регистрации кальциевых сигналов (кальциевого транзиента) применяли высокоскоростную камеру Neuro CCD SMQ (Redshirt Imaging). Полученные видео усредняли и обрабатывали в программе ImageJ. Анализ полученных данных выполняли в программе Origin Pro 8.1.

Известно, что модуляторные эффекты на секрецию АХ в нервно-мышечных синапсах могут опосредоваться как метаботропными мускариновыми, так и ионотропными никотиновыми рецепторами [1,5].

В результате проведенных экспериментов нами было установлено, блокатор мускариновых рецепторов атропин вызывает дозо-зависимое увеличение кальциевого транзиента. Так, при использовании блокатора в концентрации 1 мкМ транзистент увеличивался на  $12.7 \pm 3\%$ , а в концентрации 10 мкМ транзистент увеличивался на  $19.6 \pm 4.6\%$  ( $n=8$ ,  $p<0,05$ ) (рис.1). Аппликация агониста мускариновых рецепторов, собственно мускарина (10 мкМ), приводила к снижению кальциевого транзиента на  $21 \pm 4.5\%$  ( $n=8$ ,  $p<0,05$ ) (рис.2).

При исследовании влияния ионотропных холинорецепторов на уровень кальция в двигательной нервной терминали были получены следующие результаты. Аппликация d-тубокурарина (10 мкМ) не приводила к каким-либо достоверным изменениям. Однако, агонист, никотин

(10 мкМ) вызывал увеличению кальциевого транзientа на  $13.7\% \pm 4.3\%$  ( $n=8$ ,  $p<0.05$ ) (рис.3).

Оценку влияния ГАМК на уровень кальция в двигательных нервных окончаниях производили при использовании аминокислоты в концентрациях 1 мкМ и 1 мМ. При этом какого-либо изменения в кальциевом транзientе отмечено не было и он составлял  $109.0 \pm 7.68\%$ , ( $n = 7$ ,  $p > 0.05$ ) и  $100.3 \pm 7.9\%$  ( $n = 7$ ,  $p > 0.05$ ), соответственно. (рис.4).

Подытоживая полученные нами данные, можно заключить, что механизмы холинергической ауторегуляции в моторных синапсах теплокровных затрагивают изменения уровня кальция в нервной терминали. Причем, активация мускариновых и никотиновых рецепторов сказывается на уровне кальция по разному: если активация метаботропных рецепторов ведет к снижению концентрации кальция, то активация ионотропных - к ее увеличению. При этом, отсутствие эффектов ГАМК на кальциевый транзient, свидетельствует о том, что влияние ГАМК на процесс нейросекреции АХ реализуется через молекулярные механизмы, не связанные напрямую с изменением уровня кальция в терминали.

*Работа поддержана грантом РНФ (17-15-01279).*

### Литература

- 1) Wessler I. (1989) Control of transmitter release from the motor nerve by presynaptic nicotinic and muscarinic autoreceptors. Trends Pharmacol. Sci. V. 10(3) P.110-114.
- 2) Nurullin LF, Nikolsky EE, Malomouzh AI. (2018) Elements of molecular machinery of GABAergic signaling in the vertebrate cholinergic neuromuscular junction. Acta Histochem2018 doi: 10.1016/j.acthis.2018.02.003
- 3) Malomouzh AI, Petrov KA, Nurullin LF, Nikolsky EE. (2015) Metabotropic GABAB receptors mediate GABA inhibition of acetylcholine release in the rat neuromuscular junction. J Neurochem. V. 135(6) P. 1149-1160.
- 4) Казаков АГ, Жилияков НВ, Хазиев ЭФ, Александров МВ, Самигуллин ДВ. (2015) Загрузка кальциевого красителя в двигательные нервные окончания теплокровных через культю нерва Международный научно-исследовательский журнал. Т.9 С.13-15.
- 5) Parnas H, Segel L, Dudel J, Parnas I. (2000) Autoreceptors, membrane potential and regulation of transmitter release Trends in Neurosciences. V. 23 P. 60--68.

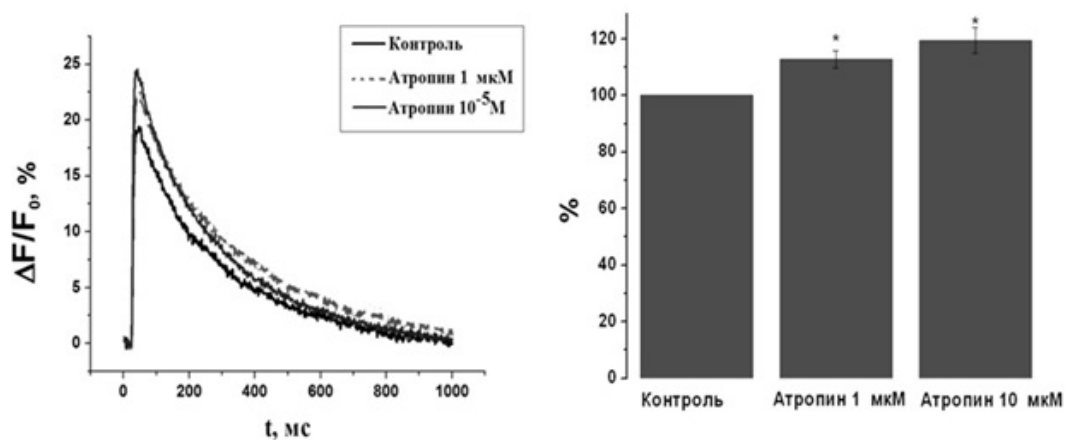


Рис. 1. Изменение кальциевого транзientа в присутствии атропина.

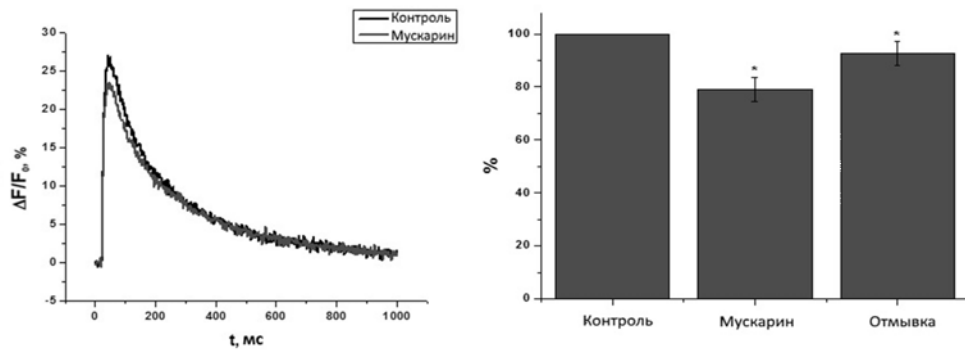


Рис. 2. Изменение кальциевого транзientа в присутствии мускарина в концентрации 10 мкМ.

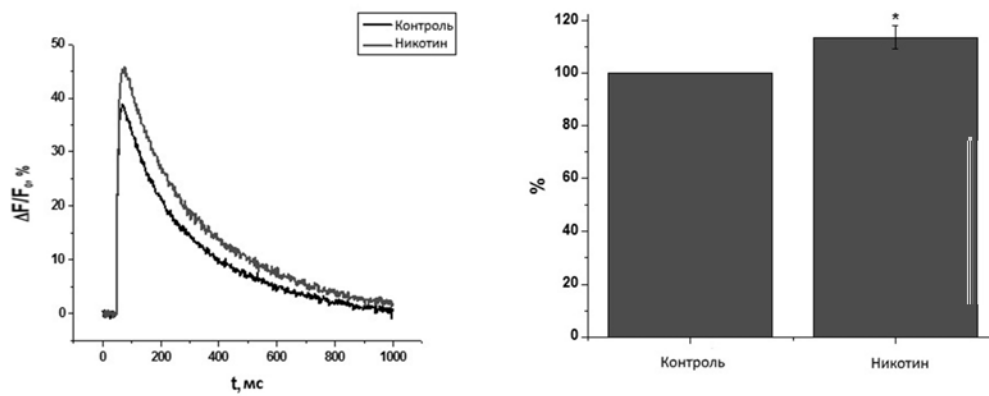


Рис. 3. Изменение кальциевого транзientа в присутствии никотина в концентрации 10 мкМ.

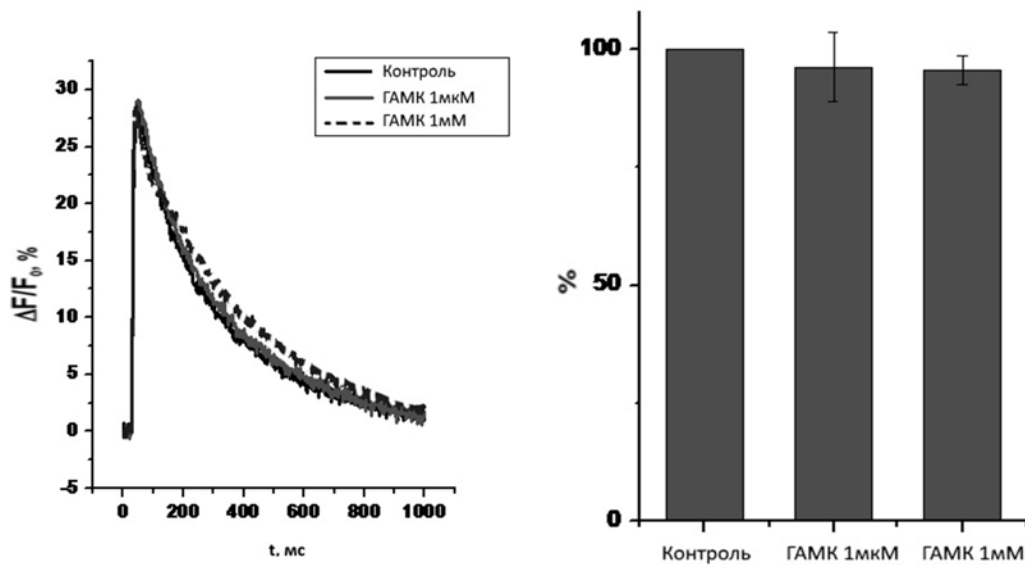


Рис. 4. Кальциевый транзient при аппликации ГАМК в концентрациях 1 мкМ и 1 мМ.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПОЛИЛИЗИНОВЫХ ДЕНДРИМЕРОВ 3-Й И 5-Й ГЕНЕРАЦИИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС

Журавин И.А.<sup>1,2</sup>, Васильев Д.С.<sup>1,2</sup>, Туманова Н.Л.<sup>1</sup>, Дубровская Н.М.<sup>1,2</sup>, Наливаева Н.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург, Россия

E-mail: i-zhur@mail.ru

Дендримеры являются новым классом разветвленных полимеров с регулярной сферической структурой и большим числом, терминальных групп. Гибридные дендримеры с различными концевыми группами используются во многих биомедицинских приложениях для доставки к органам и тканям лекарственных препаратов, ДНК и пептидов (Vlasov et al. 2004). Физико-химические свойства дендримеров и их биологическая активность интенсивно изучаются (Klajnert et al. 2006), однако, в научной литературе сведения об особенностях транспорта дендримеров в тканях организма встречаются крайне редко. Вместе с тем, они необходимы для эффективного применения дендримеров в экспериментах на животных, а также в терапевтических целях. Целью настоящей работы была оценка эффективности доставки положительно заряженных полилизинных дендримеров в ткань головного мозга при различных способах введения в организм (*i.p.*, *i.v.*, интраназально), а также сопоставление особенностей транспорта полилизинных дендримеров 3-го и 5-го поколений при *i.v.* введении.

**Материал и методы.** Для работы были использованы дендримеры на основе лизина третьей (D3) и пятой (D5) генерации, конъюгированные с флуоресцентным красителем FITC. Процесс синтеза и структура использованных в работе дендримеров нами детально описаны ранее (Neelov et al. 2013). В ходе настоящего исследования был изучен характер распространения дендримеров, в ткани мозга взрослых самцов крыс линии Вистар при однократном введении в желудочек одного из полушарий мозга (*i.v.*,  $10^{-2}$ М, объемом 1,2 мкл, по координатам Bregma +0,20 мм; L=3,5 мм; H=2,5 мм (Paxinos, Watson, 2007), а также при интраназальном (по 5 мкл  $10^{-2}$ М раствора дендримеров в каждую ноздрю) или внутрибрюшинном (*i.p.* 16 мг/кг веса животного) введениях. При *i.p.* введении также проводилась оценка распределения дендримеров в периферических тканях крыс. Исследование интенсивности свечения конъюгированного с дендримером флюорохрома FITC выполняли на микроскопе Leica DMR, оборудованном конфокальным сканером Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение FITC вызывали светом Ar/He лазера при длине волны 488 нм, а флуоресценцию наблюдали в диапазоне 496-537 нм.

**Результаты и их обсуждение.** Через 50 минут после однократного *i.v.* введения дендримеров D3 флуоресцентная метка наблюдалась на расстоянии, не превышающем 500 мкм от трека. Распространение D3 вокруг желудочка мозга наблюдалось в области от 300 до 500 мкм от его стенок. При введении более крупных молекул D5 область распространения флуоресцентной метки была в 1,5-2 раза меньше, чем при введении D3, при этом более явно наблюдалось постепенное затухание сигнала при удалении от области введения. Обнаружено, что оба типа полилизинных дендримеров связывались с наружной клеточной мембраной и захватываться клетками. Результаты *i.p.* введений свидетельствуют о том, что исследуемые дендримеры свободно распространяются с кровотоком, оседают в капиллярных клубочках почек, на стенках кровеносных сосудов, но не способны проникать сквозь стенки сосудов и через гемато-энцефалический барьер. Отсутствие флуоресценции FITC в ткани обонятельных луковиц и полушарий головного мозга при интраназальном введении D3 и D5 свидетельствует о связывании либо поглощении дендримеров эпителиальной тканью слизистых оболочек, что препятствует

доставке этих соединений в ткань мозга. На основании полученных данных делается вывод о том, что положительно заряженные дендримеры на основе лизина третьей - пятой генерации обладают низкой способностью к широкому распространению в ткани головного мозга, поскольку их физико-химические свойства обеспечивают высокую способность связываться с поверхностью нервных, глиальных и эндотелиальных клеток. С другой стороны, высокая адгезивная способность дендримеров создает предпосылку для их проникновения в клетки, что может быть использовано на практике. Также результаты исследования свидетельствуют о низкой эффективности *i.p.* и интраназальных введений подобных дендримеров для их доставки в ткань головного мозга.

*Благодарность: Работа выполнена по государственному заданию ФАНО России (AAAA-A18-118012290373-7). Полилизинные дендримеры были синтезированы и предоставлены для изучения д.б.н. Г.П. Власовым и д.ф.-м.н. И.М. Нееловым. Конфокальная микроскопия выполнена на базе Центра коллективного пользования ИЭФБ РАН.*

### Литература

- 1) Vlasov G.P.; Korol'kov, V.I.; Pankova, G.A.; Tarasenko, I.I.; Baranov, A.N.; Glazkov, P.B.; Kiselev, A.V.; Ostapenko, O.V.; Lesina, E.A.; Baranov, V.S. Lysine dendrimers and their starburst polymer derivatives: possible application for DNA compaction and in vitro delivery of genetic constructs. // Russian J. Bioorg. Chem. 2004, 30: 12--20.
- 2) Neelov, I.M., Janaszewska, A., Klajnert, B., Bryszewska, M., Makova, N.Z., Hicks, D., Pearson, H.A., Vlasov, G.P., Ilyash, M.Y., Vasilev, D.S., Dubrovskaya, N.M., Tumanova, N.L., Zhuravin, I.A., Turner, A.J., Nalivaeva, N.N. Molecular properties of lysine dendrimers and their interactions with A $\beta$ -peptides and neuronal cells. // Curr Med Chem. 2013, 20(1): 134-143.
- 3) Klajnert, B.; Cladera, J.; Bryszewska, M. Molecular interactions of dendrimers with amyloid peptides: pH dependence. // Biomacromolecules. 2006, 7(7): 2186-2191.
- 4) Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Edition. 2007. Elsevier Inc. 456 p.

## ХЛОРНЫЙ ТРАНСПОРТ В ПРЕСИНАПТИЧЕСКИХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЯХ АКСОНОВ МОТОНЕЙРОНОВ: СВЯЗЬ С ЭФФЕКТОМ ОЛЕСОКСИМА НА ЭКЗОЦИТОЗ

Закирьянова Г.Ф.<sup>1,2</sup>, Гильмутдинов А.И.<sup>2</sup>, Ценцевичский А.Н.<sup>1</sup>,  
Зефирова А.Л.<sup>2</sup>, Петров А.М.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр  
<<Казанский научный центр Российской академии наук>>;

<sup>2</sup> Институт нейронаук Федерального государственного бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования <<Казанский государственный медицинский  
университет>> Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Казань, Россия  
E-mail: farraguz12@gmail.com

Производное холестерина, 4-холестен-3-он, оксим (олесоксим), обладает нейропротекторными свойствами в моделях различных нейродегенеративных заболеваний, в том числе бокового амиотрофического склероза. Недавно нами показано изменение экзоцитоза и рециклирования везикул под действием олесоксима (0.2 мкМ) в нервно-мышечных синапсах лягушки (Kasimov MR et al., 2016). Механизм действия олесоксима слабо изучен.

В рамках текущей работы мы исследовали влияние олесоксима (0.2 мкМ, 15 мин аппликация) на экзоцитоз синаптических везикул в нервно-мышечном синапсе диафрагмы мыши, используя оптические и электрофизиологические методы. За процессами экзоцитоза синаптических везикул следили с помощью FM1-43. Оказалось, что олесоксим, с одной стороны, значительно ограничивает экзоцитоз содержащих FM-краситель синаптических везикул, а с другой стороны - существенно в меньшей степени подавляет секрецию нейромедиатора при длительной высокочастотной (20 Гц) активности. Такое расхождение между оптическими и электрофизиологическими данными - типичный признак ускорения рециклирования синаптических везикул. В этом случае ритмическая стимуляция запускает экзоцитоз части везикул, вначале содержащих как нейромедиатор, так и краситель FM1-43. После освобождения молекул нейромедиатора и красителя в синаптическую щель, эндоцитоз быстро заново формирует везикулы, которые впоследствии заполняются нейромедиатором, но уже не содержат молекул красителя. Повторный экзоцитоз таких везикул в ходе продолжающейся стимуляции вызывает секрецию нейромедиатора, но не выброс красителя. Таким путем, сопоставляя оптические и электрофизиологические данные можно идентифицировать повторное использование (рециклирование) везикул в ходе синаптической активности.

Известно, что олесоксим может препятствовать гибели нейронов, напрямую связываясь с потенциал-зависимым анионным каналом VDAC (voltage-dependent anion channel), участвующим в формировании митохондриальной поры MPTP. VDAC экспрессируется не только в митохондриях, но и на плазматической мембране. Мы использовали два блокатора VDAC --- мембранопроницающий DIDS (50 мкМ, 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid, менее селективный) и мембранонепроницающий S18 (1 мкМ, S-18 phosphorothioate randomer oligonucleotide, более селективный). Оба соединения имели очень слабый эффект на экзоцитоз синаптических везикул при высокочастотной стимуляции, также одновременная аппликация DIDS и S18, не приводила к значительным изменениям экзоцитоза. Однако на фоне ингибирования VDAC (с помощью DIDS или S18) эффект олесоксима на экзоцитоз синаптических везикул значительно подавлялся. Это предполагает, что кратковременное применение олесоксима модулирует рециклирование, по крайней мере, частично, через механизм, связанный с активацией VDAC, локализованных в плазматической мембране.

Для проверки участия митохондрий в эффектах олесоксима, был применен ротенон (10 мкМ, ингибитор I комплекса митохондрий), вызывающий митохондриальную дисфункцию, которая может нарушать синаптическую передачу. Действительно, применение ротенона сильно

нарушало экзоцитоз синаптических везикул при высокочастотной стимуляции. Применение ни олесоксима, ни DIDS не могло исправить дефект экзоцитоза, вызванный ротеноном. Это указывает на то, что мишень олесоксима локализуется вне митохондрий.

Для выяснения воздействия олесоксима на хлорную проводимость были проведены эксперименты с мутантными мышами, экспрессирующими хлорный сенсор под контролем нейрон-специфичного промоутера Thy-1 (предоставлены профессором Брежестовским П.Д., Марсель, Франция). Зеленая флуоресценция этого сенсора тушится ионами хлора, и наоборот, возрастает при снижении концентрации хлора в нейроне. Мы обнаружили, что этот сенсор экспрессируется в избытке в нервных окончаниях аксонов мотонейронов диафрагмы и добавление раствора, не содержащего хлор (где он заменен на глюконат; при этом осмотичность и pH сохранены на нормальном уровне), вызывает быстрый рост флуоресценции в двигательных нервных окончаниях. Оказалось, что добавление олесоксима также приводит к быстрому (в течение минуты) увеличению флуоресценции хлорного сенсора в нервных окончаниях, что частично блокируется DIDS и полностью S-18. Интересно, что в процессе высокочастотной стимуляции в двигательных нервных окончаниях также наблюдается увеличение зеленой флуоресценции хлорного сенсора, что также блокируется DIDS и S18.

Эти данные указывают на то, что в двигательных нервных окончаниях хлорный равновесный потенциал менее негативный, чем потенциал покоя, поэтому при электрической активности в терминали или открытии хлорных каналов под влиянием олесоксима наблюдается увеличение флуоресценции хлорного сенсора, указывающее на выход ионов хлора из пресинаптической нервной терминали. Также эти данные указывают на способность олесоксима увеличивать проводимость для анионов (в частности, хлора) пресинаптической мембраны через транспортную систему, чувствительную к DIDS и S18.

Таким образом, исходя из полученных данных, мы предполагаем, что кратковременная аппликация олесоксима усиливает рециклирование синаптических везикул при высокочастотной активности, действуя на транспортный белок пресинаптической мембраны, способный пропускать ионы хлора (предположительно, VDAC). Под влиянием олесоксима ионы хлора выходят из пресинаптического нервного окончания, и блокирование этого потока ионов хлора с помощью DIDS и S18, также устраняет эффект олесоксима на экзоцитоз. Это указывает на возможную роль хлорного транспорта в регуляции пресинаптического везикулярного цикла.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-00046.*

### Литература

- 1) M.R. Kasimov, G.F. Zakyrganova, A.R. Giniatullin, A.L. Zefirov, A.M. Petrov, 2016, Similar oxysterols may lead to opposite effects on synaptic transmission: Olesoxime versus 5 $\alpha$ -cholestan-3-one at the frog neuromuscular junction, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861(7):606-16



## **РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СУБЪЕДИНИЦ GLUR1 И GLUR2 AMPA-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В МОЗГЕ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ**

**Зачепило Т.Г., Лопатина Н.Г.**

*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: polosataya@hotmail.ru*

Глутаматные ионотропные AMPA рецепторы (AMPA) характеризуются фазным действием и обеспечивают быструю деполяризацию мембран, участвуя в процессах нейротрансмиссии и внутриклеточной сигнализации. AMPA рецепторы позвоночных - тетрамеры - содержат субъединицы GluR1 - GluR4 в разном соотношении. Каналы всех AMPA рецепторов проницаемы для ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , некоторых - для  $\text{Ca}^{2+}$ . AMPA рецепторы регулируют медиаторную функцию нейронов, участвуя в возбуждающей/тормозной нейротрансмиссии, в синаптической пластичности и когнитивных процессах. У насекомых эта группа рецепторов изучена слабо. Ранее нашими поведенческо-фармакологическими исследованиями было показано, что в головном мозге пчелы присутствуют рецепторы, сходные с AMPA рецепторами млекопитающих. Целью данной работы было изучить распределение субъединиц GluR1 и GluR2 AMPA-подобных рецепторов в мозге медоносной пчелы.

С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания срезов мозга пчелы впервые был выявлен характер распределения GluR1 и GluR2 субъединиц. Данные субъединицы были колокализованы. Слабое фоновое окрашивание наблюдалось по всему нейропилю. Максимальное окрашивание имело место в нейропиле и нейронах грибовидных тел, в отдельных нейронах зрительных и обонятельных долей. Таким образом, AMPA-подобные рецепторы в мозге медоносной пчелы локализованы в регионах мозга, связанных с обработкой сенсорной информации и формированием ассоциативной памяти.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРИАЛЛОКОРТИКАЛЬНОЙ КОРЫ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ СЛОЙ-СПЕЦИФИЧНЫХ НЕЙРОНАЛЬНЫХ МАРКЕРНЫХ БЕЛКОВ

**Зыкин П.А.<sup>1</sup>, Ткаченко Л.А.<sup>1</sup>, Насыров Р.А.<sup>2</sup>, Краснощекова Е.И.<sup>1</sup>**

*1 ФГБОУ ВО <<Санкт-Петербургский государственный университет>>,  
2 ФГБОУ ВО <<Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский*

*университет>> Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия.*

*E-mail: pavel.zykin@spbu.ru*

За последнее десятилетие взгляд на ключевую функцию мозга - память значительно трансформировался. Установлено, что субструктуры периаллокортекса (ПАК), вместе с гиппокампом, формируют единую систему памяти и пространственной навигации. Самое крупное открытие в этой области удостоено Нобелевской премии 2014 года за открытие клеток сети (grid cells), которые представляют собой <<навигатор мозга>>, объединяющий в единую систему нейроны <<места>>, <<границ пространства>>, <<скорости>> и <<направления перемещения>> (8). Все субструктуры, включающие эти клетки, входят в состав ПАК и, как установлено в модельных экспериментах, являются интерфейсом между новой корой и гиппокампом (4). У человека сложнейшая топография височной области мозга, отличная от всех других млекопитающих, определила особенности организации ПАК, которые изучены крайне слабо (5). В то же время большинство заболеваний, осложненных деменцией (болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, Пика и др), обусловлены избирательной дегенерацией нейронов ПАК, ментальным заболеваниям - аутизму, СДВГ, шизофрении, сопутствует сниженный объем субструктур этой системы (1, 2, 3). Проблема осложняется тем, что из-за особенностей анатомического расположения ПАК сложно исследовать с помощью функциональной МРТ (6). Один из путей решения - исследование пренатального онтогенеза данной системы, что позволит уточнить границы отдельных субструктур, особенности их организации, очерёдности критических периодов развития, ляжет в основу диагностики заболеваний, связанных с деменцией и конфобуляцией. Таких данных в литературе крайне мало, а они необходимы для характеристики подмножеств системы, выделения критических периодов их онтогенеза с повышенной уязвимостью тератогенными факторами.

Материал и методы исследования. Всего исследовано 10 левых полушарий мозга плодов в возрасте 20-26 недель гестации, полученных из архива СПбГПМУ с разрешением этического комитета на последующее исследование. Весь материал, с постмортемным сроком не более 24 часов, по заключению патологоанатома не имел патологий и кровоизлияний, показал отрицательную реакцию на вирусы нейроинфекций: герпеса (тип 1), цитомегаловируса, Эпштейна-Барр. Материал фиксировали в 4% растворе параформальдегида на 0,1М фосфатном буфере, рН 7,4, заливали в парафин, фронтальные срезы толщиной 12 мкм изготавливали на микротоме Leica RM 2245. Для последующего исследования срезы окрашивали крезоловым фиолетовым по Нисслю или подвергали иммуногистохимической (ИГХ) обработке с антителами к слой-специфичным белкам (TBR1, SATB2, FOXP1, CTIP2), белкам цитоскелета (N200, MAP2) и кальций-связывающим белкам (CALB, CALR, PARV), которые в совокупности позволяют идентифицировать морфотип постмиграционных клеток, их генез и принадлежность определенным слоям коры. Исследование препаратов проводили с помощью микроскопов Leica DM 5500 и Leica TCS SP5, оборудованных моторизованными предметными столиками и ПО MicroManager, позволяющим автоматически создавать панораму из множества отдельных полей зрения. Локализацию ИГХ позитивных элементов в конкретном слое коры устанавливали путём сопоставления с препаратами, окрашенными по Нисслю и графиками градаций яркости.

Результаты исследования. ПАК мозга плодов человека в середине внутриутробного периода по особенностям стратификации отличается от пограничных областей новой и древней коры.

Его характерной особенностью являются: (1) бесклеточная зона, так называемая диссиканта, разделяющая поперечник коры на поверхностную и глубокую зоны и (2) дискретные клеточные островки поверхностных слоёв. По структурным характеристикам и ИГХ-гетерогенности нами выделены 4 основных субструктуры в составе ПАК: пресубикулум (ПрС), парасубикулум (ПаС) каудо-медиальная энторинальная кора (к-МЭК) и росто-латеральная энторинальная кора (р-ЛЭК). Впервые, с помощью комплексного использования нескольких слой-специфичных маркеров выделены те слои, которые характерны для всех корковых формаций - FOXP1<sup>+</sup> нейроны слоя V; для субикулула, слоя V новой и, в меньшей степени, энторинальной коры STIP2<sup>+</sup> нейроны; только для ПАК и новой - TBR1<sup>+</sup> нейроны слоя VI, SATB2<sup>+</sup> нейроны слоёв I и II; только для субструктур ПАК - отсутствие слой-специфичной метки в слое III при наличии MAP2<sup>+</sup> и CALB<sup>+</sup> нейронов. Границы слоёв уточняли по графикам индекса яркости, для которых учтена плотность расположения всех окрашенных элементов - нейронов и ядер глии. Таким образом, установлено, что пресубикулум и парасубикулум относятся к периаллокортексу, но не к архикортексу, в отличие от гиппокампа, зубчатой извилины и субикулула, показана преемственность слоёв трёх филогенетических формаций - старой, периаллокортикальной и новой коры.

В модельных экспериментах на грызунах установлено, что в ПрС, ПаС и к-МЭК клетки направления перемещения, границ пространства и навигации располагаются в поверхностных слоях корковой пластинки и имеют характерную упорядоченность в виде модулей (7). Такие клетки отмечены и в нашем исследовании. 3D реконструкция серийных срезов позволила продемонстрировать модули структурно и нейрохимически гетерогенных нейронов в слоях I и II ПрС, ПаС и к-МЭК, которые по морфологии и топографии сходны со специализированным клеткам сети, положения головы и границ пространства у грызунов.

Вывод: в середине плодного периода периаллокортекс мозга человека подразделяется на четыре, различающиеся цито- и хемоархитектоникой, субструктуры - каудо-медиальную и росто-латеральную энторинальную кору, парасубикулум, пресубикулум, которые с высокой вероятностью являются гомологами одноименных структур конечного мозга грызунов.

### Литература

- 1) Beall M.J., Lewis A.D. Heterogeneity of layer II neurons in human entorhinal cortex // J. Comp. Neurol. 1992. Vol. 321. P. 241-266.
- 2) Bellmund J., Deuker L., Schroder T. Grid-cell representations in mental simulation// eLife 2016;5:e17089. DOI: 10.7554/eLife.17089
- 3) Braak H., Braak E. The human entorhinal cortex: normal morphology and lamina-specific pathology in various diseases // Neurosci. Res. 1992. Vol. 15. P. 6-31.
- 4) Hevner R.F., Kinney H.C. Reciprocal entorhinal-hippocampal connections established by human fetal midgestation // J. Comp. Neurol. 1996. Vol. 372, No. 3. P. 384-394.
- 5) Insausti R., Muñoz-López M., Ana M. Insausti, Artacho-Pérula E. The Human Periallocortex: Layer Pattern in Presubiculum, Parasubiculum and Entorhinal Cortex. A Review// Frontiers in Neuroanatomy | [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org) 1 October 2017 | Volume 11 | Article 84.
- 6) Maass A., Berron D., Libby L., Ranganath, C., Düzel E. Imaging the human medial temporal lobe with high-resolution fMRI // Neuron. 2015. Vol. 65. P. 298--308.
- 7) Naumann R.K., Ray S., Prokop S., Las L., Heppner F.L., Brecht M. Conserved size and periodicity of pyramidal patches in layer 2 of medial/caudal entorhinal cortex // J. Comp. Neurol. 2016. Vol. 524. P. 783--806.

- 8) Rowland D.C., Roudi Y., Moser M.B., Moser E. I. Ten Years of Grid Cells // Annu. Rev. Neurosci. 2016. Vol. 39. P. 19-40. doi: 10.1146/annurev-neuro-070815-013824.

## ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ ФОРСКОЛИНА В НЕЙРОНАХ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ МОЗЖЕЧКА КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНФОКАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ

Иванова М.А.<sup>1,2</sup>, Ситникова Л.С.<sup>1,2</sup>, Карелина Т.В.<sup>1</sup>, Сибаров Д.А.<sup>1</sup>, Абушик П.А.<sup>1</sup>, Антонов С.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого,

г. Санкт-Петербург, Россия

E-mail: ivanova\_ma@iephb.ru

Известно, что в условиях эксайтотоксичности глутамат способен приводить к массивному входу кальция в нейроны, большое количество которого приводит к кальциевой дисрегуляции, митохондриальной дисфункции и вызывает клеточную гибель по механизмам апоптоза и некроза.

На сегодняшний день показано, что активация циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) инициирует нейропротекторные сигнальные каскады. В связи с этим интересно было изучить возможное нейропротекторное действие форсколина, способного активировать аденилатциклазу, а впоследствии увеличивать синтез цАМФ, в условиях нейротоксического действия глутамата на нейроны мозжечка крыс в первичной культуре с применением методов современной сканирующей конфокальной микроскопии.

Уровень выживаемости нейронов определялся с помощью метода флуориметрического выявления апоптотических и некротических клеток путем последовательного окрашивания флуорохромами акридиновым оранжевым (5 мкг/мл) и бромистым этидием (5 мкг/мл). Флуоресценцию красителей измеряли на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP ( $\lambda_{ex}=488$  нм,  $\lambda_{em}=525, 610$  нм). Ядра нейронов с деструктурированной мембраной окрашивались бромистым этидием и светились красным светом, ядра живых нейронов окрашивались акридиновым оранжевым и светились зеленым или оранжевым. Полученные изображения анализировали в программе ImageJ.

Для флуориметрического определения входа кальция в нейроны и анализа изменения митохондриального мембранного потенциала был использован метод мониторинга флуоресцентного свечения зондов fluo-3 и родамин-123, соответственно. Для визуализации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в нейроны загружали флуоресцентный зонд fluo-3 AM (4 мкМ), который позволяет отслеживать относительные изменения концентрации  $[Ca^{2+}]_i$  в микромолярном диапазоне. Покровные стекла с нейронами переносили в регистрационную/перфузионную камеру. Для измерения митохондриального мембранного потенциала в нейроны загружали флуоресцентный зонд родамин-123 (5 мкМ). Флуоресценцию нейронов (свечение fluo-3 или родамина-123) измеряли также на инвертированном сканирующем конфокальном микроскопе ( $\lambda_{ex}=488$  нм,  $\lambda_{em}=530$  нм) с частотой сканирования 0,03 кадр/с. Полученные конфокальные изображения с флуоресценцией зондов оцифровывали при помощи программного обеспечения Leica LAS AF. В качестве контроля для измерения митохондриального мембранного потенциала использовали протонифор carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, 4 мкМ), который приводил к полному разобщению дыхательной цепи - падению митохондриального потенциала, вызывая тем самым максимум эмиссии родамина-123.

Иммуноцитохимический анализ экспрессии антиапоптотического белка (bcl-2) и проапоптотических (BAX, p53, каспаза-3 и AIF) белков был также проведен с использованием конфокального сканирующего микроскопа. Все белки были маркированы первичными антителами.

ми к соответствующему белку и вторичными антителами конъюгированными с флуорохромом alexa488 или alexa633.

В ходе проведения экспериментальной работы нам удалось показать, что введение 1 мкМ форсколина предотвращает развитие апоптоза, вызванное долговременным (4 ч) дейтсивем 100 мкМ глутамата на нейроны мозжечка крыс в первичной культуре. Для определения участников нейропротекторного сигнального каскада форсколина, была проведена серия экспериментов с ингибитором протеинкиназы А (РКА, 0,6 мкМ), блокатором протеинкиназы С (РКС, хелеретрин 1 мкМ) или блокатором кальмодулин-зависимой киназы II типа (СаМКII, KN93 3 мкМ). Эффект форсколина в культуре нейронов мозжечка полностью предотвращался ингибитором РКА и блокатором РКС, указывая на участие РКА и РКС в данном сигнальном каскаде.

Анализ внутриклеточных кальциевых ответов и изменения митохондриального мембранного потенциала показал, что на фоне действия (6 мин) 100 мкМ глутамата 1 мкМ форсколина вызывал достоверное снижение амплитуды кальциевых ответов нейронов, и уменьшение падения потенциала митохондрий по сравнению с действием чистого глутамата (100 мкМ).

Иммуноцитохимический анализ экспрессии проапоптотических белков BAX, AIF, каспаза-3 и p53 показал качественное снижение их экспрессии при действии 1 мкМ форсколина совместно с 100 мкМ глутамата по сравнению с действием только агониста. Уровень антиапоптотического белка bcl-2 увеличивался на фоне действия 1 мкМ форсколина, тем самым подтверждая его нейропротекторный эффект.

Таким образом, с использованием разных подходов и методов конфокальной сканирующей микроскопии нам удалось показать, что нейротоксическое действие 100 мкМ глутамата на нейроны мозжечка блокируется за счет активации аденилатциклазы 1 мкМ форсколина. При этом происходит блокирование увеличения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ , и тем самым предотвращается развитие кальциевой дисрегуляции, а уровень митохондриального мембранного потенциала остается на уровне контроля, что в результате приводит к увеличению выживаемости нейронов мозжечка крыс в первичной культуре ткани.

*Работы выполнены в рамках государственного задания №АААА-А18-118012290427-7, под-держана грантом РФФИ 16-04-00653 и Стипендией Президента РФ.*

## **ВЛИЯНИЕ ДЕТЕРГЕНТОВ НА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА КВАНТОВЫХ ТОЧЕК В ЭНДОСОМАХ**

**Кошеверова В.В.<sup>1</sup>, Литвинов И.К.<sup>1,4</sup>, Харченко М.В.<sup>1</sup>, Каменцева Р.С.<sup>1</sup>, Корнилова  
Е.С.<sup>1,2,3,4</sup>**

<sup>1</sup>*Институт цитологии РАН;*

<sup>2</sup>*Санкт-Петербургский государственный университет;*

<sup>3</sup>*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого;*

<sup>4</sup>*Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики (ИТМО), г. Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: kosheverova\_vera@incras.ru*

В настоящее время одной из основных методик, применяемых для анализа различных внутриклеточных процессов, является метод иммунофлуоресцентного мечения. Этот метод предполагает использование антител, способных специфично связываться с антигеном, расположенным внутри или на поверхности клетки. Также метод включает в себя применение флуоресцентной метки, конъюгированной с антителом, что позволяет визуализировать в клетке с помощью оптической микроскопии распределение антигена интереса. Флуоресцентные метки (флуорофоры) различны по своей природе и обладают определенными характеристиками, такими, как ширина спектра поглощения (возбуждения) и испускания, скорость выгорания, квантовый выход, что определяет возможное время анализа препарата под микроскопом, возможность комбинации данного флуорофора с другими и др.

Флуорофорами нового поколения, которые недавно нашли свое применение при анализе биологических объектов, являются полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы, так называемые квантовые точки (QDs). От других флуорофоров их отличает высокая фотостабильность (на несколько порядков превышающая фотостабильность органических флуорофоров), высокий квантовый выход и узкий спектр испускания (Yoffe, 2001). Все они возбуждаются в УФ-области, а длина волны испускания зависит от размера ядра. Они характеризуются большим сдвигом Стокса, т.е. большой разницей между длинами волн поглощения и испускания, что дает возможность их совместного использования с несколькими различными флуорофорами на одном препарате. При всех описанных преимуществах, однако, следует учитывать, что QDs являются сложными физическими объектами, оптические свойства которых могут изменяться в зависимости от химического состава микроокружения.

Мы используем квантовые точки, конъюгированные со стрептавидином, что позволяет применять их в качестве флуоресцентной метки для биотинилированного эпидермального фактора роста (ЭФР). ЭФР - лиганд, специфически связывающийся на поверхности клетки с трансмембранным рецептором-тирозинкиназой. Связывание ЭФР с его рецептором индуцирует интернализацию лиганд-рецепторных комплексов внутрь клетки клатрин-зависимым путем, что приводит к поступлению комплексов в ранние и затем в поздние эндосомы, и ведет к их деградации в лизосомах (Dikić, 2003).

Ранее мы установили, что фиксация клеток формалином не изменяет характеристики флуоресценции QDs в эндосомах по сравнению с живыми клетками. Однако, в ходе исследований с совместным применением квантовых точек и иммунофлуоресцентным мечением внутриклеточных антигенов другими флуорофорами на фиксированных клетках, мы обнаружили, что пермеабиллизация мембраны клеток, применяемая для обеспечения проникновения в клетку антител, с помощью неионного детергента Triton X-100 (0.5%) приводит к исчезновению флуоресценции квантовых точек уже на 2-3 сутки после приготовления препарата. При этом свечение флуорофоров Alexa 488, 568, Cy3 и др. сохраняется на этих препаратах в течение, по крайней мере 2 мес. В связи с этим целью настоящей работы являлась оптимизация методики иммунофлуоресцентного мечения клеток путем подбора детергентов в экспериментах с

использованием квантовых точек в качестве флуоресцентной метки.

Работу проводили на клетках линии HeLa (Российская коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН). Клетки культивировали в среде DMEM с глутамином (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки, при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. В работе использовали квантовые точки на основе CdSe/ZnS диаметром 10-15 нм с максимумом испускания при 655 нм, покрытые гидрофильной оболочкой, состоящей из молекул PEG (Invitrogen). Эндоцитоз рецептора ЭФР запускали по методике импульсной загрузки лиганда. Для этого ЭФР-биотин (2нМ) предварительно инкубировали с конъюгированными со стептавидином квантовыми точками (2нМ), после чего полученные комплексы ЭФР-QDs добавляли к клеткам на 5 мин при 37°C, а затем отмывали от несвязавшегося лиганда, и оставляли еще на 10 мин в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C для стимуляции эндоцитоза. После этого клетки фиксировали 4% формальдегидом, приготовленным на PBS, в течение 15 мин при T<sub>комн</sub> с последующей 5-кратной отмывкой PBS. На этапе пермеабилзации клеток препараты инкубировали либо в растворе 0,5% Triton X-100 на PBS (15 мин, T<sub>комн</sub>), либо в растворе мягкого неионного детергента Brij56 на PBS (0,05%, 15 мин, T<sub>комн</sub>), либо в растворе дигитонина (45 мкг/мл, 10 мин, 4°C, при постоянном покачивании), либо в отсутствии детергентов (контроль). После этого клетки отмывали PBS или PBS с добавлением неионного детергента Tween 20 (0,1%). Для визуализации ядра клеток препараты окрашивали красителем DAPI. Наличие флуоресценции квантовых точек в клетках исследовали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия) в день эксперимента (1-ые сутки), а также на 3-й и 14-й день после приготовления препаратов. Для этого флуоресценцию QDs возбуждали лазером (405 нм) и детектировали в диапазоне 640-670 нм.

Во всех случаях непосредственно после фиксации детектировали точечное распределение флуоресценции квантовых точек, характерное для эндосомной локализации ЭФР на ранних стадиях эндоцитоза. Такое распределение квантовых точек, конъюгированных с ЭФР, было описано нами ранее и соответствует распределению интернализированных в клетки ЭФР-рецепторных комплексов (Salova et al., 2016). При этом показано, что свободные неконъюгированные с лигандом квантовые точки не проникают в клетки при использованных условиях инкубации (Беляева и др., 2009). Ранее мы также продемонстрировали, что поступление в клетки ЭФР, связанных с квантовыми точками, существенно не изменяет динамику эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов (Salova et al., 2016; Salova et al., 2017). В ходе проведенного исследования мы обнаружили, что применение наиболее распространенного детергента Triton X100 приводило к исчезновению флуоресцентного сигнала от квантовых точек на 3-й день после приготовления препаратов. Напротив, использование мягких детергентов Brij56 или дигитонина не влияло на флуоресценцию QDs и позволяло детектировать в клетках сигнал от квантовых точек на 14-е сутки после пробоподготовки.

Поскольку в стандартных методиках подготовки иммунофлуоресцентных препаратов на этапе отмывки к раствору PBS часто добавляют 0,1% Tween 20, мы также проверили, влияет ли этот детергент на стабильность флуоресценции квантовых точек. Оказалось, что добавление к отмывочному раствору этого детергента также приводило к полному исчезновению флуоресценции QDs в контрольных клетках, не подвергавшихся обработке другими детергентами, на 14-е сутки эксперимента.

Таким образом, при использовании квантовых точек в иммуноцитохимических исследованиях важно учитывать влияние детергентов на их свойства. Можно предположить, что гашение флуоресценции квантовых точек связано с тем, что достаточно жесткие детергенты Triton X-100 и Tween 20, нарушая целостность не только плазматической, но и эндосомной мембраны, способны напрямую взаимодействовать с поверхностью QDs, изменяя оптические свойства нанокристаллов. Оптимальными детергентами в этом случае оказываются более мягкие детергенты Brij56 и дигитонин. Известно, что в отличие от Triton X-100 и Tween 20, эти детергенты



разрушают плазматическую мембрану, но слабо повреждают эндогенные мембраны. Среди проверенных нами детергентов особое место по механизму своего действия на клеточные мембраны занимает дигитонин. Известно, что дигитонин специфически экстрагирует из мембран холестерин (Linke, 2009). Учитывая тот факт, что холестерин в значительных количествах обнаруживается в составе плазматических мембран и мало представлен во внутренних мембранах (Lippincott-Schwartz J., Phair, 2010), в том числе в мембране эндосом, можно предполагать, что дигитонин слабо пермеабиллизует мембрану эндосом. Относительное сохранение целостности эндосомальной мембраны, в свою очередь, позволяет минимизировать непосредственный контакт квантовой точки с детергентом.

Таким образом, можно заключить, что использование лигандов, меченых QDs, наиболее эффективно в случаях анализа поведения меченых молекул в интактных клетках и/или эндосомах. Однако, если в ходе эксперимента существует необходимость в одновременном выявлении лигандов и антигенов, локализованных внутри эндосом, что, как правило, связано с обработкой клеток Тритоном X-100, следует учитывать описанный в нашей работе эффект гашения флуоресценции квантовых точек.

*Работа поддержана грантом Российского научного фонда (РНФ) № 14-50-0068, ФАНО России и Госзаданием.*

### Литература

- 1) Yoffe A. D. Semiconductor quantum dots and related systems: electronic, optical, luminescence and related properties of low dimensional systems //Advances in physics. 2001. Vol. 50, N 1. -- P. 1-208.
- 2) Dikic I. Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. -- 2003, Vol. 31 N 6 P. 1178-1181.
- 3) Salova A. V. Belyaeva, T. N., Leontieva, E. A., Zlobina, M. V., Kharchenko, M. V., & Kornilova, E. S. Quantum dots implementation as a label for analysis of early stages of EGF receptor endocytosis: a comparative study on cultured cells //Oncotarget. 2016. Vol. 7, N 5. P. 6029-6047.
- 4) Беляева Т. Н., Салова А. В., Леонтьева Е. А., Моженок Т. М., Корнилова Е. С., Кроленко С. А. Нецелевые квантовые точки в прижизненных конфокально-микроскопических исследованиях клеток //Цитология. 2009. Т. 51, №. 10. С. 830-836.
- 5) Salova A. V. Belyaeva, T. N., Leontieva, E. A., & Kornilova, E. S. EGF receptor lysosomal degradation is delayed in the cells stimulated with EGF-Quantum dot bioconjugate but earlier key events of endocytic degradative pathway are similar to that of native EGF //Oncotarget. 2017. Vol. 8, N 27. P. 44335-44350.
- 6) Linke D. Detergents: an overview //Methods in enzymology. Academic Press, 2009, Vol. 463. P. 603-617.
- 7) Lippincott-Schwartz J., Phair R. D. Lipids and cholesterol as regulators of traffic in the endomembrane system //Annual review of biophysics. 2010, Vol. 39. P.559-578.

## ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ МОЗОЛИСТОГО ТЕЛА МОЗГА ДЕТЕЙ ПО ДАННЫМ МРТ

**Краснощекова Е.И.<sup>1</sup>, Зыкин П.А.<sup>1</sup>, Ткаченко Л.А.<sup>1</sup>, Насыров Р.А.<sup>2</sup>**

*1 ФГБОУ ВО <<Санкт-Петербургский государственный университет>>;*

*2 ФГБОУ ВО <<Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет>> Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: krasnelena@gmail.com*

Цель настоящего исследования заключалась в сравнительной оценке состояния мозолистого тела на МР томограммах мозга детей разного возраста без патологий ЦНС и с детским церебральным параличом (ДЦП). С учетом того, что преждевременное рождение положительно коррелирует с ДЦП, по тому же алгоритму реализовано сравнительное исследование томограмм мозга доношенных и недоношенных детей раннего грудного возраста.

Материал и методы исследования. В исследование включены результаты обследования детей, проведенного на отделении лучевой диагностики Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета (СПбГПМУ). Все дети проходили обследование по назначению врача невролога в период с 2008 по 2013 годы. Новорожденные дети проходили МРТ обследования в 2011 год, в ходе стационарного лечения на отделении патологии новорожденных СПбГПМУ. По результатам обследования во всех случаях имелось заключение врача-радиолога. Родители или опекуны детей подписывали информированное согласие на использование результатов обследования в открытых публикациях, исследование одобрено этическим комитетом СПбГПМУ.

В первой части работы был проведен сравнительный анализ МР томограмм мозга детей обоих полов в возрасте от 2 до 11 лет без неврологических заболеваний (n = 50; 24 мальчика, 26 девочек) и их сверстников с диагнозом ДЦП (n = 60; 27 мальчиков, 33 девочки). Дети группы контроля проходили диагностическое обследование по поводу таких заболеваний как отит, синусит, ушиб головы. Изображения были получены на томографе General Electric Signa HDx с напряженностью поля 1,5 Т с использованием 8-ми канальной катушки приема сигнала, в режимах T1 и T2 f3d с шагом в 2 мм и толщиной среза 2,5 мм в сагиттальной и аксиальной проекциях.

Сравнительный анализ развития СС мозга детей с ДЦП и группы контроля проводили с учетом возраста пациентов. Принимая во внимание индивидуальную вариабельность психомоторного развития детей были выделены 8 возрастных подгрупп сравнения. Пол детей не учитывали ввиду малочисленности подгрупп сравнения.

Во второй части исследований был проведен сравнительный анализ 16 МР томограмм мозга детей раннего грудного возраста, рожденных на сроке гестации от 27 до 42 недель. Дети были обследованы однократно в первые недели после рождения в открытом томографе Siemens Magnetom Concerto 0.2 Т в режимах T1 и T2 f3d с толщиной среза 5 мм, шагом 5 мм, в двух проекциях - аксиальной и сагиттальной. Морфометрический анализ осуществляли при помощи свободно доступных программ просмотра и обработки изображений DICOM Viewer и NIH ImageJ [14, 16].

Все морфометрические исследования проводили на срединных сагиттальных томограммах мозга поэтапно и автоматически [4, 5], разделяя СС по схеме Вителсон [18] на 7 сегментов: клюв (СС1), колено (СС2), передняя (СС3), средняя (СС4) и задняя части ствола (СС5), перешеек (СС6), валик (СС7). В контексте поставленных задач точное выделение частей мозолистого тела особенно важно, так как транскаллозальные связи отличаются высокой упорядоченностью: в составе клюва, колена и передней части ствола проходят аксоны, соединяющие префронтальные области коры, в средней и задней частях ствола - премоторные и дополнительные моторные, в составе перешейка - пред- и постцентральные, аксоны связывающие затылочные и

височные области коры проходят в составе валика [9]. После выделения сегментов производили подсчет площади каждого из них и общей площади комиссуры.

В качестве интегрального морфометрического показателя был использован запатентованный нами метод вычисления коэффициента мозолистого тела -  $k_{CC}$  [4]. Формула коэффициента мозолистого тела является соотношением площадей сегментов переднего и заднего отделов мозолистого тела:  $k_{CC} = (CC2 + CC3) \times CC6 / CC7$ .

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 6.0. Применяли методы описательной статистики: среднее арифметическое, стандартное отклонение. В качестве критерия достоверности различий использовали U- критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования. Динамику развития  $CC$  мозга детей без неврологических патологий и ее изменение при ДЦП в разных возрастных подгруппах оценивали по общей площади  $CC$ , площади отдельных сегментов  $CC$  относительно площади всей комиссуры на срединном сагиттальном срезе, коэффициенту мозолистого тела ( $k_{CC}$ ). У детей группы контроля общая площадь  $CC$  с возрастом закономерно увеличивалась, его отдельные сегменты по абсолютным и относительным значениям площади изменялись по-разному. В группе контроля во всех возрастных подгруппах максимальную площадь имели колена и валик (сегменты  $CC2$  и  $CC7$ ). С возрастом абсолютная площадь этих сегментов поступательно росла, при этом относительная площадь валика незначительно возрастала, а колена --- нет. Абсолютные площади остальных сегментов ( $CC3$  -  $CC6$ ) менялись очень слабо, при этом наиболее стабильными оказались сегменты  $CC5$  (задняя часть ствола) и  $CC6$  (перешеек). Значения коэффициента  $k_{CC}$  в группе контроля выше, чем у детей с ДЦП во всех возрастных подгруппах.

Установлено пороговое значение  $k_{CC}$ , равное 200. При этом у 85% детей с ДЦП значения этого коэффициента было ниже 200, а у 78% детей группы контроля --- выше 200. Во всех возрастных подгруппах эти различия были достоверны ( $p \leq 0.01$ ), для подгруппы 5-6 лет порог достоверности был ниже ( $p \leq 0.05$ ).

Таким образом, примененный морфометрический анализ  $CC$  и коэффициент  $k_{CC}$  позволили охарактеризовать как возрастную динамику развития мозолистого тела, так и, с высокой степенью достоверности, различать мозг детей из группы контроля и с ДЦП.

Сравнение параметров  $CC$  на томограммах мозга детей раннего грудного возраста со сроком гестации от 27 до 42 недель гестации показали, что у недоношенных детей (27 - 36 недель) площадь  $CC$  в целом меньше, чем у детей, рожденных в срок ( $p \leq 0,01$ ). Значения  $k_{CC}$  у недоношенных детей были достоверно ниже, чем у доношенных, и ниже порогового уровня, равного 60. По этому признаку мозг недоношенных детей отличается от мозга детей рожденных в срок в 90 % случаев.

Заключение. Несмотря на развитие и широкое использование методов нейровизуализации, к настоящему времени отсутствует общепринятая классификация структурных нарушений мозга при ДЦП [11]. К самым чувствительным маркерам деструктивных процессов в центральной нервной системе при ДЦП относят мозолистое тело и кортико-спинальный тракт [12, 15]. Показатели фракционной анизотропии этих структур статистически значимо коррелируют с тяжестью двигательных нарушений при одной из самых распространенных форм ДЦП - спастической диплегии [12]. Сниженный коэффициент фракционной анизотропии (КФА) именно мозолистого тела, а не кортико-спинального тракта является точным индикатором моторного дефицита у детей с диплегической формой ДЦП, особенно в отношении тонких мануальных навыков [17]. Сниженная площадь всего  $CC$ , а также более выраженные, по сравнению с другими сегментами, гипоплазии валика у детей с ДЦП, могут быть следствием нарушения пренатального кортикогенеза [8, 10].

Показатель заболеваемости ДЦП в России значительно превышает известные средние значения по другим странам и колеблется в пределах 5-9 случаев на 1000 детей [1]. особенно значительно число пациентов с диагнозом ДЦП, поставленным впервые, возросло за последние

10 лет - с 7,1 тысячи человек в 2005 году до 7,7 тысяч в 2014 году [2]. Высокая заболеваемость ДЦП положительно коррелирует с ростом численности новорожденных с низкой и экстремально низкой массой тела на момент рождения, которую отмечают в РФ в последние годы. Отчасти это связано с введением в клиническую практику России критериев живорождения, рекомендованных ВОЗ [3]. Недоношенность чаще всего ассоциируется с отклонениями в структурно-функциональной организации мозга и, прежде всего, белого вещества [7, 13], несмотря на это, надёжные критерии ранней диагностики заболеваний внутриутробного генеза разработаны недостаточно.

В нашем исследовании анализ состояния мозолистого тела мозга детей разного возраста с особенностями развития и без таковых проведен по результатам анатомической МРТ. Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. у детей с ДЦП мозолистое тело тоньше, а коэффициент мозолистого тела (кСС) ниже, чем у их ровесников без неврологических патологий во всех возрастных группах. У 85% детей с ДЦП кСС ниже порогового значения, а у 78% детей группы контроля - выше;
2. у детей младшего грудного возраста мозолистое тело тоньше у недоношенных детей, в сравнении с доношенными. У 90 % недоношенных детей кСС ниже порогового уровня;
3. дети с неполным сроком гестации на момент рождения и значениями кСС ниже порогового могут быть с высокой вероятностью отнесены к группе риска по ДЦП.

### Литература

- 1) Акопян Т.А. Распространенность, медико-социальные аспекты и прогноз первичной инвалидности детей раннего возраста вследствие заболеваний нервной системы в крупном агропромышленном регионе. Сибирский медицинский журнал . 2008; 23(1--2): 52--54.
- 2) Антонова Л.К., Иванов А.А., Кольцова С.Ю., Блинецова Е.А. Клинико-патоморфологические особенности недоношенных детей, родившихся с экстремально низкой массой тела. Верхневолжский медицинский журнал. 2014; 2: 35-8.
- 3) Байбарина Е.Н., Дегтярев Д.Н. Переход на новые правила регистрации рождения детей в соответствии с критериями, рекомендованными всемирной организацией здравоохранения: исторические, медико-экономические и организационные аспекты. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2011; 6: 6--9.
- 4) Зыкин П.А., Краснощекова Е.И., Ткаченко Л.А., Ялфимов А.Н. Способ диагностики детского церебрального паралича (ДЦП). Патент на изобретение РФ №2473311. Доступен по: <https://patents.google.com/patent/RU2473311C1/ru> (дата обращения 01.12.2017).
- 5) Зыкин П.А., Ткаченко Л.А., Краснощекова Е.И., Программа автоматической сегментации мозолистого тела и расчета диагностического индекса (Callocometry). Свидетельство о государственной регистрации ЭВМ №2015661246 от 21 октября 2015.
- 6) Краснощекова Е.И., Зыкин П.А., Ткаченко Л.А., Смолина Т.Ю. Развитие пирамидных нейронов коры полушарий конечного мозга человека во втором триместре гестации. Физиология человека. 2010; 36(4): 65-71.
- 7) Doria V., Arichi T., Edwards D.A. Magnetic resonance imaging of the preterm infant brain. Curr Pediatr Rev. 2014; 10(1): 48--55. DOI:10.2174/157339631001140408120821.
- 8) Giampietri M., Bartalena L., Guzzetta A., Boldrini A., Ghirri P. New techniques in the study of the brain development in newborn. Front Hum Neurosci. 2014; 8: 1069. doi:10.3389/fnhum.2014.01069.

- 9) Hofer S., Frahm J. Topography of the human corpus callosum revisited--comprehensive fiber tractography using diffusion tensor magnetic resonance imaging. *Neuroimage*. 2006; doi:10.1016/j.neuroimage.2006.05.044.
- 10) Huppi P.S., Dubois J. Diffusion tensor imaging of brain development. *Semin.Fetal Neonatal Med*. 2006; 11: 489--97.
- 11) Korzeniewski S.J., Birbeck G., DeLano M.C., Potchen M.J., Paneth N. A systematic review of neuroimaging for cerebral palsy. *J Child Neurol*. 2008; 23(2):216-27. doi:10.1177/0883073807307983.
- 12) Lee J.D., Park H.J., Park E.S., Oh M.K., Park B., Rha D.W., Cho S.R., Kim E.Y., Park J.Y., Kim C.H., Kim D.G., Park C.I. Motor pathway injury in patients with periventricular leucomalacia and spastic diplegia. *Brain*. 2011; 134(Pt 4): 1199-210. doi: 10.1093/brain/awr021.
- 13) Pannek K., Scheck S.M., Colditz P.B., Boyd R.N., Rose S.E. Magnetic resonance diffusion tractography of the preterm infant brain: a systematic review. *Dev Med Child Neurol*. 2014; 56 (2): 113--124. doi:10.1111/dmcn.12250.
- 14) Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012; 9: 671-67.
- 15) Sheth R.D., Schaefer G.B., Keller G.M., Hobbs G.R., Ortiz O., Bodensteiner J.B. Size of the corpus callosum in cerebral palsy. *J Neuroimaging*. 1996; 6(3): 180-83.
- 16) The Tudor DICOM tools. <http://santec.tudor.lu/project/dicom>. Accessed 01 December 2017.
- 17) Weinstein M., Green D., Geva R., Schertz M., Fattal-Valevski A., Artzi M., Myers V., Shiran S., Gordon A.M., Gross-Tsur V., Bashat D.B. Interhemispheric and intrahemispheric connectivity and manual skills in children with unilateral cerebral palsy. *Brain Struct Funct*. 2014; 219(3):1025-40. doi:10.1007/s00429-013-0551-5.
- 18) Witelson S.F. Hand and sex differences in the isthmus and genu of the human corpus callosum. A postmortem morphological study. *Brain*. 1989; 112: 799-835.

## ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ МОДУЛЯЦИИ НОЦИЦЕПТИВНЫХ СИГНАЛОВ: ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ЛОКАЛЬНОЙ ФИКСАЦИИ ПОТЕНЦИАЛА, КОНФОКАЛЬНОЙ И АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

**Крылов Б.В., Пеннийянен В.А., Плахова В.Б.**

*Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук,*

*г. Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: krylov@infran.ru*

Оптогенетика - методика, которая позволяет изучать ответы нейронов на воздействие излучения в видимой области спектра - стала одним из самых перспективных достижений в области нейронаук за последние десятилетия. В основе этой методики лежит использование светочувствительных ионных каналов, опсинов. Их внедрение в клеточную мембрану приводит к приобретению клеткой чувствительности к фотонам видимой области спектра. Оно достигается с помощью вирусных векторов, кодирующих белки фотоканалов. В результате в ответ на вспышки света происходит возбуждение или ингибирование ответов нейронов. При этом постулируется, что нейроны остаются интактными, а их генетическая модификация не должна сказаться на достоверности результатов изучения нервной системы.

В наших исследованиях мы основывались, наш взгляд, на несколько ином подходе, сущность которого сформулировал профессор Безания в виде вопроса о том, можно ли использовать излучение для активации интактных, не модифицированных генетически нейронов [1]. Наши результаты свидетельствуют о возможности применения низкоинтенсивного инфракрасного (ИК) лазерного излучения для модуляции возбудимости ноцицептивного нейрона. Этот подход, как и фармакологическое воздействие на мембрану нервной клетки, позволил нам не только начать изучение запускаемых ими внутриклеточных сигнальных процессов, но и предложить новые подходы к лечению хронической боли.

Ранее в мембране ноцицептивного нейрона нами был обнаружен новый сигнальный каскад, включающий в себя опиоидоподобный рецептор, Na,K-АТФазу и  $Na_v1.8$  канал [2,3]. В соответствии с нашими данными, антиноцицептивная реакция указанного нейрона может быть обусловлена модуляцией трех различных молекулярных механизмов, запускаемых указанными выше тремя различными мишенями, причем Na,K-АТФаза выполняет здесь функцию трансдуктора сигнала. Хорошо известно, что каналы  $Na_v1.8$  играют ключевую роль в первичном сенсорном кодировании ноцицептивных сигналов. При лиганд-рецепторном связывании с обнаруженным нами опиоидоподобным рецептором требуется тончайшая подстройка атакующих молекул к сайтам связывания мембранных белков. Так, коеновая кислота, являющаяся лекарственной субстанцией неопиоидного анальгетика <<аноцептина>>, должна разнести на расстояние около 0.8 нанометров два иона кальция: хелатированный ион и ион кальция, превращающий ее в кальциевую соль в физиологическом растворе. Любые структурные модификации производных гамма-пирона, изменяющие это расстояние между указанными атомами, приводят к потере анальгетической активности [4]. Эти данные свидетельствуют о том, что более грубое вмешательство атакующих молекул, включая использование наноструктур (см. [1]), в механизмы активации и функционирования внутриклеточных каскадных процессов, может привести к неадекватным результатам.

Нами разрабатывается подход, направленность которого прямо противоположна оптогенетическому методу. Выше было отмечено, что Na,K-АТФаза способна выполнять еще одну, не насосную, а тансдукторную функцию, передавая сигналы как к каналам  $Na_v1.8$ , так и на геном клетки. Специфическая модуляция этой функции Na,K-АТФазы может осуществляться как с наружной стороны мембраны при воздействии низких (<<эндогенных>>) концентраций

уабаина [5], так и с внутренней стороны мембраны клетки при воздействии низкоинтенсивного (нетеплового) излучения CO<sub>2</sub> лазера [6]. В последнем случае ИК излучение взаимодействует с молекулами АТФ, находящимися в сайте их гидролиза, расположенном на молекуле Na,K-АТФазы с внутренней стороны мембраны.

Трансдуктор-опосредованный механизм передачи сигнала в радиальном направлении на геном нервной клетки может привести к модуляции экспрессии каналов Na<sub>v</sub>1.8, что позволит установить возможную связь между генетическим кодом (речь идет о влиянии на ген SCN10A) и кодом нервных импульсов, ноцицептивная компонента которого определяется функциональной активностью каналов Na<sub>v</sub>1.8. С помощью методов локальной фиксации потенциала, конфокальной и атомно-силовой микроскопии нам удалось установить, что важнейшую роль в этих внутриклеточных каскадных процессах играет Src-киназа.

Дальнейшие исследования механизмов действия ИК излучения на геном клетки и на каналы Na<sub>v</sub>1.8 необходимы для разработки и обоснования применения медицинского изделия - низкоинтенсивного CO<sub>2</sub> лазера для физиотерапии, способного купировать хроническую боль периферического происхождения.

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 18-015-00079.*

### Литература

- 1) Carvalho-de-Souza J. L., Treger J. S., Dang B., Kent S. B.H., Pepperberg D. R., Bezanilla F. Photosensitivity of Neurons Enabled by Cell-Targeted Gold Nanoparticles // *Neuron*. 2015. V. 86, N 1. P. 207--217.
- 2) Крылов Б.В., Дербенев А.В., Подзорова С.А., Людино М.И., Кузьмин А.В., Изварина Н.Л. Морфин уменьшает чувствительность к потенциалу медленных натриевых каналов // *Физиол. журнал*. 1999. Т. 85. № 2. С. 225-236.
- 3) Krylov B.V., Rogachevskii I.V., Shelykh T.N., Plakhova V.B. *Frontiers in pain science*. Volume 1. New nonopioid analgesics: understanding molecular mechanisms on the basis of patch-clamp and quantumchemical studies. Bentham Science Publishers Ltd., Sharjah, U.A.E. 2017, 203 p.
- 4) Krylov B.V., Rogachevsky I.V., Plakhova V.B. Substance with sedative effect. US Patent 8476314 B2, 2013.
- 5) Lopatina E.V., Yachnev I.L., Penniyaynen V.A., Plakhova V.B., Podzorova S.A., Shelykh T.N., Rogachevsky I.V., Butkevich I.P., Mikhailenko V.A., Kipenko A.V., Krylov B.V. Modulation of signal transducing function of neuronal membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief // *Medicinal Chem*. 2012. V. 8. N1. P. 33-39.
- 6) Yachnev I.L., Plakhova V.B., Podzorova S.A., Shelykh T.N., Rogachevsky I.V., Krylov B.V. Mechanism of pain relief by low-power infrared irradiation: ATP is an IR-target molecule in nociceptive neurons // *Medicinal chem*. 2012. V. 8. N 1. P.14-21.

## ОПТИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ОТВЕТЫ КАРДИОМИОЦИТОВ В ИЗОЛИРОВАННОМ СЕРДЦЕ КРЫСЫ ПРИ РАЗВИТИИ ГИПОКСИИ

Кубасов И.В.<sup>1</sup>, Бобков Д.Е.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук; <sup>2</sup>Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

E-mail: Kubasov\_igor@mail.ru

Аберрантное освобождение кальция из саркоплазматического ретикулума может являться причиной аритмогенеза при ряде сердечных нарушений, в том числе при ишемии (1). Одной из форм такого аберрантного освобождения являются спонтанные пространственно-временные изменения уровня  $Ca^{2+}$  в цитоплазме (спорадические  $Ca^{2+}$ - волны), наблюдаемые как в изолированных кардиомиоцитах (2,3), так и в опытах *in situ*, включая перфузируемое сердце (4,5). Однако, источники этих волн, условия их появления, а также их роль и влияние на сердечную функцию изучены недостаточно. Целью данной работы было выяснить, может ли гипоксия, как один из многих факторов ишемического повреждения миокарда, являться триггером спорадических  $Ca^{2+}$ - волн, и если так, то могут ли эти волны влиять на электрическую активность интактных кардиомиоцитов в работающем сердце. Исследования проводились на перфузируемых по методу Лангендорфа изолированных сердцах крыс линии Вистар в условиях сохраненного синусового ритма. С использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 и микроэлектродной внеклеточной регистрации были выполнены исследования оптических и электрических ответов кардиомиоцитов субэпикардальных слоев миокарда правого желудочка при нормоксии (перфузия сердца аэрируемым раствором) и гипоксии (перфузия сердца неаэрируемым раствором). Для регистрации электрических ответов использовалась авторская методика микроэлектродного картирования интактных кардиомиоцитов наружной поверхности миокарда - narrow tipped pipettes loose patch (6,7) с использованием микроэлектродов с диаметром кончика 5 мкм. Все эксперименты проводились при комнатной температуре. Для проведения спектрального анализа были выбраны участки миокарда размером 400x400 мкм, в которых производилась регистрация изменений интенсивности флуоресценции загруженного в сердце красителя Fluo-4 во времени (режим хут) в течение 110 сек с временным разрешением 17 кадров/сек. Флуоресцентный сигнал измерялся в определенных областях интереса (region of interest, ROI) и располагающихся, как правило, в пределах отдельных кардиомиоцитов. Как показано на рис.1А, в условиях аэрации в кардиомиоцитах обоих желудочков наблюдались только интегральные кальциевые сигналы, соответствующие синусовому ритму (0.5-1 Гц). Через 15-20 минут после прекращения аэрации наблюдалось появление локальных зон повреждения, характеризующихся увеличенным числом кардиомиоцитов с повышенным содержанием ионов  $Ca^{2+}$  и формирующих, на фоне синусового ритма, спорадические  $Ca^{2+}$ - волны (рис.1Б). Интересно, что такие зоны повреждения носили <<очаговый>> характер и чередовались с зонами кардиомиоцитов, сохраняющих нормальный ритм освобождения  $Ca^{2+}$ , без формирования  $Ca^{2+}$ - волн. Частота и интенсивность спорадических волн, как и концентрация  $[Ca^{2+}]_i$  возрастали до  $2,6 \pm 0,12$  (3 сердца, 12 ROI) волн в секунду в кардиомиоцитах, максимально приближенных к центру очага повреждения. Помимо появления спорадических волн, в этих клетках наблюдалось существенное укорочение времени полуспада интегральных кальциевых ответов с  $382 \pm 42$  мс при нормоксии (3 сердца, 21 ROI) до  $212 \pm 47$  мс (3 сердца, 18 ROI). Таким образом, полученные результаты прямо указывают на то, что гипоксия может быть триггером спорадических  $Ca^{2+}$ - волн и формировать не просто аномалии освобождения кальция на уровне единичных клеток, а создавать определенную кластерную сеть из таких миоцитов. При этом, как показывает выполненный анализ, такие волны могут возникать как в пределах одной клетки, так и распространяться от одной клетки к другой.

В микроэлектродных исследованиях в различных зонах субэпикардальных слоев миокарда



правого желудочка в аэрируемом сердце регистрировались внеклеточные авторитмические ПД с амплитудой 5-10 мВ (рис.2А). Из представленного рисунка видно, что амплитудно-временные характеристики регистрируемых ПД практически не зависят от зоны их регистрации. Такие ответы ранее уже были охарактеризованы в ряде наших работ (6, 7). После прекращения аэрации перфузирующего сердца раствора через 15-20 минут на фоне сохраняющегося синусового ритма внеклеточных ПД в отдельных зонах миокарда наблюдалось появление экстрасистольных аберрантных электрических ответов (рис.2Б). Такие ответы могли носить как регулярный, так и нерегулярный характер и значительно зависели от локализации кончика микроэлектрода на поверхности миокарда. По мере увеличения времени гипоксии происходило достоверное снижение амплитуды регистрируемых ПД синусового ритма. На 30-й минуте гипоксии амплитуда ПД снижалась до  $84.4 \pm 8 \%$  по отношению к контролю (3 сердца, 32 регистрации). Одновременно наблюдалось увеличение их длительности (до  $133 \pm 7 \%$  к контролю), как за счет увеличения времени восходящей фазы, так и за счет увеличения длительности фазы спада. Одновременно наблюдалось появление и рост амплитуды экстрасистольных ответов и переход от их эпизодического характера проявления к ритмогенному. При этом частота ведущего синусового ритма практически не менялась. Таким образом, на основании полученных результатов можно прийти к заключению, что гипоксия может вызывать аберрантное освобождение кальция, проявляющееся в виде распространяющихся по кардиомиоцитам и между ними спорадических кальциевых волн. Эти волны могут дополнительно повышать электрогенную активность мембраны кардиомиоцитов и, вероятно, служить в качестве субстрата для формирования сердечного аритмогенеза. Важно отметить противоположные изменения в динамике спадов флуоресцентных и электрических ответов. Предположительно, такие изменения могут быть обусловлены активацией электрогенного  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  обменника (NCX), ведущей к увеличению скорости экструзии  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы (и, соответственно, к укорочению времени спада флуоресцентного кальциевого сигнала). Одновременно, в силу электрогенного характера NCX, возникают дополнительные входящие трансмембранные  $\text{Na}^+$  токи, продлевающие авторитмические внеклеточные ПД и инициирующие повторные ответы. Однако более детальный анализ механизмов, лежащих в основе появления спорадических кальциевых волн, так и аберрантных электрических ответов, требует проведения дальнейших исследований.

*Представленная работа выполнена в рамках темы Госзадания № АААА-А18-118012290371-3.*

### Литература

- 1) Stables C.L., Curtis M.J. Development and characterization of a mouse in vitro model of ischaemia induced ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2009; 83:397--404.
- 2) Takamatsu T., Wier W.G. Calcium waves in mammalian heart: quantification of origin, magnitude, and velocity. *FASEB J.* 1990;4:1519 --1525.
- 3) Ishide N., Urayama T., Inoue K., Komaru T., Takishima T. Propagation and collision characteristics of calcium waves in rat myocytes. *Am J Physiol.* 1990;259:H940--H950.
- 4) Minamikawa T., Cody S.H., Williams D.A. In situ visualization of spontaneous calcium waves within perfused whole heart by confocal imaging. *Am J Physiol.* 1997;272:H236--H243;
- 5) Kaneko T., Tanaka H., Oyamada M., Kawata S., Takamatsu T. Three distinct types of  $\text{Ca}^{2+}$  waves in Langendorff-perfused rat heart revealed by real-time confocal microscopy. *Circ Res* 2000; 86: 1093--1099.
- 6) Kubasov I.V., Stepanov A.V., Györke S. Action potential heterogeneity as revealed by extracellular microelectrode recording from the surface of the isolated rat heart // *Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii*, 2017; 53, No. 6, 456--- 459.

- 7) Kubasov I.V., Stepanov A., Bobkov D., Radwanski P.B., Terpilowski M.A, Dobretsov M. and Gyorke S. Sub-cellular Electrical Heterogeneity Revealed by Loose Patch Recording Reflects Differential Localization of Sarcolemmal Ion Channels in Intact Rat Hearts. *Front. Physiol.* 2018; 9:61.

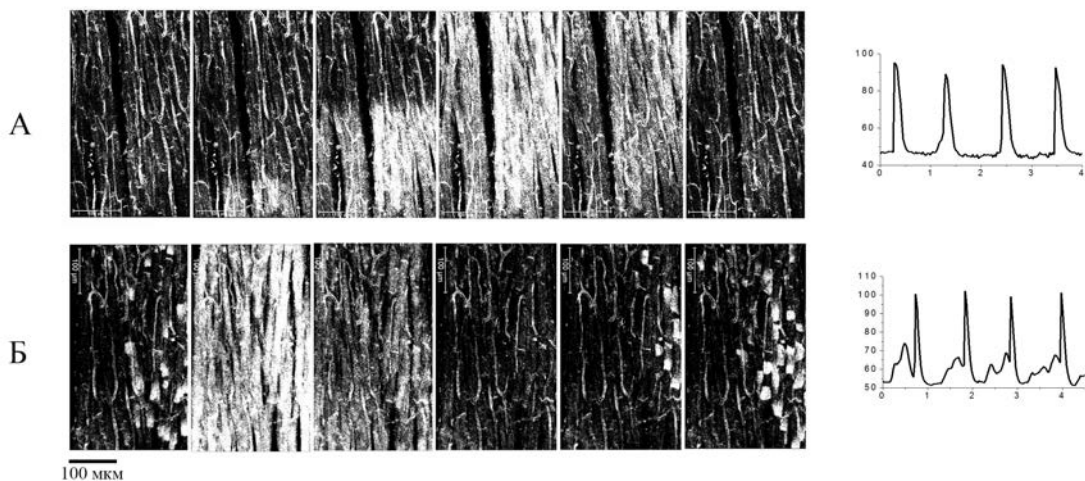


Рис. 1. Покадровая развертка оптических срезов эпикардального участка миокарда изолированного работающего сердца крысы, окрашенного Fluo-4 при нормоксии (А) и через 20 минут после начала гипоксии (Б). Справа представлены соответствующие примеры записей кальциевых ответов в одной из областей интересов (ROI). По вертикальной оси -- время (интенсивность флуоресценции, условные единицы), по горизонтальной оси -- время (сек).

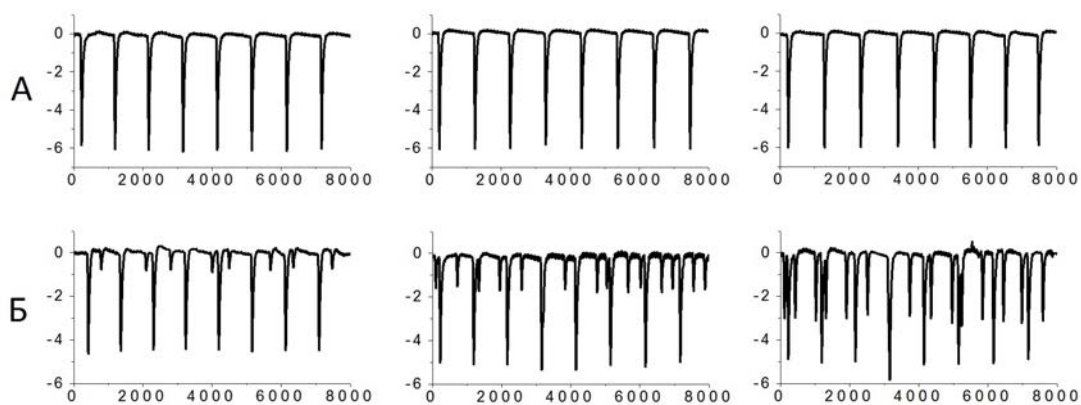


Рис. 2. Примеры записей ПД, внеклеточно регистрируемых от трех различных зон наружной поверхности миокарда правого желудочка при нормоксии (А) и через 30 минут после начала гипоксии (Б). По вертикальной оси -- время (амплитуда, мВ), по горизонтальной оси -- время (мсек).

## **ИМИДЖИНГ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ: ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ**

**Литвинов И.К.<sup>1,2</sup>, Беляева Т.Н.<sup>1</sup>, Баженова А.С.<sup>2</sup>, Леонтьева Е.А.<sup>1</sup>, Орлова А.О.<sup>2</sup>,  
Корнилова Е.С.<sup>1,2,3,4</sup>**

<sup>1</sup>*Институт Цитологии РАН;*

<sup>2</sup>*Университет ИТМО;*

<sup>3</sup>*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого;*

<sup>4</sup>*Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: lik314@mail.ru*

В настоящее время для имиджинга биологических объектов активно начинают использовать полупроводниковые нанокристаллы, известные как квантовые точки (КТ). Подобные наноструктуры обладают уникальными спектрально-люминесцентными свойствами, такими, как зависимое от химического состава ядра и его размера излучение, покрывающее спектр от видимых до инфракрасных длин волн, большие коэффициенты поглощения в широком спектральном диапазоне, высокие уровни яркости и фотостабильности, узкие спектры люминесценции. Нанокристаллы имеют ядра размером 2-10 нм, состоящие из молекул на основе элементов II-VI или III-V групп периодической системы, таких как CdSe, CdTe, InP, и др. [5]. В большинстве случаев для увеличения квантового выхода люминесценции ядро покрывают слоем ZnS. Синтезированные КТ обычно являющиеся гидрофобными, для обеспечения растворимости в водных растворах их покрывают органической оболочкой. Наличие свободных групп на поверхности органической оболочки позволяет создавать наноструктуры, содержащие, помимо самой люминесцирующей КТ, различные антитела, пептиды и малые молекулы, обеспечивающие таргетную доставку наноструктур в клетки. Чаще всего в качестве органической оболочки применяется ПЭГ, т.к. он является химически инертным, а в его составе имеются первичные гидроксильные радикалы, которые позволяют получать различные производные с активными функциональными группами [9,12]. Показано, что ПЭГ уменьшает неспецифическое связывание с биологическими мембранами и поглощение КТ клетками [8]. Также важно отметить, что оболочка из ПЭГ значительно увеличивает размеры наноструктуры. Альтернативным вариантом материала для органической оболочки является цистеин. Данное соединение способно связываться с поверхностью КТ ковалентно благодаря тиольной группе, а наличие карбоксильной и аминогруппы позволяет создавать многокомпонентные зондовые системы [3], однако взаимодействие таких КТ с клетками исследовано недостаточно.

В процессе применения КТ в биологических и медицинских исследованиях, нанокристаллы специфическим или неспецифическим способом проникают в клетки, при этом КТ могут подвергаться различным повреждающим факторам таким, как фотолиз, окисление, низкое значение pH и т.п. [1,2,4,7,11]. Под действием подобных факторов может происходить разрушение целостности КТ с последующим выходом материала в окружающую среду. Как следствие, в результате этого процесса могут измениться и фотофизические характеристики наноструктур. Поэтому важно отметить, что как неорганическая оболочка (слой ZnS), так и органическая (ПЭГ, цистеин и т.п.) играют важную роль в обеспечении целостности структуры КТ. Проблема целостности КТ напрямую связана с вопросом цитотоксичности наноструктур, а также с вопросом адекватности интерпретации анализа люминесцентного сигнала при его регистрации в процессе имиджинга биологического объекта. В связи с этим, первой задачей данного исследования являлось изучение меченых клеток с помощью КТ на основе CdSe/ZnS с L-цистеином, а также КТ на основе InP/ZnS, покрытые ПЭГ, содержащим реактивные группы -COOH и -

NH<sub>2</sub>. Второй задачей было изучение изменений спектрально-люминесцентных характеристик данных КТ в клетках и модельных растворах.

В работе использовали макрофагоподобные клетки асцита мыши линии J774 и клетки карциномы человека линии HeLa (Российская коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали во флаконах 25 см<sup>2</sup> (Nunc, США) в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 20 мМ глутамина, 10 % сыворотки крови плодов коровы и 0.1 % гентамицина, в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 оС. Клетки для экспериментов сеяли на чашки Петри (Nunc, США) или на покровные стекла в чашках Петри. Эксперименты проводили через 48 ч после посева при достижении клетками 60-70 % монослоя. Все КТ в необходимых концентрациях добавляли в среду культивирования клеток на 24 ч.

С помощью конфокальной микроскопии (Olympus FV3000, Япония) была проведена визуализация наноструктур в живых клетках. Использовали иммерсионный объектив 60/1.42. Флуоресценцию всех КТ возбуждали лазером 405 нм и регистрировали в областях 520-620 нм (для CdSe/ZnS) и 600-680 нм (для InP/ZnS). Получали изображения одиночных оптических срезов или Z-серии с шагом 0.5 мкм (10-20 последовательных оптических срезов). Кроме того, флуоресценцию КТ исследовали с помощью режима спектрального сканирования (Mode/xyλ) в интервале 520-700 нм с шагом 5 нм. Помимо этого, был проведен сравнительный анализ фотофизических характеристик КТ различной структуры, а также изменение их характеристик под действием различных внешних факторов. Фотофизические характеристики оценивались методами стационарной спектроскопии (спектрофотометр UV-3600, Shimadzu, Япония и спектрофлуориметре Cary Eclipse, Aligent, США). Для измерения времен затухания люминесценции КТ применяли лазерный сканирующий люминесцентный микроскоп MicroTime 100 (PicoQuant, Германия).

В процессе исследования использовали КТ на основе InP/ZnS, покрытые ПЭГ с NH<sub>2</sub>- группами (КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub>) и КТ на основе InP/ZnS, покрытые ПЭГ с COOH-группами (КТ-ПЭГ-COOH), производства Mesolight, Китай. Максимум люминесценции КТ обоих типов на основе InP был при 640 нм. Также анализировали КТ на основе CdSe/ZnS диаметром 6 нм, с максимумом люминесценции при 570 нм, которые были синтезированы на базе университета ИТМО. Исходно, гидрофобные КТ были солюбилизированы с помощью покрытия их поверхности L-цистеином методом межфазного переноса.

В первой части работы анализировали InP/ZnS КТ. Важно отметить, что КТ на основе InP рассматриваются в качестве перспективной альтернативы CdSe КТ, в связи с тем, что Cd является токсичным элементом. Известно, что выход ионов Cd<sup>2+</sup> в цитоплазму может привести к последующему их присоединению к различным белкам через сульфгидрильные группы и нарушению внутриклеточных процессов. Поскольку InP/ZnS КТ покрыты ПЭГ, работа была проведена с клетками линии макрофагоподобных клеток асцита мыши J774, являющимися профессиональными макрофагами, способными поглощать крупные, размером в несколько микрон, частицы. Таким образом, размер функционализированных КТ (15-20 нм) не должен быть препятствием для их поступления в фагосомы клеток J774. В процессе изучения изменения фотофизических характеристик КТ оценивалось влияние функциональных групп на изменение уровня люминесценции. Анализ конфокальных изображений показал, что оба типа InP/ZnS КТ легко идентифицируются в клетках линии J774 после 24 часов инкубации. Исследование спектрально-люминесцентных характеристик показало, что максимумы флуоресценции КТ в клетках соответствуют максимумам флуоресценции в водных растворах. Таким образом, КТ на основе InP/ZnS могут применяться в качестве метки для идентификации макрофагов. Важно отметить, что поскольку КТ на основе InP/ZnS имеют оболочку из ПЭГ со свободными -COOH и -NH<sub>2</sub> группами, то наблюдается некоторое различие в распределении КТ по объему клеток. В последние годы методы обработки и анализа флуоресцентных изображений клеток получили очень широкое распространение, в частности, для оценки количественных парамет-

ров динамики таких процессов, как эндоцитоз [6,10]. При анализе и оценке накопления КТ в клетках важно учитывать что наноструктуры могут накапливаться в кислых компартаментах клеток. В связи с этим необходимо оценить изменения спектрально-люминесцентных свойств в модельной системе при рН, соответствующем рН кислых компартиментов клеток, по сравнению с нейтральным рН. Показано, что уровень интенсивности люминесценции при инкубации InP/ZnS КТ-ПЭГ-СООН в растворе PBS снижается на 19.4% при рН 4. В то же время уровень интенсивности люминесценции InP/ZnS КТ с группами -NH<sub>2</sub> снижается на 52%. Анализ кинетики люминесценции КТ в растворах с рН 4 выявил падение времен жизни люминесценции КТ-ПЭГ-СООН и КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> с 23 до 21,6 нс и с 19,7 до 18 нс, соответственно.

Во второй части работы анализировали КТ на основе CdSe/ZnS, солюбилизованные L-цистеином. Использование КТ на основе CdSe/ZnS в данном эксперименте позволяет сопоставить характеристики КТ различной структуры. Солюбилизация L-цистеином образует наноструктуру меньшего размера, по сравнению с КТ с ПЭГ-оболочкой. Поскольку в дальнейшем требуется формировать комплекс, содержащий антитела или иные молекулы, обеспечивающие таргетную доставку наноструктур в клетки, исходная платформа должна быть наиболее компактной. В связи с этим, КТ с L-цистеином должны иметь преимущества в таргетной доставке эндоцитозом. В настоящий момент техника солюбилизации L-цистеином отработана в большей степени для КТ CdSe/ZnS. В ходе эксперимента было показано, что КТ с L-цистеином поглощаются клетками, не являющимися профессиональными макрофагами, а именно клетками линии HeLa. Показано, что после инкубации КТ с клетками в течение 24 часов внутри клеток обнаруживаются везикулоподобные структуры, содержащие КТ. Важно отметить, что помимо КТ, вошедших в клетки, наблюдались КТ, связанные с внешней стороной мембран клеток. Исследование спектрально-люминесцентных характеристик показало, что максимум флуоресценции КТ с L-цистеином в клетках соответствуют максимуму флуоресценции в водных растворах PBS. Аналогично с КТ на основе InP было проведено исследование изменения уровня люминесценции КТ в растворах с различным рН. Подобно InP, у КТ CdSe/ZnS с L-цистеином уменьшается интенсивность люминесценции в растворах с рН 4 (падение на 80%). Анализ кинетики люминесценции КТ в растворах с рН 4 выявил падение времен жизни люминесценции КТ с 2,9 до 0,86 нс.

Таким образом, в данной работе показано, что все три типа наноструктур обнаруживаются в клетках в компартаментах, доступных для анализа спектрально-люминесцентных характеристик. Кроме того, для изучения распределения наноструктур в клетках важно учитывать влияние уровня рН на фотофизические свойства КТ.

## Литература

- 1) Aldana J., Lavelle N., Wang Y. J., Peng X. G. Size-dependent dissociation pH of thiolate ligands from cadmium chalcogenide nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 2496--2504. 2005.
- 2) Aldana J., Wang Y. A., Peng X. Photochemical instability of CdSe nanocrystals coated by hydrophilic thiols. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 8844--8850. 2001.
- 3) Bai W., Mehra R.K. Cysteine-capped ZnS nanocrystallites: preparation and characterization. *J. Inorg. Biochem.* 70: 125--135, 1998.
- 4) Bentzen E. L., Tomlinson I. D., Mason J., Gresch P., Warnement M. R., Wright D., Sanders-Bush E., Blakely R., Rosenthal S. J. Surface modification to reduce nonspecific binding of quantum dots in live cell assays. *Bioconjug. Chem.* 16: 1488--1494. 2005.
- 5) Bruchez M., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A. P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science.* 281: 2013--2016. 1998.

- 6) Collinet C., Stoter M., Bradshaw C. R., Samusik N., Rink J. C., Kenski D., Habermann B., Buchholz F., Henschel R., Mueller M. S., Nagel W. E., Fava E., Kalaidzidis Y., Zerial M. Systems survey of endocytosis by multiparametric image analysis. *Nature*. 464: 243--249. 2010.
- 7) Derfus A. M., Chan W. C. W., Bhatia S. N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.* 4: 11--18. 2004.
- 8) Hild W. A., Breunig M., Goeperich A. Quantum dots -- nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68: 153--168. 2008.
- 9) Monfardini C., Veronese F. M. Stabilization of substances in circulation. *Bioconjug. Chem.* 9: 418--450. 1998.
- 10) Tonti S., Di Cataldo S., Bottino A., Ficarra E. An automated approach to the segmentation of hep-2 cells for the indirect immunofluorescence ANA test. *Comput. Med. Imaging Graph.* 40: 62--69. 2015.
- 11) Uyeda H. T., Medintz I. L., Jaiswal J. K., Simon S. M., Mattoussi H. Synthesis of compact multidentate ligands to prepare stable hydrophilic quantum dot fluorophores. *Am. Chem. Soc.* 127: 3870--3878. 2005.
- 12) Zalipsky S. Functionalized Poly(ethylene glycols) for Preparation of Biologically Relevant Conjugates. *Bioconjugate Chem.* 6 (2): 150--165. 1995.

## СОДЕРЖАНИЕ СЕРТОНИНОВЫХ И ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ ПРООПИОМЕЛАНКОРТИН-ИММУНОПОЗИТИВНЫХ НЕЙРОНАХ МЫШЕЙ С ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННЫМ И МЕЛАНКОРТИНОВЫМ ОЖИРЕНИЕМ

Михайлова Е.В., Романова И.В., Деркач К.В., Бондарева В.М., Шпаков А.О.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,  
г. Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: elenamikhailova87@gmail.com*

Одним из ключевых компонентов регуляции пищевого поведения и энергетического обмена являются интегративные взаимодействия между различными сигнальными системами гипоталамуса и других отделов мозга. Имеются основания полагать, что важную роль в реализации таких взаимодействий играют гипоталамические серотониновая и дофаминовая сигнальные системы и, в первую очередь их рецепторные компоненты. Однако сведения о содержании и локализации серотониновых (5-HT<sub>R</sub>) и дофаминовых (DR) рецепторов на гипоталамических нейронах крайне скудные, а данные о влиянии на эти показатели различных форм ожирения в настоящее время отсутствуют. Исследование гипоталамических 5-HT<sub>R</sub> и DR в норме и при ожирении имеет исключительно важное значение для понимания фундаментальных основ функционирования моноаминергических систем мозга, а также для расшифровки молекулярных механизмов развития метаболических расстройств. Цель работы состояла в изучении содержания и локализации 5-HT<sub>R</sub> 1B- и 2C-подтипов (5-HT<sub>1BR</sub>, 5-HT<sub>2CR</sub>) и DR 1-го и 2-го типов (D1R, D2R) на телах нейронов аркуатных ядер гипоталамуса, продуцирующих проопиомеланокортин (ПОМК), контрольных C57Bl/6J (*a/a*) мышей, а также мышей с диета-индуцированным (ДИО) и меланокортиновым ожирением (МО), для чего использовали иммуногистохимические подходы и количественную ПЦР. ДИО развивалось вследствие потребления животными высокожировой/высокоуглеводной диеты в течение 9 недель. В качестве модели МО использовали C57Bl/6J (*A<sup>y</sup>/a*) мышей с мутацией в *Agouti*-локусе, которая приводила к гиперэкспрессии агути-сигнального пептида, ингибирующего меланокортиновые рецепторы 4-го типа. У мышей с ДИО и МО отмечали нарушенную толерантность к глюкозе, гиперинсулинемию, гиперлептинемию, дислипидемию. С помощью двойного иммуномечения на ПОМК-нейронах мышей были выявлены 5-HT<sub>1BR</sub>, 5-HT<sub>2CR</sub>, D1R и D2R, причем для всех рецепторов, за исключением 5-HT<sub>2CR</sub>, такая локализация была показана впервые. Плотность 5-HT<sub>2CR</sub> на ПОМК-нейронах была выше, чем для 5-HT<sub>1BR</sub>. Значительная часть D1R и D2R были локализованы, что может указывать на образование ими D1R/D2R-гетеродимерных комплексов. В условиях ДИО отмечали снижение числа D2R, в то время как содержание других рецепторов практически не менялось. У агути-мышей с МО число D1R снижалось, в то время как содержание D2R, 5-HT<sub>1BR</sub> и 5-HT<sub>2CR</sub> повышалось, в наибольшей степени для 5-HT<sub>2CR</sub>. Результаты, полученные с помощью иммунохимических методов, были подтверждены данными уровня экспрессии мРНК в аркуатных ядрах гипоталамуса. Таким образом, нами впервые показана локализация различных типов 5-HT<sub>R</sub> и DR на ПОМК-иммунопозитивных нейронах, а также специфические изменения их содержания в условиях различных типов ожирения.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 16-15-10388).*

## **ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДОФАМИНА НА ОРЕКСИНЕРГИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ ПЕРИФОРНИКАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ**

**Морина И.Ю., Романова И.В.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,  
г. Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: irinamorina@mail.ru*

Нейроны перифорникальной области гипоталамуса вовлечены в регуляцию различных структур мозга и, соответственно, его функций. Показано, что в перифорникальной области гипоталамуса расположенные нейроны, вырабатывающие орексины (А и В) - два пептида, образующиеся из общей молекулы-предшественника. Двойное флуоресцентное иммуномечение и конфокальная микроскопия позволяют выяснить морфологические и биохимические основы, которые обеспечивают интегративные взаимодействия между различными регуляторными системами мозга. Целью проведенного нами исследования было выяснить пути влияния дофамина на нейроны, вырабатывающие орексины. Исследование проводили на свободноплавающих (20 мкм) срезах перфузированного мозга крысы Вистар, которые получали с помощью криостата и инкубировали в <<коктейле>>, содержащем различные комбинации первичных антител: кролика к орексину А (Sigma), мыши к D1 рецепторам дофамина (Millipore), кролика к D2 рецепторам дофамина (Millipore), мыши к глутаматдекарбоксилазе 65 (Abscam) и 67 (Millipore) - маркеров ГАМК-нейронов. Реакцию визуализировали с помощью соответствующих вторичных антител, конъюгированных с флуорохромами (Invitrogen): цыпленка против кролика с Alexa-488 и осла против мыши с Alexa-568. Для визуализации ядер использовали краситель DAPI. Анализ срезов проводили с помощью конфокального микроскопа DM16000, лазерной установки SP5 II (Leica Microsystems, Германия) или мультифотонной установки. Использовали иммерсионный объектив х63 и лазеры с длиной волны возбуждения 488, 568 нм, а также 355 нм для DAPI. Изображения анализировали с помощью пакета программ Leica LAS AF, подготовку к демонстрации проводили с помощью программы Photoshop CS3. Полученные результаты свидетельствуют об экспрессии D1 рецепторов дофамина как в орексинергических нейронах, так и в окружающих их нейронах, синтезирующих ГАМК - основной тормозный медиатор ЦНС. Показана высокая степень колокализации D1 и D2 рецепторов в перифорникальной области гипоталамуса, что свидетельствует об образовании гетеродимерных D1/D2 комплексов дофаминовых рецепторов. Полученные данные демонстрируют возможность влияния дофамина на орексинергические нейроны как прямым путем через D1- или D2 рецептор-зависимые сигнальные пути, так и опосредованного, через регуляцию их взаимодействий с ГАМК-нейронами.

*Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН на средства государственного бюджета по госзаданию № АААА-А18-118012290372-0.*



## КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНОВОЙ ПАТОЛОГИИ В ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА В МОДЕЛИ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ СТАДИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС СРЕДНЕГО ВОЗРАСТА

Плаксина Д.В., Екимова И.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,  
г. Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: daf205@yandex.ru

**Введение:** Болезнь Паркинсона (БП) - хроническое неизлечимое нейродегенеративное заболевание, занимающее второе место в мире по частоте встречаемости, уступая лишь болезни Альцгеймера [1]. БП - системное заболевание нервной системы. Основным патоморфологическим признаком клинической стадии БП является прогрессирующая дегенерация дофамин (ДА)-ергической нигростриатной системы, сопряженная с формированием в нейронах черной субстанции телец Леви и развитием нейровоспаления [2]. Основанием для постановки диагноза БП служит появление моторных нарушений в результате гибели более 60% ДА-ергических нейронов в компактной части черной субстанции (кчЧС) и их аксонов в дорсальном стриатуме [3]. Нейродегенеративный процесс при БП не ограничивается только нигростриатной системой и охватывает другие отделы мозга (ольфакторную и мезокортиколимбическую системы, голубое пятно, ядра шва) и периферическую нервную систему, участвующие в регуляции многих функций мозга и внутренних органов [4].

На сегодняшний день, в литературе превалирует мнение, что основной причиной гибели нервных клеток при БП является образование в телах нейронов токсичных агрегатов белка  $\alpha$ -синуклеина. Считается, что ослабление работы убиквитин-протеасомной системы, вызванное различными эндогенными (окислительный стресс, накопление реактивных форм кислорода и т.д.) и экзогенными (ксенобиотики, тяжелые металлы, нейротоксины) факторами, вносит основной вклад в нарушение конформации этого белка. В нормальных условиях  $\alpha$ -синуклеин - растворимый везикулярный белок, локализованный в цитоплазме и ядре и участвующий, предположительно, в процессах регуляции синаптической пластичности. При взаимодействии с фосфолипидами пресинаптической плазматической мембраны  $\alpha$ -синуклеин принимает конформацию  $\alpha$ -спирали [5]. Однако молекулы  $\alpha$ -синуклеина, не связанные с фосфолипидами, не имеют определенной упорядоченной структуры и обладают способностью к агрегации из-за наличия гидрофобного участка в центральной части полипептидной цепи. Считается, что мутации и посттрансляционные модификации, такие как фосфорилирование и гликозилирование, могут служить индукторами патологического процесса агрегации  $\alpha$ -синуклеина [6]. Результатом агрегации является формирование токсичных протофибрилл - олигомерных структур, содержащих  $\alpha$ -синуклеин в  $\beta$ -складчатой форме, которые затем агрегируют в нерастворимые фибриллы [7]. В последние годы показано, что протофибриллы  $\alpha$ -синуклеина могут распространяться между нейронами по прион-подобному механизму [8]. Проникая в <<здоровые>> нейроны, протофибриллы инициирует переход  $\alpha$ -синуклеина из мономерной растворимой конформации в фибриллярную. Так  $\alpha$ -синуклеиновая патология распространяется от нейрона к нейрону. Кроме того, имеются данные, свидетельствующие о том, что патологические формы  $\alpha$ -синуклеина способны связывать субъединицы протеасом и ингибировать работу протеасомной системы, усугубляя тем самым нейрональную патологию [2].

Согласно классификации [4], основанной на исследовании  $\alpha$ -синуклеиновой патологии у пациентов с БП *post mortem*, на 1-й и 2-й доклинической стадиях агрегаты  $\alpha$ -синуклеина выявляются в обонятельных луковицах, голубом пятне, дорсальном моторном ядре блуждающего

нерва, ядре шва, ретикулярной формации. На 3-й доклинической стадии - в кЧС и минда-  
лине, а при переходе к клинической стадии заболевания (4-6 стадии по [4]) - обнаруживаются  
в базальных ганглиях, таламусе, сенсорной и префронтальной коре.

Несмотря на определенные успехи в изучении патогенеза БП, молекулярные механизмы  
этого заболевания до сих пор до конца не изучены. Поздняя постановка диагноза в клинической  
стадии, когда уровень нейродегенерации в кЧС превышает 50-60%, и применение симптома-  
тической терапии ставят это заболевание в ряд неизлечимых. Считается, что создание адекват-  
ных животных моделей доклинической стадии БП будет способствовать развитию инновацион-  
ных технологий как доклинической диагностики БП, так и нейропротективной терапии. Ранее  
нами создана пролонгированная модель доклинической стадии БП, основанная на нарастаю-  
щем угнетении убиквитин-протеасомной системы головного мозга у крыс среднего возраста.  
Показано, что данная модель характеризуется допороговым уровнем дегенерации DA-ергиче-  
ских нейронов в обонятельной луковице, кЧС, вентральной тегментальной области, голубом  
пятне и развитием нейровоспаления в изученных структурах, а также воспроизводит признаки  
нарушения сна и когнитивных функций [9-11]. Однако в данной модели не был изучен один из  
основных патоморфологических признаков БП - наличие  $\alpha$ -синуклеиновой патологии в голов-  
ном мозге, которое может являться причиной гибели нейронов. **Задача настоящего исследо-  
вания** - с помощью методов световой и конфокальной микроскопии провести патоморфологи-  
ческий анализ наличия и локализации патологических  $\alpha$ -синуклеин-позитивных включений в  
DA-ергических нейронах кЧС и обонятельной луковицы при моделировании доклинической  
стадии БП у крыс среднего возраста.

**Материалы и методы:** Опыты проводились на крысах-самцах линии Вистар среднего воз-  
раста (6 мес.), которых содержали в виварии при постоянной температуре окружающей среды  
 $23 \pm 1^\circ\text{C}$  и свободном доступе к воде и пище. Манипуляции с животными осуществлялись в  
соответствии с протоколом, утвержденным комитетом по охране животных ИЭФБ РАН, нахо-  
дящимся в соответствии с национальными и международными требованиями.

Для моделирования преклинической стадии БП использовали специфический ингибитор  
ферментативной активности протеасом лактацистин (ЛЦ, Enzo, США), который растворяли  
в апирогенном фосфатном буфере и вводили в дозе 100 мкг/8 мкл в каждую ноздрю крысы  
дважды с недельным интервалом: общая доза на одну крысу составила 400 мкг. Контрольной  
группе животных вводили растворитель ЛЦ.

На 21-й день после первой микроинъекции ЛЦ крыс декапитировали, головной мозг извле-  
кали из черепной коробки и фиксировали в 4% растворе параформальдегида при  $+4^\circ\text{C}$  в течение  
5 дней, промывали в 0.1М ФБ (рН 7.4) и переносили в 20% раствор сахарозы при  $+4^\circ\text{C}$  для крио-  
протекции. Спустя 3-5 дней мозг замораживали в изопентане при температуре  $-45^\circ\text{C}$  и хранили  
при  $-80^\circ\text{C}$ . При помощи криостата Leica (Германия) при  $-20^\circ\text{C}$  приготавливали чередующие-  
ся серии фронтальных срезов головного мозга толщиной 10 мкм, содержащие обонятельную  
луковицу и кЧС. Локализацию структур осуществляли с помощью стереотаксического атласа  
[12].

Для анализа наличия телец Леви, содержащих агрегаты  $\alpha$ -синуклеина, в нейронах кЧС  
использовали биотин-стрептавидиновый метод. Срезы промывали в 0.1М ФБ (рН 7.4), затем в  
течение 10 минут выполняли термическое демаскирование антигенов в цитратном буфере ( $96$ -  
 $98^\circ\text{C}$ ; рН 6.0). Для гашения активности эндогенной пероксидазы срезы выдерживали в 0.3%-  
ном растворе пероксида водорода в течение 20 минут. После трехкратной промывки в 0.1М ФБ  
(рН 7.4) срезы на 10 минут помещали в 0.1М ФБ (рН 7.4) с добавлением 0.1%-ного Tween-20  
(Sigma, США) для повышения проницаемости плазматических мембран и затем преинкубиро-  
вали в блокирующем растворе (3% сыворотки козы (Sigma, США), 0.01% Tween-20 на ФБ) в  
течение 1 часа при комнатной температуре. После этого срезы инкубировали с первичными по-  
ликлональными антителами кролика против  $\alpha$ -синуклеина (1:250) (Novus, США) в течение 48

часов при температуре +4°C. После трехкратной промывки в 0.1М ФБ (pH 7.4) срезы инкубировали в течение 1 часа во вторичных антителах козы против кролика (1:400), конъюгированных с биотином (Vector Lab., США), затем в комплексе стрептавидин-пероксидаза (1:400) (Vector Lab., США). Далее срезы промывали в 0.1М ФБ (pH 7.4) и синхронно визуализировали реакцию с помощью 0.05%-ного раствора диаминобензидина (Sigma, США) с 0.015% пероксида водорода на 0.1М ФБ (pH 7.4), проводили по восходящим спиртам и заключали под покровное стекло с помощью среды BioMount (Италия). Срезы хранили при комнатной температуре. Гистологические препараты изучали с помощью микроскопа Karl Zeiss (Imager A1) со встроенной видеокамерой.

Методом двойного иммуномечения с применением антител против  $\alpha$ -синуклеина и скорость-лимитирующего фермента синтеза ДА - тирозингидроксилазы (ТГ), изучена локализация  $\alpha$ -синуклеина и наличие его агрегатов в ДА-ергических нейронах обонятельной луковицы и кЧС. После стандартной предварительной обработки, описанной выше, срезы преинкубировали в блокирующем растворе (3% бычий сывороточный альбумин (Sigma, США) на ФБ) в течение 1 часа при комнатной температуре, затем инкубировали с первичными поликлональными антителами кролика против  $\alpha$ -синуклеина (1:250) (Novus, США) в течение 48 часов при температуре +4°C. После трехкратной промывки в 0.1М ФБ (pH 7.4) срезы инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре во вторичных антителах против кролика, конъюгированных с флуоресцентной меткой CF<sup>TM</sup>488 (1:600) (Sigma, США), затем срезы промывали в 0.1М ФБ (pH 7.4) и инкубировали с первичными моноклональными антителами мыши против ТГ (1:1000) (Sigma, США) в течение ночи при комнатной температуре, промывали в 0.1М ФБ (pH 7.4) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре во вторичных антителах против мыши, конъюгированных с флуоресцентной меткой CF<sup>TM</sup>568 (1:600) (Sigma, США). После трехкратной промывки в 0.1М ФБ (pH 7.4) срезы заключали под покровное стекло с помощью среды Mowiol (Sigma, США) и хранили при температуре +4°C. Специфичность всех иммуногистохимических реакций проверяли негативным контролем без первичных или вторичных антител.

Гистологические препараты изучали с помощью конфокального микроскопа DM16000 (Leica Microsystems) со встроенной видеокамерой с использованием иммерсионного объектива х63, лазеров с длиной волны возбуждения 488 и 568 нм. Изображения анализировали с помощью пакета программ Leica LAS AF.

**Результаты и обсуждение:** С помощью антител против  $\alpha$ -синуклеина и световой микроскопии установлено, что в контрольных условиях  $\alpha$ -синуклеин распределен диффузно в цитоплазме нейронов кЧС, что согласуется с исследованиями других авторов [13, 14]. При моделировании доклинической стадии БП на 21-й день после первого введения ЛЦ у крыс в телах нервных клеток кЧС обнаруживаются тельца Леви. Они имеют характерную морфологию: плотное ацидофильное ядро, ярко окрашенное антителами против  $\alpha$ -синуклеина, с бледным ореолом вокруг него (рис. 1, А). Тельца Леви сходной морфологии наблюдаются у пациентов БП [4]. Образование телец Леви отмечается и при системном введении ингибиторов протеасом эпоксимицина и PSI при моделировании клинической стадии БП у крыс [15].

Методами двойного иммуномечения с использованием антител против ТГ и  $\alpha$ -синуклеина и конфокальной микроскопии проведен морфологический анализ наличия и локализации патологических  $\alpha$ -синуклеин-позитивных включений в ДА-ергических нейронах кЧС и обонятельной луковицы при моделировании доклинической стадии БП у крыс. Установлено, что в контрольных условиях  $\alpha$ -синуклеин равномерно распределен в цитоплазме ДА-ергических нейронов обонятельной луковицы и кЧС. При моделировании доклинической стадии БП у крыс на 21-й день после введения ЛЦ на результирующем изображении обонятельной луковицы обнаруживались агрегаты белка  $\alpha$ -синуклеина среднего размера в цитоплазме ДА-ергических нейронов (рис. 1, Б). В ядрах этих клеток  $\alpha$ -синуклеин был распределен диффузно, тельца Леви

не выявлялись. При анализе результирующего изображения кЧС агрегаты  $\alpha$ -синуклеина визуализировались не только в цитоплазме, но и в ядрах ДА-ергических нейронов. У пациентов с БП *postmortem* в нейронах кЧС также обнаруживаются агрегаты  $\alpha$ -синуклеина, локализованные как в цитоплазме, так и в ядре [16].

Таким образом, полученные данные указывают, что интраназальное введение ЛЦ позволяет воспроизводить у крыс один из основных патоморфологических признаков доклинической стадии БП - наличие в ДА-ергических нейронах кЧС и обонятельной луковицы телец Леви, содержащих патологические агрегаты белка  $\alpha$ -синуклеина.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00278). Морфологические исследования проведены на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием для иммуноцитохимических исследований ИЭФБ РАН.*

### Литература

- 1) Schapira, A. H. (2013). Recent developments in biomarkers in Parkinson disease. *Current opinion in neurology*, 26(4), 395.
- 2) Fujita, K. A., Ostaszewski, M., Matsuoka, Y., Ghosh, S., Glaab, E., Trefois, C., Diederich, N. (2014). Integrating pathways of Parkinson's disease in a molecular interaction map. *Molecular neurobiology*, 49(1), 88-102.
- 3) Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., Seitelberger, F. I. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of the neurological sciences*, 20(4), 415-455.
- 4) Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and tissue research*, 318(1), 121-134.
- 5) Bisaglia, M., Mammi, S., & Bubacco, L. (2009). Structural insights on physiological functions and pathological effects of  $\alpha$ -synuclein. *The FASEB Journal*, 23(2), 329-340.
- 6) Giasson, B. I., Duda, J. E., Murray, I. V., Chen, Q., Souza, J. M., Hurtig, H. I., Lee, V. M. Y. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective  $\alpha$ -synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*, 290(5493), 985-989.
- 7) Waxman, E. A., & Giasson, B. I. (2010). A novel, high-efficiency cellular model of fibrillar  $\alpha$ -synuclein inclusions and the examination of mutations that inhibit amyloid formation. *Journal of neurochemistry*, 113(2), 374-388.
- 8) Uchihara, T., & Giasson, B. I. (2016). Propagation of alpha-synuclein pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta neuropathologica*, 131(1), 49-73.
- 9) Екимова, И. В., Симонова, В. В., Гузеев, М. А., Лапшина, К. В., Чернышев, М. В., Пастухов, Ю. Ф. (2016). Изменения характеристик сна в модели доклинической стадии болезни Паркинсона у крыс, созданной на основе ослабления активности убиквитин-протеасомной системы головного мозга. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*, 52(6), 413-422.
- 10) Абдурасулова, И. Н., Екимова, И. В., Мацулевич, А. В., Газизова, А. Р., Клименко, В. М., Пастухов, Ю. Ф. (2017). Нарушение неассоциативного обучения у крыс в условиях экспериментальной модели доклинической стадии болезни Паркинсона. *Доклады Академии наук*. 476(3), 353-356.

- 11) Plaksina DV, Chernyshev MV, Karpenko MN, Gazizova AR, Pazi MB, Ekimova IV (2017). Experimental modeling of a preclinical Parkinson`s disease stage in rats by intranasal lactacystin administration. Neurodegenerative Diseases. Suppl. 1. 17, 1655.
- 12) Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, San Diego. 1998
- 13) Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N., Rubinsztein, D. C. (2003).  $\alpha$ -Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. Journal of Biological Chemistry, 278(27), 25009-25013.
- 14) Yu, S., Li, X., Liu, G., Han, J., Zhang, C., Li, Y., Uéda, K. (2007). Extensive nuclear localization of  $\alpha$ -synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. Neuroscience, 145(2), 539-555.
- 15) McNaught, K. S. P., Perl, D. P., Brownell, A. L., Olanow, C. W. (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. Annals of neurology, 56(1), 149-162.
- 16) Fares, M. B., Ait-Bouziad, N., Dikiy, I., Mbefo, M. K., Jovičić, A., Kiely, A., Lashuel, H. A. (2014). The novel Parkinson's disease linked mutation G51D attenuates in vitro aggregation and membrane binding of  $\alpha$ -synuclein, and enhances its secretion and nuclear localization in cells. Human molecular genetics, 23(17), 4491-4509.

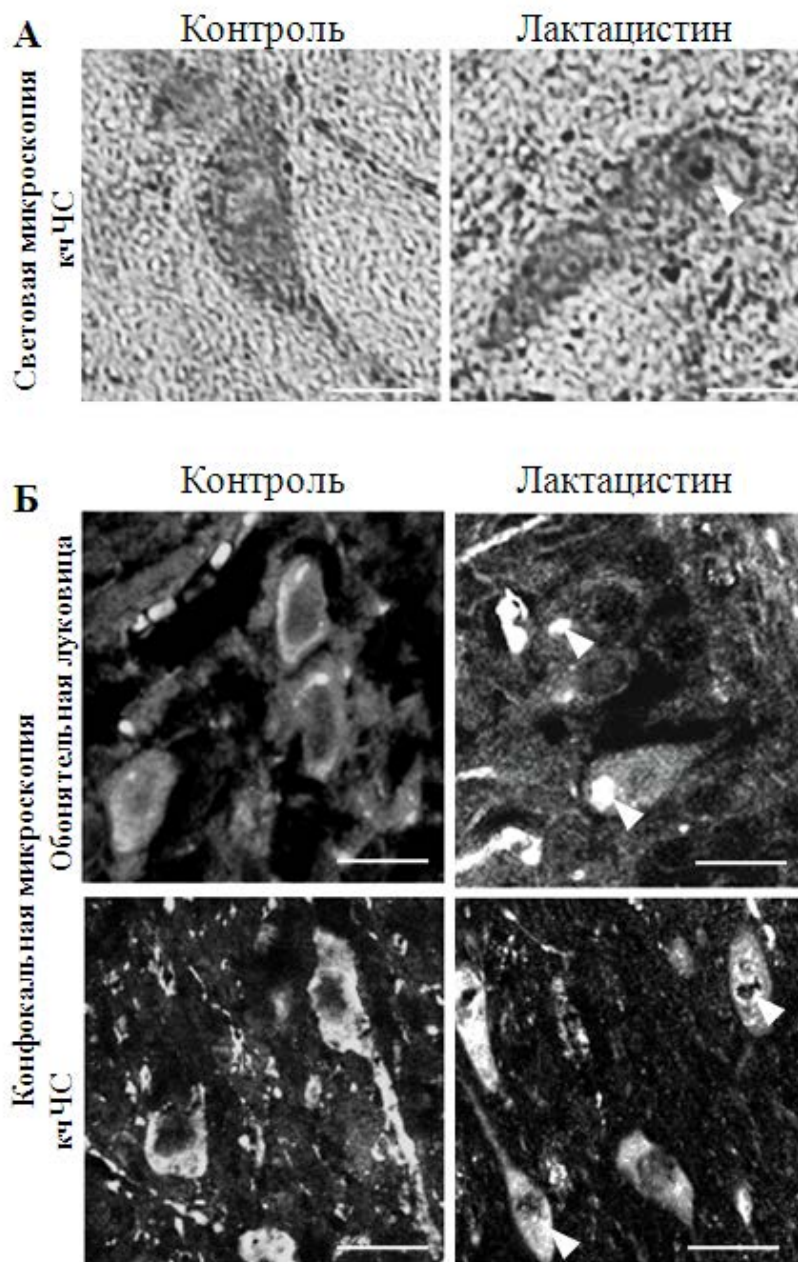


Рис. 1. Тельца Леви, содержащие агрегаты  $\alpha$ -синуклеина, в нейронах обонятельной луковицы и компактной части черной субстанции (кчЧС) при моделировании доклинической стадии болезни Паркинсона у крыс. А. Световая микроскопия нейронов кчЧС после иммуногистохимического окрашивания антителами против  $\alpha$ -синуклеина; масштаб 5 мкм. Б. Результирующие изображения конфокальной микроскопии препаратов обонятельной луковицы и кчЧС: двойное иммуномечение с применением антител против тирозингидроксилазы (ТГ) и  $\alpha$ -синуклеина; масштаб 15 мкм. Стрелками показаны агрегаты  $\alpha$ -синуклеина.

## СПОСОБЫ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ РЕАБСОРБЦИИ БЕЛКА НА ФИКСИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТАХ ПОЧКИ

**Пруцкова Н.П., Селивёрстова Е.В.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,  
г. Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: natprut@yandex.ru*

Цель настоящей работы состояла в обобщении и анализе различных способов количественной оценки канальцевой реабсорбции введённых парентерально белков в почке представителей позвоночных животных на основе проведённых морфофизиологических исследований. Внутривенные инъекции различных фильтрующихся белков осуществляли обездвиженным лягушкам и крысам, находящимся под наркозом. Интактным лягушкам белки вводили внутрибрюшинно или подкожно (в спинной лимфатический мешок). Контролем служило введения растворителя - изоосмотического фосфатно-солевого буфера. Морфологические исследования проводили на фиксированных препаратах почек, извлечённых в разные сроки после инъекции. Для изучения реабсорбции в проксимальных канальцах (ПК) флуоресцентных белков (GFP и YFP) и бычьего сывороточного альбумина (БСА), конъюгированного с Alexa-Fluor 488, образцы фиксировали в параформальдегиде с последующим отмыванием, криопротекцией, замораживанием в жидком азоте и приготовлением срезов в криостате. Для анализа реабсорбции лизоцима, лактальбумина и выявления рецепторов эндоцитоза в клетках ПК проводили иммуногистохимические реакции на замороженных срезах с использованием коммерческих антител к белкам и рецепторам эндоцитоза. Препараты изучали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия), а также инвертированного конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Inc., Bannockburn, IL, Германия). Спектры возбуждения для Alexa-fluor, FITC и GFP составили 488 нм, для YFP - 513 нм. Зелёное свечение регистрировали в диапазоне 500-520 нм, свечение YFP - при 560-590 нм (жёлтая область). Для регистрации свечения GFP, YFP, БСА-конъюгата в зелёной области спектра использовали также флуоресцентный микроскоп Biozero (BZ-8100E, Keyence Corporation, Япония) с фильтром OP-66835 BZ FILTER GFP. Изображения получали, используя объективы 63x и 40x и электронное масштабирование. Визуальный анализ изображений показал, что в процессе всасывания белка интенсивность специфической флуоресценции, характер свечения (диффузный или гранулярный), а также распределение регистрируемого сигнала в различных частях ПК и отдельных эпителиоцитах могут зависеть от дозы белка, способа введения и времени после инъекции. Для выяснения закономерностей захвата и накопления белка в клетках ПК применяли количественный анализ изображений и статистическую обработку с использованием пакетов программ Image Tool III, Image J, Microsoft Office Excell 2003 и 2010, Statistica 6.0. Использовано несколько нижеперечисленных подходов к количественной оценке реабсорбции.

1. Чтобы оценить всасывание флуоресцентных белков, на изображениях, полученных при идентичных параметрах работы микроскопа, определяли величину свечения (оптическую плотность) в выделенной области - эпителиальном пласте профиля ПК (в условных единицах, соответствующих градациям серого цвета от 0 до 255). Величину специфической флуоресценции рассчитывали как разность между средними значениями флуоресценции после введения белка и автофлуоресценции в контроле, с соответствующей ошибкой разности (Пруцкова, 2011; Prutskova, Seliverstova, 2011). Установлена высокая положительная корреляция между свечением GFP в почках лягушек и логарифмом дозы этого белка в пределах доз от 0.68 до 34 мкг/30 г массы тела. Аналогичная зависимость была установлена при расчётах средних значений максимумов флуоресценции GFP у крыс при дозах белка от 2.3 до 45 мкг/100 г массы тела.
2. Отмечено, что с увеличением дозы белка диффузный характер свечения постепенно сменя-

ется его локализацией в эндоцитозных везикулах эпителиоцитов ПК. Показано, что в эпителии ПК почки лягушки распределение относительного числа элементов изображения (пикселей) с фоновой флуоресценцией в спектре GFP было близким к нормальному. С увеличением дозы введённого белка пики на гистограммах, соответствующие средним значениям фоновой флуоресценции, снижаются. При смещении распределения в сторону увеличения интенсивности сигнала гистограммы становятся бимодальными, с появлением второго пика в области высоких значений, что обусловлено накоплением белка в везикулах и увеличением числа таких везикул в клетках. При введении небольших количеств GFP содержащие белок внутриклеточные везикулы занимали лишь незначительную часть площади клеток эпителиального пласта канальца. Это обстоятельство затрудняло выявление достоверных изменений расчётной величины специфической флуоресценции в эпителиальном пласте канальца при изменении условий опытов и различных воздействиях. Поэтому был применён расчёт плотности специфической флуоресценции. Этот показатель определяли как относительное количество элементов изображения с интенсивностью флуоресценции, выходящей за пределы нормального распределения флуоресценции в контроле (т.е. превышавшей  $M + 3s$ , где  $M$  - среднее значение автофлуоресценции, а  $s$  - стандартное отклонение). Как показали дальнейшие эксперименты, плотность специфической флуоресценции в ПК почки крыс достоверно изменялась за фиксированные промежутки времени, снижаясь через 2 ч по сравнению с 0.5 ч после инъекции. Внедрение данного показателя (в % к площади эпителиального пласта канальца) позволило продемонстрировать всасывание GFP в почках лягушек при его введении в значительно меньших дозах, а также негативное модулирующее действие аргинин-вазотоцина на фильтрацию и реабсорбцию этого белка (Пруцкова, 2011; Prutskova, Seliverstova, 2011).

3. В процессе фильтрации белка и его продвижения по ходу ПК наблюдается постепенное увеличение в срезах почки числа профилей ПК с абсорбированным белком. Определение этого показателя существенно для анализа реабсорбции белка у полуводных лягушек, поскольку для них характерна перемежающаяся и зависящая от гормонального статуса активность почечных клубочков. Число флуоресцентных профилей (в % к общему числу профилей ПК или в расчёте на среднее количество клубочков в срезах почки) оказалось весьма эффективным индикатором эффектов аргинин-вазотоцина на фильтрацию и реабсорбцию GFP, YFP и лизоцима. Было установлено, что всасывание белков в эпителии ПК у лягушек происходит по механизму рецепторопосредованного эндоцитоза (Prutskova, Seliverstova, 2011; Seliverstova, Prutskova, 2013, 2015), как у млекопитающих. В интернализации исследуемых белков участвуют мультилигандные рецепторы мегалин и кубилин, которые на ранних этапах эндоцитоза колокализуются с белком в апикальном эндоцитозном компартменте. В результате иммуномечения рецепторов в контроле и после введения лизоцима оказалось, что регистрируемый сигнал для конститутивных рецепторов эндоцитоза (присутствующих в почке лягушек, которым не вводили экзогенный белок), в большинстве случаев был слабее и выявлялся реже по сравнению с таковым после инъекции лизоцима. Для подтверждения различий на примере мегалина сигналы в апикальной зоне эпителиоцитов разделяли по интенсивности (в диапазоне средних значений оптической плотности (в усл. ед.) 1-7 и более при сигнале в фоне менее 1) и подсчитывали число ПК со слабым и более интенсивным сигналом. Относительное количество ПК с интенсивной меткой к мегалину после введения лизоцима достоверно превысило их число в контроле.

4. В результате всасывания в эпителии ПК интернализированный белок выявляется в отдельных интенсивно светящихся эндоцитозных везикулах диаметром 0.3-1 мкм. Подсчёт среднего числа таких везикул (в расчёте на 5 соседних клеток профиля ПК) оказался адекватным и стабильным морфологическим показателем абсорбционной ёмкости клеток за фиксированные периоды времени. Это дало возможность, независимо от способа идентификации введённого белка, установить, что у лягушек различные низкомолекулярные белки всасываются в почке с одинаковой скоростью, которая выше по сравнению с БСА. Определение количества содержащихся белок



везикул позволило изучить динамику процесса реабсорбции реализующегося *in vivo* (Пруцкова, Кутина, 2015; Seliverstova, Prutskova, 2015), проследить внутриклеточный трафик и аккумуляцию белка в отдельных эпителиоцитах в процессе его интернализации вместе с рецептором (Seliverstova, Prutskova, 2013, 2015), исследовать эффекты предварительной белковой нагрузки (Селивёрстова, Пруцкова, 2017), а также особенности конкурентного всасывания разных белков (Seliverstova, Prutskova, 2013; Пруцкова, Селивёрстова, 2016).

В целом можно заключить, что при проведении морфофизиологических исследований важен выбор анализируемых показателей в зависимости от изучаемого объекта, задач эксперимента, использованных методов микроскопии и иммуногистохимии. Статистический анализ результатов проведённых исследований с применением различных подходов к количественной оценке результата реабсорбции фильтрующихся белков на получаемых изображениях является необходимым этапом изучения основных закономерностей реабсорбции белка в почке и молекулярных механизмов эндоцитоза.

*Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012290371-3) при частичной поддержке РФФИ (проект № 16-04-00465). Исследования методом конфокальной микроскопии проведены на базе ЦКП ИЭФБ РАН.*

## **ИЗМЕНЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ ОРЕКСИГЕННЫХ И АНОРЕКСИГЕННЫХ ФАКТОРОВ В ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС С ОЖИРЕНИЕМ, ВЫЗВАННЫМ КАФЕТЕРИЙ-ДИЕТОЙ**

**Романова И.В., Морина И.Ю., Деркач К.В., Михрина А.Л., Сухов И.Б., Кузнецова Л.А., Шпаков А.О.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,  
г. Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: irinaromanova@mail.ru*

Гипоталамические структуры играют ключевую роль в регуляции пищевого поведения, нарушения которого приводят к ожирению, метаболическому синдрому и другим метаболическим расстройствам. Это во многом обусловлено тем, что в гипоталамических нейронах осуществляются синтез и секреция большого числа факторов с орексигенной и анорексигенной активностью. К орексигенным факторам относятся орексин (ОР), агути-подобный пептид (АПП) и нейропептид Y (НПУ), к анорексигенным фактором - меланокортиновые пептиды, которые продуцируются из проопиомеланокортина (ПОМК) и активируют меланокортиновые рецепторы. Однако данные об экспрессии и соотношении гипоталамических факторов, ответственных за контроль пищевого поведения, в условиях различных форм ожирения немногочисленны и противоречивы. Цель предпринятого исследования - с помощью иммуногистохимических подходов и количественной ПЦР провести сравнительное изучение локализации и экспрессии ПОМК, ОР А-типа (ОР-А), АПП и НПУ в гипоталамических структурах контрольных самцов крыс и животных с ожирением, вызванным длительной кафетерий-диетой. Начиная с 26-дневного возраста, крысы в течение 9 недель потребляли кафетерий-диету, которая включала 5-6 г насыщенных жиров и 30% раствор сахарозы (вместо питьевой воды). У животных отмечали метаболические и гормональные изменения, характерные для метаболического синдрома, включая развитие инсулиновой резистентности, нарушение углеводного и липидного обмена, гиперлептемию. В периферикальной области гипоталамуса крыс с ожирением с помощью иммунофлуоресценции было выявлено снижение на 29 % количества ОР-А, а с помощью ПЦР - снижение в два раза уровня мРНК для гена, кодирующего пре-проорексин, предшественник ОР-А. В аркуатных ядрах гипоталамуса крыс с ожирением также снижалась экспрессия гена для АПП, эндогенного антагониста меланокортиновых рецепторов 4-го типа, в то время как экспрессия гена для НПУ менялась незначительно. Экспрессия гена, кодирующего ПОМК, в аркуатных ядрах гипоталамуса крыс с ожирением заметно увеличивалась. В то же время с помощью иммунофлуоресценции было показано некоторое снижение количества ПОМК в телах нейронов и их отростках в аркуатных ядрах гипоталамуса, что мы связываем с усиленной деградацией ПОМК в условиях характерной для ожирения липотоксичности и стресса эндоплазматического ретикулума. Таким образом, в условиях индуцированного кафетерий-диетой ожирения в различных областях гипоталамуса запускается серия компенсаторных процессов, направленных на усиление анорексигенных и подавление орексигенных влияний, что должно вызывать ослабление гиперфагии и уменьшение негативных метаболических и гормональных последствий в условиях избыточного потребления калорий.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-15-10388).*

## ИМИДЖИНГ КАЛЬЦИЕВОГО МЕТАБОЛИЗМА В ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЯХ

Самигуллин Д.В.<sup>1,2,3</sup>, Хазиев Э.Ф.<sup>1,2,3</sup>, Жилияков Н.В.<sup>1,2</sup>, Бухараева Э.А.<sup>1,2</sup>, Никольский Е.Е.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки <<Федеральный исследовательский центр <<Казанский научный центр Российской академии наук>>;

<sup>2</sup> Казанский федеральный (Приволжский) университет;

<sup>3</sup> Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева, г. Казань, Россия.

E-mail: Samid75@mail.ru

Вход ионов кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) через потенциал-чувствительные  $\text{Ca}^{2+}$  каналы играет ведущую роль в синаптической передаче в центральных и периферических синапсах [1, 2]. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  необходимы для запуска высвобождения синаптических пузырьков, рециклирования везикул и участвуют в формировании постсинаптической короткой и долговременной пластичности [3]. Во время распространения потенциала действия концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в нервной клетке увеличивается до нескольких десятков микромолей за счет входа  $\text{Ca}^{2+}$  через пресинаптические потенциал-чувствительные  $\text{Ca}^{2+}$  каналы [2]. Сразу же после попадания внутрь пресинаптической клетки 95% ионов  $\text{Ca}^{2+}$  связываются с хелаторами  $\text{Ca}^{2+}$  или сайтами связывания  $\text{Ca}^{2+}$ , расположенными в пределах 10-50 нм от места входа  $\text{Ca}^{2+}$  [4].  $\text{Ca}^{2+}$  буферы определяют время жизни высоких концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  вблизи зоны высвобождения медиатора и замедляют диффузию  $\text{Ca}^{2+}$  внутри клетки [5]. Для многих периферических синапсов, в том числе нервно-мышечного соединения, большая часть деталей внутриклеточной регуляции  $\text{Ca}^{2+}$  и количественно-временные параметры его взаимодействия с внутриклеточными органеллами остаются неизвестными. Действие многих физиологически активных соединений связано с изменениями метаболизма  $\text{Ca}^{2+}$  в нервной терминали [6]. Модуляция динамики  $\text{Ca}^{2+}$  хорошо изучена на синапсах центральной нервной системы (ЦНС), в основном благодаря строению этих синапсов,  $\text{Ca}^{2+}$  ток может быть непосредственно оценен с использованием электрофизиологических методов [7]. Прямая регистрация пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$  токов в нервно-мышечном соединении довольно сложна, поскольку малый размер нервного окончания не позволяет использовать патч-клэмп регистрацию или двухэлектродный метод фиксации потенциала. Существуют электрофизиологические методы оценки  $\text{Ca}^{2+}$  - тока в нервно-мышечном соединении [8,9]. Однако, эти методы предполагают дополнительную обработку синапсов блокаторами ионов натрия и калия. За последние несколько десятилетий основным подходом к анализу внутриклеточных изменений  $\text{Ca}^{2+}$  было использование  $\text{Ca}^{2+}$  чувствительных флуоресцентных красителей, которые изменяют интенсивность излучения при связывании с  $\text{Ca}^{2+}$  [10]. В синапсах ЦНС возможна прямая загрузка  $\text{Ca}^{2+}$  красителей в клетку через <<патч>> или инъекционную пипетку [11,12]. В качестве альтернативы  $\text{Ca}^{2+}$  индикаторы могут быть загружены в клетки в виде мембрано-проницаемых форм, но в этом случае загрузка отдельных клеток невозможна и эти формы красителей так же могут проникать в клеточные органеллы [13, 14]. Однако ни один из этих подходов не подходит, для измерения пресинаптического уровня  $\text{Ca}^{2+}$  ex vivo в периферических нервных окончаниях, из-за особенностей морфологии и большого расстояния между телами клеток нейронов и мышцами, которые они иннервируют. Таким образом, возникла необходимость в разработке альтернативного методологического подхода к загрузке  $\text{Ca}^{2+}$  индикаторов, который можно было бы использовать для изучения пресинаптических изменений  $\text{Ca}^{2+}$  в нервно-мышечных соединениях ex vivo. Для нервно-мышечного соединения наиболее доступным методом является загрузка через культю нерва [15, 16]. В данном исследовании мы описываем методику загрузки  $\text{Ca}^{2+}$  красителей в периферические нервные окончания теплокровных

и холоднокровных животных через культую нерва. Метод основан на транспорте кальциевого красителя за счет диффузии и антероградного транспорта внутри аксона. После загрузки, проведенной данным способом, нервные окончания, находящиеся в проксимальной части препарата (ближе к культе нерва), равномерно окрашиваются красителем [17, 18]. Это позволяет проводить регистрацию флуоресцентных  $Ca^{2+}$  сигналов от одного или нескольких нервных окончаний по выбору исследователя. При данном способе загрузки краситель проникает только в цитозоль пресинаптической клетки, что исключает ошибки при регистрации сигналов, связанные с влиянием кальциевых сигналов от постсинаптической клетки или от внутриклеточных органелл, возникающие при других способах загрузки. Данный метод загрузки применяется в нашей лаборатории для загрузки периферических нервных окончаний теплокровных и холоднокровных животных высокоафинным кальциевым красителем Oregon Green 488 BAPTA-1 Hexapotassium Salt, cell impermeant и низкоафинным Magnesium Green, Pentapotassium Salt, cell impermeant. Высокоафинный  $Ca^{2+}$  краситель, в силу своей высокой чувствительности, использовался при редкой стимуляции двигательного нерва, когда необходимо получить хорошее соотношение сигнал-шум, при регистрации свечения красителя. Для регистрации изменения свечения флуоресцентного красителя ( $Ca^{2+}$  транзientа), при стимуляции двигательного нерва использовалась высокоскоростная, чувствительная камера NeuroCCD-smq фирмы RedShirt imaging. Камера позволяет фиксировать слабые флуоресцентные сигналы с частотой до 2000 кадров в 1 с. при разрешении 80\*80 пикселей. Этого достаточно для того, чтобы проводить регистрацию кальциевых ответов с достаточным временным и пространственным разрешением на синапсах теплокровных и холоднокровных животных. При помощи разработанной методики были получены данные об участии различных подтипов кальциевых каналов в реализации входа кальция в пресинаптическое нервное окончание теплокровных и холоднокровных животных. Эксперименты, показали, что в двигательных нервных окончаниях лягушки наряду с известными кальциевыми каналами N типа функционально представлены кальциевые каналы L и P/Q-типов, которые участвуют в регуляции высвобождения квантов ацетилхолина и могут быть вовлечены в реализацию эффектов физиологически активных соединений [19]. На синапсах холоднокровных, животных было показано, что под действием холиномиметиков уменьшается вход кальция в нервное окончание холоднокровных. Угнетающее действие холиномиметиков на  $Ca^{2+}$  транзient связано с активацией как никотиновых, так и мускариновых рецепторов M2 подтипа и их взаимодействием с кальциевыми каналами N типа [6]. Эксперименты, проведенные на синапсах теплокровных животных показали что в формировании  $Ca^{2+}$  транзientа участвуют кальциевые каналы P/Q и L-типов. Так же было показано, что существует мускариновая регуляция входа кальция в пресинаптическое нервное окончание теплокровных животных. Химические синапсы, в том числе нервно-мышечные, в нормальных физиологических условиях функционируют в режиме ритмической активности. Есть данные о том, что при длительной частотной стимуляции моторного нерва в регуляции метаболизма  $Ca^{2+}$  в пресинаптических клетках, большую роль играют внутриклеточные депо  $Ca^{2+}$  такие как, митохондрии и эндоплазматический ретикулум [20, 21]. Изучение динамики  $Ca^{2+}$  при частотной стимуляции моторного нерва позволяет уточнить роль внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в таких фундаментальных процессах, как синаптическая пластичность и облегчение. Для того что бы избежать насыщения  $Ca^{2+}$  красителя, регистрацию  $Ca^{2+}$  транзientа в условиях высокочастотной стимуляции двигательного нерва выполняли в присутствии низкоафинного  $Ca^{2+}$  красителя - Magnesium Green.  $Ca^{2+}$  транзientы в экспериментах при ритмическом раздражении регистрировали на конфокальном микроскопе LEICA TCS SP 5 MP. Возбуждение красителя осуществлялось 6% уровнем мощности аргонового лазера с длиной волны 488 нм. Регистрацию и обработку сигналов терминалей осуществляли базовым программным обеспечением Leica Las AF. Во время стимуляции двигательного нерва в синаптическом контакте в течение 1-2 минут с частотами от 20 до 70 Гц проводилась регистрация  $Ca^{2+}$  транзientа. При повышении частоты

стимуляции существенно изменялся характер  $\text{Ca}^{2+}$  транзientа. Плавное нарастание базальной концентрации кальция при 20 Гц сменялось двухфазным увеличением кальциевого сигнала при 50 Гц и последующим резким ростом при частоте 70 Гц. Немонотонный характер изменения кальциевого сигнала при повышении частоты стимуляции свидетельствует о включении дополнительных источников кальция, каковыми могут быть внутриклеточные кальциевые депо. При блокаде выброса кальция из эндоплазматического ретикулама специфическими блокаторами (ТМВ8 и рианодин) вторая фаза нарастания кальциевого транзientа исчезала. Таким образом, метод регистрации  $\text{Ca}^{2+}$  транзientа при высокочастотном раздражении двигательного нерва в периферических синапсах, загруженных низкоафинным красителем, позволяет оценивать не только изменения уровня кальция, происходящее в ответ на однократный нервный стимул, но и интегральный выброс кальция из эндоплазматического ретикулама в ответ на длительную ритмическую стимуляцию, приводящую к выходу кальция из внутриклеточных депо.

*Работа выполнена частично при поддержке гранта РФФИ 16-04-01051 и гос.задания.*

### Литература

- 1) Katz B, Miledi R. (1965) The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. Proc. Roy. Soc. London B Biol. Sci. 161: 496-503.
- 2) Smith SJ, Augustine GJ. (1988) Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. Trends Neurosci. 11: 458--464.
- 3) Jappy D, Valiullina F, Draguhn A, & Rozov A. (2016) GABABR-Dependent Long-Term Depression at Hippocampal Synapses between CB1-Positive Interneurons and CA1 Pyramidal Cells. Front Cell Neurosci. 10:4. doi: 10.3389/fncel.2016.00004.
- 4) Neher E. (1995). The use of fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes. Neuropharmacology 34: 1423-1442.
- 5) Samigullin D, Fatikhov N, Khaziev E, Skorinkin A, Nikolsky E, Bukharaeva E. (2015) Estimation of presynaptic calcium currents and endogenous calcium buffers at the frog neuromuscular junction with two different calcium fluorescent dyes. Front Synaptic Neurosci. 6:29. doi: 10.3389/fnsyn.2014.00029.
- 6) Khaziev EF, Fatikhov NF, Samigullin DV, Barrett GL, Bukharaeva EA, & Nikolsky EE. (2012) Decreased entry of calcium into motor nerve endings upon activation of presynaptic cholinergic receptors. Dokl Biol Sci. 446: 283-285.
- 7) Mintz IM, Sabatini BL, & Regehr, W. G. (1995). Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. Neuron 15: 675-688.
- 8) Molgó J, Mallart A. (1985) Effects of Anemonia sulcatatoxin II on presynaptic currents and evoked transmitter release at neuromuscular junctions of the mouse. Pflugers Arch 405(4): 349-353.
- 9) Slutsky I, Rashkovan G, Parnas H, Parnas I. (2002)  $\text{Ca}^{2+}$ -independent feedback inhibition of acetylcholine release in frog neuromuscular junction J. Neurosci 22(9): 3426-3433.
- 10) Tsien RY. (1989) Fluorescent indicators of ion concentrations. Methods Cell Biol. 30: 127-156.
- 11) Eilers J, Konnerth A. (2005) A practical guide: dye loading with patch pipettes. In: R. Yuste, A Konnerth (ed) Imaging in neuroscience and development: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 277 - 281.

- 12) Macleod TG. (2012) Direct injection of indicators for calcium imaging at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *Cold Spring Harb Protoc.* 2012: 797-801.
- 13) Regehr WG.(2005) Monitoring presynaptic calcium dynamics with membrane-permeant indicators. In: R. Yuste, A Konnerth (ed) *Imaging in neuroscience and development: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 307 - 314.
- 14) Petrov K., Girard E., Nikitashina A., Colasante C., Bernard V., Nurullin L., Leroy J., Samigullin D., Colak O., Nikolsky E., Plaud B., & Krejci E. (2014) Schwann cells sense and control acetylcholine spillover at the neuromuscular junction by  $\alpha 7$  nicotinic receptors and butyrylcholinesterase. *J Neurosci.* 34(36): 11870-11873.
- 15) Peng YY, Zucker RS. (1993) Release of LHRH is linearly related to the time integral of presynaptic  $Ca^{2+}$  elevation above a threshold level in bullfrog sympathetic ganglia. *Neuron* 10: 465-473.
- 16) Macleod TG. (2012) Forward-Filling of Dextran-Conjugated Indicators for Calcium Imaging at the *Drosophila* Larval Neuromuscular Junction. *Cold Spring Harb Protoc.* 2012: 791-796.
- 17) Samigullin D.V., Khaziev E.F., Zhilyakov N.V., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E. (2017) Loading a calcium dye into frog nerve endings through the nerve stump: calcium transient registration in the frog neuromuscular junction. *Journal of Visualized Experiments.* (125), e55122, doi:10.3791/55122.
- 18) Samigullin D.V., Khaziev E.F., Zhilyakov N.V., Sudakov I.A., Bukharaeva E.A., Nikolsky E. E. (2017) Calcium transient registration in response to single stimulation and during train of pulses in mouse neuromuscular junction. *BioNanoScience.* 7(1): 162-166.
- 19) Nurullin LF, Mukhitov AR, Tsentsevytsky AN, Petrova NV, Samigullin DV, Malomouzh AI, Bukharaeva EA, Vyskočil F, Nikolsky EE. (2011), Voltage-dependent P/Q-type calcium channels at the frog neuromuscular junction, *Physiol Res.*, 5(60): 815-823
- 20) David G, Barrett EF. (2003) Mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *J Physiol.* 548(Pt 2): 425-438.
- 21) Soga-Sakakibara S, Kubota M, Suzuki S, Akita T, Narita K, Kuba K. (2010) Calcium dependence of the priming, activation and inactivation of ryanodine receptors in frog motor nerve terminals. *Eur J Neurosci.* 32(6): 948-62.

## ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ КЛЕТОК ПУРКИНЬЕ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕЙРОНОВ

Сибаров Д.А., Степаненко Ю.Д., Карелина Т.В., Иванова М. А., Ситникова Л. С., Антонов С.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия

E-mail: dsibarov@gmail.com

Первичная культура нейронов представляет собой удобный объект для оптогенетических и имиджинговых экспериментов. Организация сом и отростков нейронов в плоскости при культивировании на стеклах предоставляет минимум помех для прижизненной оптической регистрации активности нейронов, в частности кальциевого имаджинга. Несмотря на то, что культура гранулярных нейронов мозжечка является популярной экспериментальной моделью, ключевой функциональный элемент мозжечка, а именно клетка Пуркинье редко исследуется в культуре. Содержание клеток Пуркинье, являющихся единственным эфферентным элементом кортекса мозжечка, как правило, не превышает 1-2%. На данный момент существуют серьезные методологические разногласия, касающиеся состава среды, которая способствует выживанию КП и развитию морфологии сходной с нейронами *in vivo*. По данным одних авторов, КП, выращенные в среде, обогащенной высоким содержанием KCl, характеризуются высоким уровнем выживаемости и способностью формировать дендритное дерево, сходное с КП *in vivo*. У КП, выращенных в среде с низким содержанием KCl, выживаемость была существенно ниже. Другие авторы указывают на существенное снижение выживаемости клеток Пуркинье, выращенных в среде с высокой концентрацией KCl.

В нашей работе развитие клеток Пуркинье крысы в культуре было охарактеризовано комбинацией прижизненного кальциевого имаджинга и иммуногистохимического окрашивания фиксированной ткани на субъединицы NMDA рецепторов и кальбиндин как маркер клеток Пуркинье. Иммуноцитохимическое исследование нейронов первичной культуры мозжечка крыс производилось на 7, 14, 21 DIV.

На 7 DIV в культуре, выращенной в среде с высоким содержанием KCl встречались кальбиндин-позитивные клетки с сомами разных форм (круглой, веретенообразной, ромбической) и размеров -  $15 \pm 0,4$  мкм. При этом размеры сом КП на 7 DIV достоверно отличались от размеров на 14 ( $19 \pm 0,7$  мкм) и 21 ( $19,6 \pm 0,9$  мкм) DIV - (n - количество клеток = 40, однофакторный ANOVA, пост-тест Бонферрони,  $p < 0,001$ ). У большинства кальбиндин-позитивных клеток наблюдалось несколько толстых отростков, отходящих по периметру от тела нейрона, а также встречались биполярные нейроны. У некоторых кальбиндин-позитивных клеток идентифицировался длинный аксон.

В первичной культуре, выращенной в среде с низким содержанием KCl (5 мМ) было существенно меньше связей между нейронами и наблюдалось большое количество апоптотических клеток. На 7, 14, 21 DIV в данной культуре встречались кальбиндин-позитивные клетки. Однако на 21 DIV в этой культуре не наблюдалось развития дендритного дерева, характерного для зрелых клеток Пуркинье. Также, размеры сом кальбиндин позитивных клеток 21 DIV достоверно отличались от размеров кальбиндин-позитивных клеток в среде с высокой концентрацией KCl -  $11,7 \pm 3$  мкм (n=24, ANOVA, пост-тест Бонферрони,  $p < 0,001$ ).

Согласно полученным нами данным, в культуре с низкой концентрацией KCl размеры сом кальбиндин-позитивных клеток были существенно меньше, также не наблюдалось изменений в строении дендритного дерева к 21 DIV.

Ранее нами было показано, что клетки Пуркинье отличаются наименьшим уровнем экспрессии NMDA рецепторов среди нейронов мозжечка, что становится особенно выражено к

21DIV. Прижизненное окрашивание первичной культуры нейронов мозжечка мембранно-проникающей формой кальций чувствительного красителя Fluo3-AM позволило регистрировать кальциевые ответы нейронов на аппликацию агонистов NMDA рецепторов, в частности глутамата и гомоцистеина. Небольшая популяция нейронов (1-3%) отвечала генерацией кальциевых спайков при действии глутамата, что отличало эти нейроны от большинства гранулярных клеток, демонстрирующих постоянное увеличение концентрации внутриклеточного кальция при действии агонистов. Нами было сделано предположение, что такой активностью отличаются именно клетки Пуркинье как обладающие собственной ритмической спайковой активностью и выраженной экспрессией потенциал-чувствительных кальциевых каналов. При этом дефицит экспрессии NMDA рецепторов приводит к тому, что клетки Пуркинье не демонстрируют существенного постоянного повышения уровня внутриклеточного кальция при действии глутамата, NMDA или гомоцистеина.

*Выполнено в рамках темы госзадания АААА-А18-118012290427-7.*



## МУЛЬТИФОТОННАЯ МИКРОСКОПИЯ НИКОН ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ *IN VIVO* И ОПТОГЕНЕТИКИ

Смирнова Т.А.

ООО <<Никон>>

E-mail: rrs@bmtltd.ru

Лазерная сканирующая конфокальная и двухфотонная микроскопия является мощным инструментом визуализации благодаря возможности наблюдать флуоресцентный сигнал даже в глубине образца, в широком диапазоне длин волн и с высоким пространственным разрешением. За последние годы компания Никон выпустила несколько обновлений, существенно расширяющих возможности применения наших мультифотонных систем A1R HD именно для оптогенетики.

Система мультифотонной визуализации Nikon A1R MP может быть полностью интегрирована с лазерным сканирующим микроскопом, включая получение данных в одном эксперименте с использованием обеих систем. Система собирается на базе нового инвертированного микроскопа Ti2 или прямых микроскопов Ni и FN1 (микроскоп для электрофизиологии). Сканирующая головка имеет входы для трех лазерных блоков, выходы для трех детекторов и 8-позиционное колесо дихроичных зеркал, что обеспечивает системе гибкость и возможность расширения компонентами сторонних производителей, например для визуализации в режиме FLIM. Конфокальная диафрагма изменяемого размера позволяет оптимизировать диаметр отверстия в зависимости от используемого объектива и дополнительного увеличения. В ответ на запрос на наибольшую скорость сканирования, выпущена новая версия резонансного сканера, обеспечивающая сканирование с разрешением 1024 x 1024 пикселей со скоростью до 15 кадров в секунду (и вплоть до 420 кадров в секунду при 512 x 32 пикселей). Столь высокая скорость сканирования позволяет визуализировать даже кальциевые волны при использовании флуоресцентных зондов. В то же время качество изображения, получаемое резонансным сканером, существенно улучшено. Резонансное сканирование возможно для полного поля зрения или для меньшей области, с дополнительным увеличением. Второй, гальванический сканер может сканировать с большим пиксельным разрешением всё поле зрения или наборы областей интереса произвольной формы и размера. Гиперселектор позволяет разделять длины волн между сверхбыстрым резонансным сканером и быстрым сканером на основе гальванозеркал.

Стимуляция светом от лазера может осуществляться в областях интереса, выбранных вручную. Для стимуляции предлагается использовать гальванический сканер в конфокальной головке, или специализированные внешние устройства, в том числе на основе отклоняемых зеркал (DMD, digital mirror devices), когда скорости сканирующей головки недостаточно. Стимуляция может осуществляться лазерами как в видимом, так и в ИК диапазоне длин волн вплоть до 1300нм. Выбор областей для стимуляции осуществляется в единой программной среде управления всей системой, и эти данные сохраняются вместе с полученной серией изображений.

Оснащенные гиперселектором специализированные сканирующие головки позволяют строго одновременно осуществлять возбуждение на 405 нм гальваносканером и визуализацию с возбуждением 488/561/640нм резонансным сканером. Специализированные внешние устройства для стимуляции также позволяют проводить стимуляцию одновременно с наблюдением флуоресценции.

Получение изображений в полном поле зрения или в выбранных областях интереса осуществляется детекторами нескольких типов. Наиболее чувствительные - NDD детекторы на основе GaAsP PMT используются при возбуждении ИК лазером, находятся в оптическом пути непосредственно за объективом. На четыре датчика в этом детекторе свет попадает с минимальными потерями, пройдя лишь через зеркало и кубики светофильтров. На прямые микроскопы Ni и FN1 может быть установлен и второй NDD детектор, диаскопический, что позволяет со-

брать еще больше света при работе со срезами мозга млекопитающих или целыми мелкими беспозвоночными и рыбами.

Для лазерной сканирующей конфокальной микроскопии Nikon предлагает высокочувствительный 4-канальный детектор. Длины волн, детектируемые в каждом из каналов, определяются светофильтрами в кубиках перед датчиками, что позволяет проводить одновременную съемку в четырех диапазонах длин волн. Кубики установлены в 6-позиционные моторизованные туррели, которые позволяют быстро переопределять спектральный диапазон чувствительности для каждого из каналов даже в ходе эксперимента. Дополнительно может быть установлен спектральный детектор с батареей из 32 датчиков, позволяющий измерять и картировать спектры флуоресценции, а также с высокой точностью разделять флуоресцентные сигналы по спектрам. Эти и другие детекторы могут применяться и для детекции флуоресценции при мультифотонном возбуждении, а также при генерации второй и третьей гармоник фемтосекундным лазером.

Разработанный для мультифотонной микроскопии *in vivo* объектив Nikon CFI75 Achromat 25xW MP1300 для водной иммерсии обеспечивает наибольшую числовую апертуру в отрасли, равную 1,10, при этом его рабочее расстояние составляет 2,0 мм. Коррекционное кольцо позволяет использовать его как с покровным стеклом, так и без стекла. Объектив обладает высокой светопропускаемостью в диапазоне длин волн 400-1300 нм благодаря покрытию <<Nano Crystal Coat>>, уменьшающему отражение от поверхностей линз. Другие объективы Nikon также рекомендуются и могут быть использованы для конфокальной и мультифотонной визуализации.

Высокая мощность лазера и светочувствительность системы детекции позволяют проводить визуализацию на большей глубине, компенсируя потери из-за поглощения и рассеяния в ткани, и являются ключевыми факторами для более быстрого получения изображений. Высокая мощность, широкий диапазон длин волн (до 1300 нм) и фемтосекундное разрешение делает лазеры последнего поколения идеальным источником и для одновременного возбуждения большого числа клеток в оптогенетическом эксперименте. Фокусировка фемтосекундного лазера осуществляется автоматической системой, что существенно упрощает и ускоряет ход работы при необходимости менять длину волны в ходе эксперимента.

Управление системой, настройка съемки, анализ изображений осуществляются в ПО NIS Elements. Эта программа позволяет управлять всеми компонентами нашего производства, а также многими сторонними компонентами. В том числе, получение изображений может быть синхронизировано со стимуляцией области мозга светом через вживленное оптоволокно. Мощные пакеты обработки и анализа изображений не только могут быть использованы для подготовки иллюстраций, численных данных и графиков, но и поставлять данные, определяющие дальнейший ход автоматизированной съемки (например, может быть выполнен автоматический переход к съемке на большом увеличении в области, где высокопроизводительный анализ на малом увеличении обнаружил сигнал интереса).

Таким образом, мультифотонная система Nikon A1R MP является мощным инструментом для визуализации флуоресценции и направленного воздействия светом на образец. Постоянно проводимые улучшения системы в последнее время были прицельно направлены на поддержание различных методик оптогенетических экспериментов, увеличение производительности и удобство работы с системой. В то же время A1R MP остается гибкой модульной системой, готовой к решению широкого круга классических задач флуоресцентной визуализации и анализа.

## ВКЛАД ГЛИИ БЕРГМАНА В ПАТОГЕНЕЗ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ПРИМЕРЕ МОДЕЛИ СЕЛЕКТИВНОГО АСТРОГЛИОЗА МОЗЖЕЧКА

Шуваев А.Н.<sup>1,3</sup>, Белозор О.С.<sup>1</sup>, Якимова Я.С.<sup>1</sup>, Каспаров С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого, НИИ молекулярной биологии и патобиохимии, г. Красноярск, Россия

<sup>2</sup> Лаборатория физиологии, фармакологии и нейробиологии Университета г. Бристоль, Великобритания;

<sup>3</sup> Лаборатория нейрофизиологии и нейровосстановления Университета г. Гунма, Япония  
E-mail: shuvaevanton@hotmail.com

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы с помощью оптогенетики, создать модель селективного астроглиоза мозжечка и изучить влияние реактивной глии Бергмана на функцию нейронов, так называемых клеток Пуркинье (Custer с соавт., 2006). В качестве модели использовали мышей линии ICR (CD-1), весом  $\approx 30$ -40гр, возрастом р60. В кору червя мозжечка стереотаксически вводили по 10 $\mu$ л раствора, содержащего до  $3,4 \times 10^7$ /мл частиц аденовирусного вектора AVV GFAP-ChR2-mKate2 (Figueiredo с соавт., 2014; Рис. 1А). В качестве контроля инъецировали 10 $\mu$ л 1х натрий-фосфатного буфера (PBS). Через 4 дня мышь декапетировали и изучали экспрессию трансгенного маркера mKate (Рис. 1В), ёмкость, сопротивление мембраны и синаптическую передачу в клетках Пуркинье переживающих срезов мозжечка методом локальной фиксации потенциала, в целом следуя протоколам Llano с соавт. (1991). Регистрировали постсинаптические токи в клетках Пуркинье (ПВ-ВПСТ) вызванные стимуляцией параллельных волокон. Используя программу <<ClampFit>>, рассчитывали константу ( $\tau$ ) времени спада ПВ-ВПСТ при аппроксимации экспоненты кривой с помощью уравнения Чебышёва. У мышей, инъецированных PBS и AVV GFAP-ChR2-mKate2 без фотостимуляции усреднённые ёмкости клеток Пуркинье мозжечка составляли  $550,1 \pm 36$  pF (n=10) и  $473,5 \pm 24,5$  pF (n=16), соответственно, но статистически не различались (p=0,12). Сопротивление мембраны также достоверно не различалось  $207,8 \pm 40,2$  M $\Omega$  и  $241,8 \pm 58,4$  M $\Omega$ , соответственно (p=0,65) (Рис. 3Б). Фотостимуляция астроцитов в срезах, экспрессирующих ChR2-mKate2 серией световых импульсов ( $\lambda \approx 480$ nm с частотой 0,1Гц, длительностью 20мсек и продолжительностью 1 мин) приводила к активации глии Бергмана и уменьшению  $\tau$  и амплитуды ПВ-ВПСТ. Непосредственно сразу после фотостимуляции (Рис. 2А)  $\tau$  ПВ-ВПСТ клеток Пуркинье в мозжечке животных инъецированных GFAP-ChR2-mKate2, составляло  $95,6 \pm 2,3\%$  (n = 11) от контрольных значений до фотостимуляции и статистически значимо различалось (p = 0,03; Рис. 2А, Б). Блокада обратного захвата глутамата (500nM ТВОА) увеличивала  $\tau$  и амплитуду ПВ-ВПСТ. На фоне ТВОА фотостимуляция не изменяла  $\tau$ . Так, непосредственно сразу после фотостимуляции  $\tau$  ПВ-ВПСТ в срезах, экспрессирующих GFAP-ChR2-mKate2, составляла  $106,4 \pm 5,1\%$  от контрольных значений при инкубации срезов в растворе, содержащем 500nM ТВОА, до фотостимуляции (n = 7, p = 0,61) (Рис. 2В, Г). Одним из возможных объяснений эффекта ChR2 может быть ослабление захвата глутамата астроцитами вызванным уменьшением градиента Na<sup>+</sup> которое происходит в результате открытия этого ионного канала и входа Na<sup>+</sup> в клетку.

В отдельной группе животных, астроциты, экспрессирующие ChR2-mKate, стимулировали in vivo в течении 4 дней повторными сериями импульсов ( $\lambda \approx 480$ nm с частотой 0,1Гц и длительностью 20мсек) в течение 60сек с последующим 60 секундным перерывом. Фотостимуляция осуществлялась посредством светодиода, фиксированного над зоной инъекции к костям черепа. В срезах из этих животных фотостимуляция астроцитов вызывала повышение, а не понижение  $\tau$ , тогда как амплитуда ПВ-ВПСТ не изменялась. Через 0,5 минут после окончания фотостимуляции  $\tau$  ПВ-ВПСТ у данных животных составляла  $110,7 \pm 4,0\%$  от контрольных значений до фотостимуляции (p = 0,02, n = 11; Рис. 3Г, Д). Кроме того, хроническая фотостиму-

ляция астроцитов вызывала уменьшение ёмкости клеток Пуркинье. Ёмкость клеток Пуркинье мозжечка животных инъецированных PBS и GFAP-ChR2-mKate2 без и с 4 дневной фотостимуляцией, составляла  $550,1 \pm 36,7$  pF ( $n = 10$ );  $473,5 \pm 24,5$  ( $n = 16$ ) и  $336,3 \pm 25,9$  pF ( $n = 15$ ), соответственно ( $p = 0,0003$  и  $p = 0,0009$ , соответственно), при статистически незначимом изменении сопротивления мембраны ( $p = 0,36$  и  $p = 0,8$ , соответственно) (Рис. 3Б,В). Это, скорее всего, указывает на уменьшение поверхности мембраны этих нейронов и их общего размера.

Эти данные были сопоставлены с результатами, полученными на моделях спиноцереbellарной атаксии 1-го типа (СЦА1) (Shuvaev с соавт., 2017 и неопубликованные данные). Так, в модели неселективной экспрессии мутантного Атаксина 1 в нейронах и астроглии (нок-инная модель СЦА1 - KI Sca1<sup>154Q/2Q</sup>; Watase с соавт., 2002) имеет место увеличение  $\tau$  ПВ-ВПСТ. Среднее  $\tau$  ПВ-ВПСТ составляет  $12,0 \pm 0,7$  мсек ( $n = 8$ ) в контроле и  $18,7 \pm 2,6$  мсек ( $n = 9$ ) у нок-инных мышей ( $p = 0,044$ ) (Рис. 4А). При селективной экспрессии мутантного Атаксина 1 в клетках Пуркинье (модель B05 - Sca1<sup>82Q/2Q</sup>) (Burrigh с соавт., 1995),  $\tau$  статистически значимо не изменялось и составляло  $9,4 \pm 1,0$  мсек ( $n = 13$ ) в контроле и  $7,9 \pm 0,8$  мсек ( $n = 15$ ) у B05 мышей ( $p = 0,25$ ) (Рис. 4Б). Полученные данные позволяют предположить что астроциты могут быть вовлечены в патогенез СЦА1, возможно за счет снижения обратного захвата, глутамата, что может вести к токсическому влиянию глутамата на клетки Пуркинье (Рис. 4В).

## BERGMANN GLIA CONTRIBUTION TO PATHOGENESIS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES IN THE MODEL OF SELECTIVE CEREBELLAR ASTROGLIOSIS

Shuvaev A.N.<sup>1,3</sup>, Belozor O.S.<sup>1</sup>, Yakimova Y.S.<sup>1</sup>, Kasparov S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.P.Voino-Yasenetsky, Scientific institute of molecular biology and pathobiochemistry, Krasnoyarsk city, P. Zheleznyak st. 1, Russia, e-mail: rector@krasgmu.ru <sup>2</sup>School of Physiology and Pharmacology, School of Medical Sciences, University of Bristol, BS8 1TD, UK <sup>3</sup>Department of Neurophysiology and Neural Repair, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi, Gunma, 371-8511, Japan.

The aim of this work was to create a model of selective astrogliosis of cerebellum and to study the influence of reactive Bergmann glia on Purkinje cells (Custer et al., 2006). Experiments were performed on p60 ICR (CD1) mice. To target astrocytes,  $10 \mu\text{l}$  of adenovirus AVV GFAP-ChR2-mKate2 ( $3.4 \times 10^7$  units/ml) (Figueiredo et al., 2014) was injected into cerebellar vermis (Fig. 1A). Four days later mice were euthanized, slices of cerebellum prepared and Purkinje cells studied using whole cell voltage clamp mode. Expression of GFAP-ChR2-mKate2 without photostimulation did not change overall morphology of Purkinje cells. Capacitance of Purkinje cells was  $550.1 \pm 36$  pF ( $n=10$ ) in control slices (injections of PBS) and  $473.5 \pm 24.5$  pF ( $n=16$ ) in ChR2-expressing animals, the change was not significant ( $p=0,12$ ) (Fig. 3B,C). Stimulation of parallel fibers evoked postsynaptic currents in Purkinje cells (PF-EPSC) as shown previously by Llano et al. (1991). <<ClampFit>> was used to calculate constant ( $\tau$ ) decay time of PF-EPSC, using the Chebyshev equation. Selective stimulation of astrocytes by series of light impulses ( $\lambda \approx 480\text{nm}$ , frequency 0,1Hz 20ms for 1 min duration) lead to shortening of EPSC decay time ( $\tau$ ) of PF-EPSC. Thus, in slices expressing ChR2, immediately after the photostimulation (1.5 minute in Fig. 2A) PF-EPSC  $\tau$  was  $95.6 \pm 2.3\%$  of control ( $n=11$ ) ( $p = 0.03$ ; Fig. 2A, B). Blockade of glutamate reuptake (500nM TBOA) increased amplitude of EPSCs and their  $\tau$ . On this background, photoactivation of astrocytes had no effect on either amplitude or  $\tau$  of PF-EPSC. Just after photoactivation  $\tau$  was  $106.4 \pm 5,1\%$  ( $n = 7$ ) of control which was incubated with 500nM TBOA ( $p = 0.61$ ) (Fig. 2C, D). Prolongation of  $\tau$  could result from reduction of the activity of glial glutamate transporters which are  $\text{Na}^+$  dependent, because opening of the non-selective cation channel ChR2 can be expected to reduce  $\text{Na}^+$  gradient.

In a separate group of mice injected with AVV GFAP-ChR2-mKate2 we applied repetitive series of light pulses ( $\lambda \approx 480\text{nm}$ , 20 msec at 0.1Hz, series of 1min with 60 min rest). Photostimulation was performed by and LED, fixed above the injection area to bones of the skull (Fig. 1B). 4 days

photostimulation led to prolongation of  $\tau$  PF-EPSC. In slices from these animals  $\tau$  was  $110.7 \pm 4.0\%$  from control levels before photostimulation ( $n=11$ ,  $p=0,02$ ) (Fig. 3D). This contrasts with the effects observed without chronic activation of astrocytes described above. Capacitance of Purkinje cells in animals injected with PBS, GFAP-ChR2-mKate2 without and with 4 days photostimulation was  $550,1 \pm 36,7$  pF ( $n=10$ );  $473.5 \pm 24.5$  pF ( $n=16$ ) and  $336,3 \pm 25,9$  pF ( $n=15$ ), respectively ( $p=0.0003$  and  $p=0.0009$ , respectively) (Fig. 3B, C), suggestive of a strong reduction of cell volume and membrane area.

These results have commonalities with what we had detected using a mouse knock-in model of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) (Shuvaev et al., 2017 and unpublished data). Using the non-cell-selective ataxin-1 expression in both, neurons and glia (knock in model SCA1 - KI Sca1<sup>154Q/2Q</sup>) (Watase et al., 2002) we found the prolongation of PF-EPSC  $\tau$  from  $12.0 \pm 0.7$  ms ( $n = 8$ ) in control to  $18.7 \pm 2.6$  ms ( $n = 9$ ) in SCA1 mice ( $p = 0.044$ ) (Fig. 4A). However this change was absent in mice which electively express mutant ataxin-1 in Purkinje cells (transgenic model B05 - Sca1<sup>82Q/2Q</sup>) (Burright et al., 1995). Averaged PF-EPSC  $\tau$  in WT and B05 SCA1 mice was  $9.4 \pm 1.0$  ms ( $n=13$ ) and  $7.9 \pm 0.8$  ms ( $n=15$ ), respectively, ( $p=0.25$ ). (Fig. 4B).

Our results suggest that astrocytes could be involved at the early stages of the development of SCA1. We speculate that in SCA1 reduction of glial uptake of glutamate could be a factor contributing to the neurodegeneration (Fig. 4C).

### Литература

- 1) Custer SK, Garden GA, Gill N, Rueb U, Libby RT, Schultz C, Guyenet SJ, Deller T, Westrum LE, Sopher BL, La Spada AR. Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. *Nat Neurosci.* 2006; 9(10): 1302-1311
- 2) Figueiredo M, Lane S, Stout RF, Jr., Liu B, Parpura V, Teschemacher AG, S. Kasparov. Comparative analysis of optogenetic actuators in cultured astrocytes. *Cell Calcium.* 2014; 56(3): 208--214
- 3) Llano I, Marty A, Armstrong CM, Konnerth A. Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *Journal of Physiology.* 1991; 434: 183-213
- 4) Shuvaev AN, Hosoi N, Sato Y, Yanagihara D, Hirai H. Progressive impairment of cerebellar mGluR signalling and its therapeutic potential for cerebellar ataxia in spinocerebellar ataxia type 1 model mice. *Journal of Physiology.* 2017; 595(1): 141-164
- 5) Watase K, Weeber EJ, Xu B, Antalffy B, Yuva-Paylor L, Hashimoto K, Kano M, Atkinson R, Sun Y, Armstrong DL, Sweatt JD, Orr HT, Paylor R, Zoghbi HY. A long CAG repeat in the mouse Sca1 locus replicates SCA1 features and reveals the impact of protein solubility on selective neurodegeneration. *Neuron.* 2002; 34(6): 905-919
- 6) Burright EN, Clark HB, Servadio A, Matilla T, Feddersen RM, Yunis WS, Duvick LA, Zoghbi HY, Orr HT. SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell.* 1995; 82, 937--948

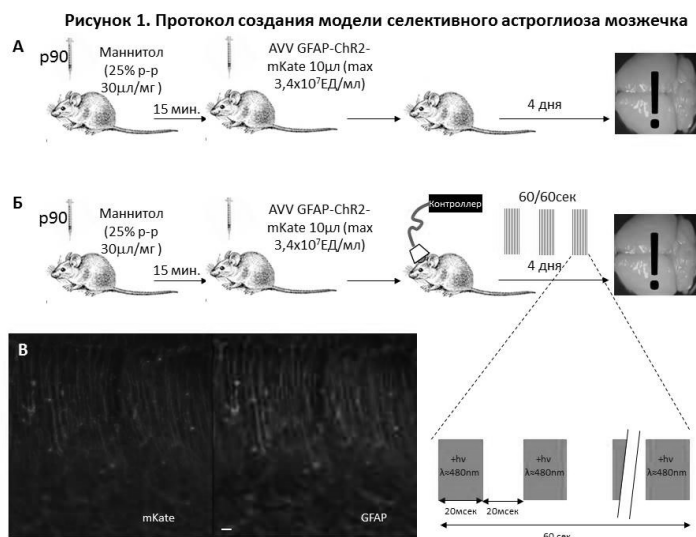


Рис. 1. Протокол создания модели селективного астроглиоза мозжечка. А. Протокол введения AVV GFAP-ChR2-mKate2 и временные точки забора материала для электрофизиологических и иммуногистохимических исследований. Б. Протокол введения AVV GFAP-ChR2-mKate2 и хронический 4 дневной фотостимуляции инфицированной коры мозжечка *in vivo*. Также указаны временные точки забора материала для электрофизиологических и иммуногистохимических исследований. В. Иммуногистохимический анализ срезов мозжечка, полученных от животных, экспрессирующих GFAP-ChR2-mKate2 без хронической фотостимуляции. Хорошо видны радиальные отростки глии Бергмана, окрашенные трансгенным белком mKate (красный сигнал) и антителами к GFAP (фиолетовый сигнал). Размерная шкала 10μм

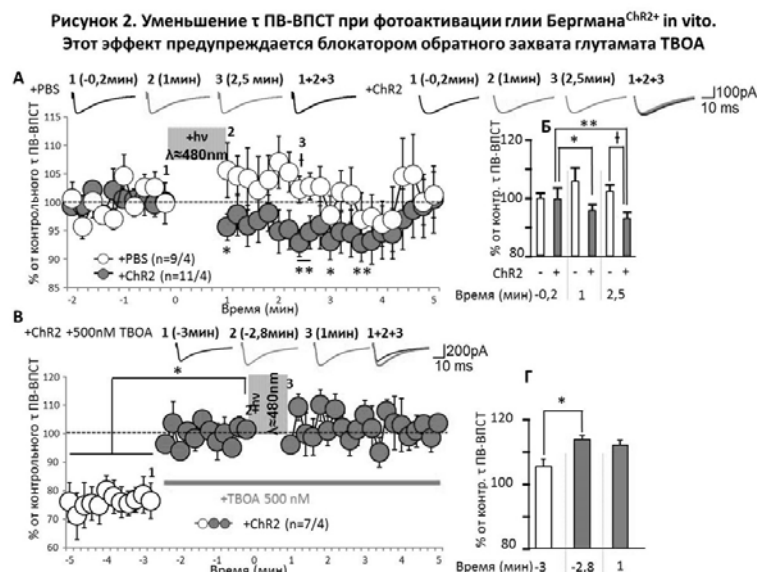


Рис. 2. Уменьшение  $\tau$  ПВ-ВПСТ при фотоактивации глии Бергмана<sup>ChR2+</sup> in vitro. Этот эффект предупреждается блоком обратного захвата глутамата ТВОА. А. Верхняя вкладка показывает репрезентативные кривые ПВ-ВПСТ от животных, инъецированных PBS и GFAP-ChR2-mKate2. Амплитуда ПВ-ВПСТ калибровалась на уровне, приблизительно 200-400 pA до фотостимуляции. Сводный график, показывает изменение относительной  $\tau$  ПВ-ВПСТ во времени, нормированного к контрольным показателям, до и после фотостимуляции. Б. Гистограмма, показывает относительное  $\tau$  ПВ-ВПСТ, нормированного к контрольным показателям, во временных точках, соответствующих -0,2 мин, 1 мин и 2,5 мин относительно начала фотостимуляции. В. Верхняя вкладка показывает репрезентативные кривые ПВ-ВПСТ от животных, инъецированных GFAP-ChR2-mKate2 при добавлении во внеклеточный раствор 500нМ ТВОА. Амплитуда ПВ-ВПСТ калибровалась на уровне, приблизительно 200-400 pA до фотостимуляции. Сводный график, показывает изменение относительной  $\tau$  ПВ-ВПСТ во времени, нормированной к контрольным показателям в присутствии 500 нМ ТВОА, до и после фотостимуляции. Г. Гистограмма, показывающая относительное  $\tau$  ПВ-ВПСТ, нормированной к контрольным показателям в присутствии 500 нМ ТВОА, во временных точках, соответствующих -3 мин, -2,8 мин и 1 мин относительно начала фотостимуляции. \* показывает статистически значимое отличие между показателями до и после стимуляции, † показывает статистически значимое отличие между данными, полученными от животных инъецированных PBS и GFAP-ChR2-mKate2 в одной временной точке. Различия найдены с помощью t-критерия Стьюдента, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; †  $p < 0,05$ .

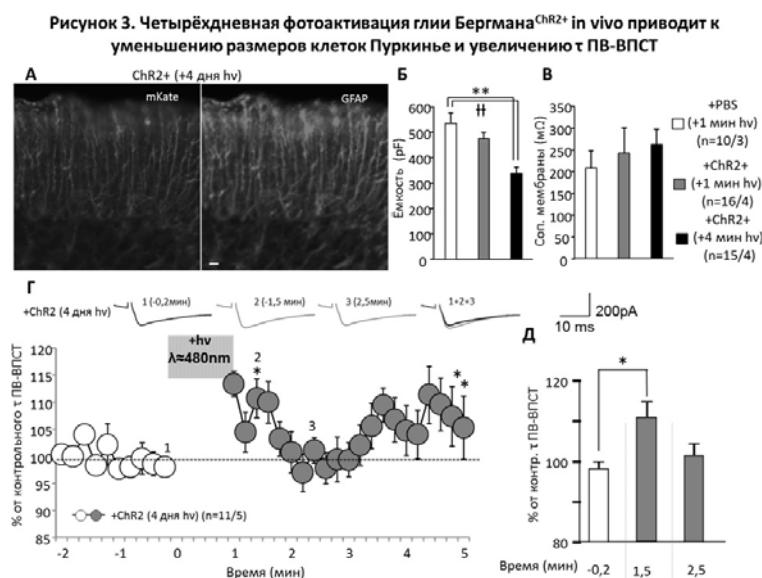


Рис. 3. Нарушение синаптической передачи ПВ-КП при хронической активации глии Бергмана ChR2+ in vivo с помощью фотостимуляции. А. Иммуногистохимический анализ срезов мозжечка, полученных от животных, экспрессирующих GFAP-ChR2-mKate2 после хронической фотостимуляции. Хорошо видны радиальные отростки глии Бергмана, окрашенные трансгенным белком mKate (красный сигнал) и антителами к GFAP (фиолетовый сигнал). Размерная шкала 10  $\mu$ m. Б. Гистограмма, показывающая усреднённую ёмкость клеток Пуркинье мозжечка мышей, инъецированных PBS, а так же GFAP-ChR2-mKate2, подвергавшихся и не подвергавшихся хронической фотостимуляции. В. Гистограмма, показывающая усреднённое сопротивление мембраны клеток Пуркинье мозжечка мышей, инъецированных PBS, а так же GFAP-ChR2-mKate2, подвергавшихся и не подвергавшихся хронической фотостимуляции. \* показывает статистически значимое отличие между PBS инъецированными животными и GFAP-ChR2-mKate2 инъецированными животными после хронической фотостимуляции, # показывает статистически значимое отличие между данными, полученными от животных инъецированных GFAP-ChR2-mKate2 подвергавшимся и не подвергавшимся фотостимуляции. Различия найдены с помощью однофакторного дисперсионного анализа, \*\*  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,01$ . Г. Верхняя вкладка показывает репрезентативные кривые ПВ-ВПСТ от животных, инъецированных GFAP-ChR2-mKate2. Амплитуда ПВ-ВПСТ калибровалась на уровне, приблизительно 200-400 pA до фотостимуляции. Сводный график, показывает изменение относительного  $\tau$  ПВ-ВПСТ во времени, нормированного к контрольным показателям, до и после фотостимуляции Д. Гистограмма, показывает относительное  $\tau$  ПВ-ВПСТ, нормированного к контрольным показателям, во временных точках, соответствующих -0,2 мин, 1,5 мин и 2,5 мин относительно начала фотостимуляции \* показывает статистически значимое отличие между показателями до и после стимуляции. Различия найдены с помощью t-критерия Стьюдента.



Рисунок 3. Увеличение  $\tau$  ПВ-ВПСТ у модельных СЦА1 мышей с экспрессией мутантного Атаксина-1 в нейронах и глии мозжечка

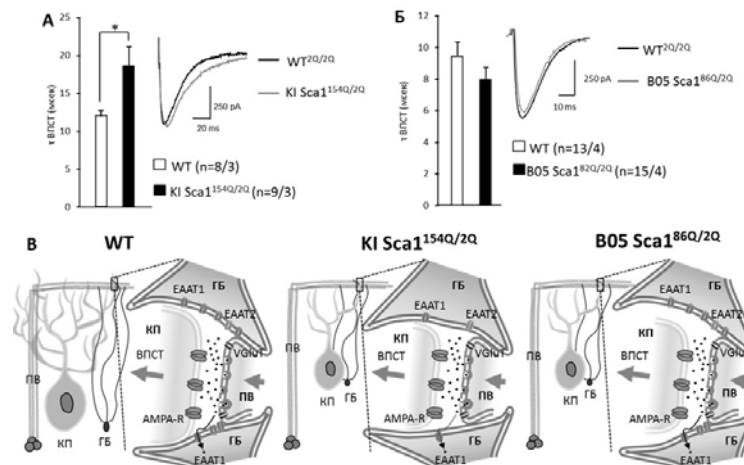


Рис. 4. Патологические изменения синаптической передачи в клетках Пуркинью модельных СЦА1 мышей на ранней стадии заболевания (р30-40) А. Гистограмма, показывающая усреднённое время спада амплитуды ПВ-ВПСТ. Справа от гистограммы представлены репрезентативные кривые ПВ-ВПСТ, полученные от нокинутых мышей, больных СЦА1 (KI Sca1<sup>154Q/2Q</sup>) и их однопомётных мышей дикого типа. Б. Гистограмма, показывающая усреднённое время спада амплитуды ПВ-ВПСТ. Справа от гистограммы представлены репрезентативные кривые ПВ-ВПСТ, полученные от трансгенных мышей, больных СЦА1 (B05 Sca1<sup>182Q/2Q</sup>) и их однопомётных мышей дикого типа. \* показывает статистически значимое отличие между WT и СЦА1 модельными мышами. Различия найдены с помощью t-критерия Стьюдента. В. Симуляционное изображение, показывающее возможный механизм влияния астроглии на синаптическую передачу на ранней стадии нейродегенеративного процесса. Сокращения: AMPA-R - рецептор  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты; EAAT -- транспортёр возбуждающих аминокислот; GluT -- везикулярный транспортёр глутамата; ВПСТ -- возбуждающий постсинаптический ток; КП -- клетка Пуркинью; ГБ -- глия Бергмана; ПВ -- параллельные волокна.

## СРАВНЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ЭКЗО- И ЭНДОЦИТОЗА СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ В НЕРВНОМ ОКОНЧАНИИ МЫШИ В АЛЛОКСАНОВОЙ И СТРЕПТОЗОЦИНОВОЙ МОДЕЛЯХ САХАРНОГО ДИАБЕТА

**Ярмиев И.З., Яковлева О.В.**

*КФУ, г. Казань, Россия*

*E-mail: yarmiev82@gmail.com*

Сахарный диабет (СД) - хроническое заболевание эндокринной системы человека, характеризующееся длительным повышением концентрации глюкозы в крови, вследствие абсолютной и относительной недостаточности гормона инсулина и сопутствующими изменениями процесса обмена веществ [Said, 2007]. Одним из серьезных осложнений СД являются периферические нейропатии, которые характеризуются мышечной слабостью, атрофией мышц, функциональными нарушениями двигательных нервных волокон, а также изменениями в нервно-мышечной передаче [Garcia, 2012; Said, 2007]. Несмотря на различные механизмы действия на  $\beta$ -клетки поджелудочной железы стрептозоцин и аллоксан являются наиболее исследованными и используемыми веществами для создания модели сахарного диабета первого типа. Целью исследования было сравнение процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в нервно-мышечном соединении мышцы в моделях аллоксанового и стрептозоцинового сахарного диабета. Экспериментальный СД первого типа вызывали внутрибрюшинным введением аллоксана (250 мг/кг, Sigma), либо стрептозоцина (80 мг/кг, Sigma) после суточного голодания. Для подтверждения развития у модельных животных СД первого типа проводили измерение уровня глюкозы в крови каждые 10 дней и на 45 день животные с уровнем глюкозы выше 9 ммоль/л выводились из опыта. Эксперименты на животных были одобрены Локальным этическим комитетом КФУ (протокол № 8 от 05.05.2015). Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы лабораторных белых мышей. Для исследования процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул использовали флуоресцентный маркер FM 1-43 (3 мкМ), который обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза оказывается внутри вновь образованных синаптических везикул нервной терминали (<<загружается>> в нервное окончание) [Яковлева, 2017]. Использовали три протокола <<загрузки>>. В первом случае FM 1-43 присутствовал в растворе в течение 1 мин во время стимуляции 50 Гц, во втором - 7 мин после ее окончания, в третьем - 1 мин во время стимуляции и 7 мин после ее окончания. Регистрацию свечения нервных окончаний проводили с помощью микроскопа AxioScope A1, оснащенного быстродействующей черно-белой видеокамерой AxioCam MRm (<<Carl Zeiss>>, Германия).

У контрольных животных при добавлении FM 1-43 по третьему протоколу свечение нервных терминалей составило  $87 \pm 2$  о.е. ( $n=12$ ), при добавлении красителя по первому протоколу ---  $85 \pm 2$  о.е. ( $n=14$ ), при добавлении красителя по второму протоколу ---  $56 \pm 3$  о.е. ( $n=13$ ). Известно, что в двигательных нервных окончаниях мышцы преобладают процессы быстрого эндоцитоза синаптических везикул, которые обеспечивают восполнение рециклирующего пула [Betz, 2005]. Поэтому <<загрузка>> красителя во время стимуляции больше, чем после ее окончания. У животных с аллоксановым СД свечение нервных терминалей во всех трех протоколах <<загрузки>> красителя достоверно увеличивалось ( $95 \pm 2$  о.е.,  $99 \pm 2$  о.е.,  $61 \pm 3$  о.е.  $n=11$ ,  $p<0.05$ ). Так же мы можем наблюдать преобладание свечения терминалей при загрузке во время стимуляции над полной <<загрузкой>>. Аналогичные результаты мы получили и при анализе <<загрузок>> у животных с стрептозоциновым СД ( $93 \pm 2$  о.е.,  $100 \pm 2$  о.е.,  $62 \pm 3$  о.е.  $n=9$ ,  $p<0.05$ , Рис. 1а). С помощью блокатора медленного опосредованного динамином 1 эндоцитоза - 1-azakenpaullone было подтверждено, что эти изменения связаны с усилением медленного пути

эндоцитоза вследствие повышения активности киназы-3 гликогенсинтазы при СД [Яковлева, 2017]. В контроле 1-azakenpaullone (30 мин действия) не влиял на свечение нервных терминалей, загруженных по 3 протоколу ( $81 \pm 4$  о.е.,  $n=5$ , Рис. 1а). В тоже время у животных с аллоксановым и стрептозоциновым СД происходило снижение свечения до  $65 \pm 2$  о.е. и  $74 \pm 4$  о.е., ( $n=6$  и  $7$ ,  $p < 0.05$ , Рис. 1а) соответственно, что достоверно меньше загрузки красителя у модельных животных в отсутствие блокирования GSK3. С помощью блокатора медленного опосредованного динамином 1 эндоцитоза - 1-azakenpaullone было подтверждено, что эти изменения связаны с усилением медленного пути эндоцитоза вследствие повышения активности киназы-3 гликогенсинтазы при СД [Яковлева, 2017]. В контроле 1-azakenpaullone (30 мин действия) не влиял на свечение нервных терминалей, загруженных по 3 протоколу ( $81 \pm 4$  о.е.,  $n=5$ , Рис. 1а). В тоже время у животных с аллоксановым и стрептозоциновым СД происходило снижение свечения до  $65 \pm 2$  о.е. и  $74 \pm 4$  о.е., ( $n=6$  и  $7$ ,  $p < 0.05$ , Рис. 1а) соответственно.

Для определения динамики экзоцитоза синаптических везикул регистрировали уменьшение интенсивности свечения (<<выгрузка>> красителя) предварительно загруженных нервных терминалей при стимуляции с частотой 50 Гц в течение 20 мин. В контроле интенсивность свечения нервных окончаний к 15 с стимуляции составила  $70 \pm 2\%$ , к 30 с -  $63 \pm 2\%$ , к концу 1 мин -  $55 \pm 3\%$ , по отношению к начальному уровню свечения ( $n=12$ ). К 20 мин стимуляции происходила полная выгрузка красителя и свечение терминалей практически не регистрировалось. У животных с аллоксановым СД обесцвечивание нервных терминалей в течение первых 3 мин происходило медленнее, чем в контроле (Рис. 1б). Так к 15 с стимуляции интенсивность свечения составила  $83 \pm 2\%$ , к 30 с -  $74 \pm 3\%$ , к концу 1 минуты -  $64 \pm 2\%$ , ( $n=10$ ,  $p < 0.05$ ). У животных с стрептозоциновым СД обесцвечивание нервных терминалей в течение первых 3 мин происходило также медленнее, чем в контроле (Рис. 1б). Так к 15 с стимуляции интенсивность свечения составила  $91 \pm 2\%$ , к 30 с -  $82 \pm 3\%$ , к концу 1 минуты -  $74 \pm 2\%$ , по отношению к начальному уровню свечения ( $n=10$ ,  $p < 0.05$ ).

Таким образом, не зависимо от способа моделирования СД первого типа в нервно-мышечном соединении мышцы происходит нарушение процесса рециклирования и эти изменения связаны с усилением медленного пути эндоцитоза вследствие повышения активности киназы-3 гликогенсинтазы.

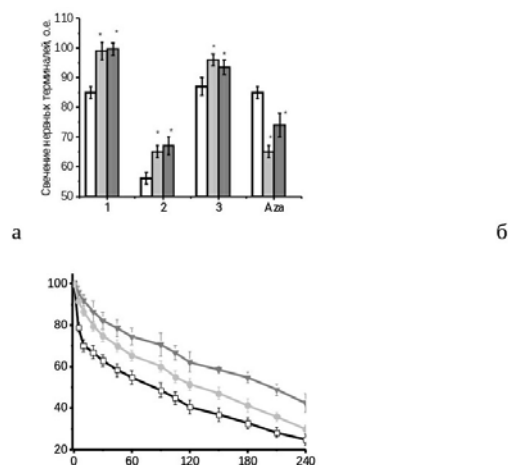


Рис. 1. Процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании мышцы в условиях экспериментального сахарного диабета. а - Интенсивность свечения нервных терминалей в контроле (белые столбики), при аллоксановом (светло-серые столбики) и стрептозоциновом (темно-серые столбики) СД при <<загрузке>> красителя в соответствии с протоколами 1-3, aza --- в присутствии блокатора GSK3 - 1-azakenpaullone (2 мкМ). б - Динамика спада интенсивности свечения нервных окончаний при стимуляции с частотой 50 Гц в течение первых трех минут. Белые квадраты отражают динамику спада в контроле, светло-серые круги -- в условиях аллоксанового, темно-серые треугольники --- в условиях стрептозоцинового СД.

## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

### А

Абушик П.А., 78  
Алексеева О.С., 65  
Анохин К.В., 27, 42  
Антонов С.М., 78, 112  
Артамонов Д.Н., 24

### Б

Баженова А.С., 92  
Балабан П.М., 49  
Безпрозванный И.Б., 24, 32, 37  
Белозор О.С., 116  
Беляева Т.Н., 92  
Бобков Д.Е., 89  
Бондарева В.М., 96  
Брежестовский П.Д., 21, 23  
Булыгина В.В., 30  
Бухараева Э.А., 67, 108

### В

Васильев Д.С., 65, 70  
Винарская А.Х., 49  
Власова О.Л., 24, 32, 37, 53

### Г

Гильмутдинов А.И., 72  
Груздева А.М., 27

### Д

Деркач К.В., 96, 107  
Долгих Д.А., 40  
Дрозд У.С., 30  
Дубровская Н.М., 65, 70  
Дыгало Н.Н., 30

### Е

Екимова И.В., 98  
Ерофеев А.И., 24, 32, 53

### Ж

Жиляков Н.В., 67, 108  
Журавин И.А., 65, 70

### З

Зайцев А.В., 53, 56  
Закирьянова Г.Ф., 72  
Зачепило Т.Г., 74  
Зефиоров А.Л., 72  
Зыкин П.А., 75, 83

### И

Иванова М.А., 78, 112  
Ивашкина О.И., 27, 42

### К

Калинина Т.С., 30  
Каменцева Р.С., 80  
Карелина Т.В., 78, 112  
Каспаров С., 116  
Кирпичников М.П., 40  
Колотова Д.Е., 49  
Коншу Д.А., 30  
Корнилова Е.С., 80, 92  
Кошеверова В.В., 80  
Краснощекова Е.И., 75, 83  
Крылов Б.В., 87  
Кубасов И.В., 89  
Кузнецова Л.А., 107

### Л

Ланшаков Д.А., 30  
Леонтьева Е.А., 92  
Литвинов И.К., 80, 92  
Лопатина Н.Г., 74

### М

Маломуж А.И., 67  
Мальшев А.Ю., 34, 49  
Матвеев М.В., 37  
Михайлова Е.В., 96  
Михрина А.Л., 107  
Морина И.Ю., 97, 107

### Н

Наливаева Н.Н., 70  
Насыров Р.А., 75, 83  
Некрасова О.В., 40  
Низамиева А.А., 39  
Никольский Е.Е., 67, 108

### О

Орлова А.О., 92

### П

Пенниайнен В.А., 87  
Петров А.М., 72  
Петровская Л.Е., 40  
Писклова М.В., 42  
Плаксина Д.В., 98  
Плахова В.Б., 87

Пруцкова Н.П., 104

## **Р**

Романова И.В., 96, 97, 107

Рошин М.В., 49

Рязанцев М.Н., 47

## **С**

Самигуллин Д.В., 67, 108

Селивёрстова Е.В., 104

Сибаров Д.А., 78, 112

Ситникова Л.С., 78, 112

Смирнова Г.Р., 49

Смирнова Е.Ю., 53, 56

Смирнова Т.А., 114

Степаненко Ю.Д., 112

Субач Ф.В., 27

Сухарева Е.В., 30

Сухов И.Б., 107

## **Т**

Ткаченко Л.А., 75, 83

Туманова Н.Л., 65, 70

## **Х**

Хазиев Э.Ф., 67, 108

Харченко М.В., 80

## **Ц**

Ценцевицкий А.Н., 72

Цыцарев В.Ю., 60

## **Ч**

Чижов А.В., 53, 62

## **Ш**

Шишкина Г.Т., 30

Шпаков А.О., 96, 107

Штыров А.А., 64

Шуваев А.Н., 116

## **Я**

Якимова Я.С., 116

Яковлева О.В., 123

Ярмиев И.З., 123

## **А**

Анохин К.В., 13

Astakhova L.A., 18

## **В**

Belousov V.V., 9

Blakley S.M., 9

Budygin E.A., 16

## **Г**

Fedotov A.B., 9, 13

Fedotov I.V., 9, 13

Firsov M.L., 18

## **Г**

Gainetdinov R.R., 16

## **Н**

Hemmer P., 9

## **И**

Ivashkina O.I., 13

## **К**

Kelmanson I.V., 9

Kilin S.Ya., 9

## **М**

Martynov G.N., 9

Mikhailova M.A., 16

## **Н**

Nalivaeva N.N., 17

## **Р**

Pochechuev M.S., 13

## **Р**

Roshchina M.A., 13

Rotov A.Yu., 18

Ryazantsev M.N., 18

## **С**

Sidorov-Biryukov D.A., 9, 13

Sitnikova V.S., 18

## **Т**

Turner A.J., 17

## **З**

Zheltikov A.M., 9, 13

ПЕРВАЯ ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ И ШКОЛА С МЕЖДУНАРОДНЫМ  
УЧАСТИЕМ «ОПТОГЕНЕТИКА И ОПТОФАРМАКОЛОГИЯ»

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ**

**Санкт-Петербург, 11-15 апреля 2018 года**

ЛОКАЛЬНЫЙ ОРГКОМИТЕТ ПЕРВОЙ ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ И ШКОЛЫ С  
МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «ОПТОГЕНЕТИКА И ОПТОФАРМАКОЛОГИЯ»

**К.Х. Ким** (председатель), **Е.И. Гальперина** (сопредседатель), **А.О. Шпаков** (зам. председате-  
ля); Секретариат: **Л.В. Криворука**, **Н.П. Андогская**, **М.Н. Белова**, **И.Д. Чижова**; Группа под-  
готовки программы и сборника: **О.В. Кручинина**, **И.В. Смоленский**; Оргмероприятия: **И.Б.**  
**Сухов**, **С.Л. Малкин**, **Е.М. Фок**, **О.С. Алексеева**, **Т.В. Карелина**; Техническая группа: **Г.Ю.**  
**Паскаренко**, **Ю.А. Карелин**, **А.М. Орлов**, **К.А. Заварзин**, **В.Н. Шипилов**, **В.В. Киреев**, **Н.Ф.**  
**Сарема**, **Т.В. Багрова**, **Т.И. Балашова**, **Д.Л. Тихонравов**, **Д.С. Васильев**, **М.А. Гузеев**, **В.Б.**  
**Карякин**, **В.Е. Симахин**; Финансовая группа: **И.С. Коршунова**, **Е.С. Панфилова**; Междуна-  
родные связи: **Т.Е. Нестерова**.

Утверждено Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институтом  
эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,  
194223, пр. Тореца, 44, Санкт-Петербург.

Сборник научных трудов. ГОСТ 7.60-2003 СИБИД  
Оригинал-макет подготовлен  
**О.В. Кручининой, С.Л. Малкиным**

Подписано к печати 2.04.2018. Формат 60 x 84 7g. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать цифровая.  
Усл. печ. л. 5,81. Тираж 100 экз. Заказ № 468.

Отпечатано в Издательстве ВВМ . 198095, Санкт-Петербург, ул. Швецова, 41.