

---

---

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
Российской академии наук

III ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ  
УЧАСТИЕМ

**«ОПТОГЕНЕТИКА+ 2023»**

И ШКОЛА ПО СОВРЕМЕННЫМ МЕТОДАМ НЕИНВАЗИВНОГО  
КОНТРОЛЯ НЕЙРОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

6–8 апреля 2023 года

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Санкт-Петербург

2023

УДК 591.181  
ББК Е991.3-73с251.3я431(2)  
О 62

Рецензент:  
академик РАН, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биофизики синаптических процессов ИЭФБ РАН  
*Магазаник Л.Г.*

**Третья всероссийская научная конференция с международным участием «Оптогенетика+ 2023» и Школа по современным методам неинвазивного контроля нейрональной активности**, Санкт-Петербург, 6–8 апреля 2023 г.: Сборник научных трудов / Под общ. ред. член-корр. РАН, д.б.н. М. Л. Фирсова. — СПб.: BVM, 2023. — 130 с.

ISBN 978-5-9651-1468-9

В сборнике представлены материалы III Всероссийской научной конференции с международным участием «Оптогенетика+ 2023», которую организует и проводит Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Основной целью Конференции является обсуждение актуальных проблем и современного состояния исследований и разработок в области оптогенетики. Конференция регулярно собирает лучших отечественных и зарубежных специалистов. Название «Оптогенетика» было задано еще на первой конференции, состоявшейся в 2018 году, где основное внимание было уделено оптогенетическим исследованиям и инструментам. За прошедшие 5 лет спектр методик управления активностью нейронов существенно расширился за счет появления термо- и хемогенетических технологий, которые предоставляют иные, по сравнению с оптогенетикой, возможности воздействия на клетки. Расширение обсуждаемого набора методик отразилось в названии конференции – «Оптогенетика+». Так, в проблематике оптогенетики и оптопротезирования представлены материалы академика М.А. Островского, Д.Е. Колотовой, Д.А. Мешалкиной и др. Широко раскрыта тема оптофармакологии (П.Д. Брежестовский, М.В. Николаев, А.Н. Ноев, М.Н. Рязанцев и др.). В тезисах докладов А.В. Зайцева, Н.А. Лизуновой, А.Н. Шуваева, О.Л. Власовой раскрывается направление методических основ коррекции патологических состояний мозга. Работы Д.В. Самигуллина, Д.В. Колесова и А.И. Костюка посвящены разработкам новых оптических и хемогенетических сенсоров. О.В. Подгорный описал новые термогенетические технологии управления нервными сетями.

Очевидно, что представленные в сборнике материалы демонстрируют современное состояние исследований и использование передовых методик в данных направлениях, тем самым отражая запрос фундаментальной науки и медицинской практики на расширение набора неинвазивных или малоинвазивных инструментов, необходимых для эффективного таргетного воздействия на нейроны.

Сборник материалов III Всероссийской научной конференции с международным участием «Оптогенетика+ 2023» представляет интерес для исследователей в области физиологии, нейробиологии, физики, врачей, студентов, а также для широкого круга специалистов смежных направлений.

Под общей редакцией член-корр. РАН, д.б.н. М.Л. Фирсова

Конференция включена в список мероприятий, проходящих в рамках Десятилетия науки и технологий. Партнер Конференции и Школы: ООО "Компания "АЗИМУТ ФОТОНИКС".

Информационная поддержка: портал "Нейроновости" (Neuronovosti.Ru).

Конференция проводится при поддержке НЦМУ Павловский центр "Интегративная физиология – персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости" грант № 075-15-2022-296.

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН), 2023 г.

**April 6–8, 2023 OPTOGENETICS+ 2023**

---

Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation  
Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS

III BIENNIAL CONFERENCE  
**OPTOGENETICS+ 2023**

and the Workshop on Advanced Methods of Non-Invasive Control of Neuronal Activity

April 6–8, 2023

ABSTRACTS

Saint Petersburg

2023

ОРГКОМИТЕТ ТРЕТЬЕЙ ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ  
УЧАСТИЕМ «ОПТОГЕНЕТИКА+ 2023» И ШКОЛЫ ПО СОВРЕМЕННЫМ МЕТОДАМ  
НЕИНВАЗИВНОГО КОНТРОЛЯ НЕЙРОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

***Председатель оргкомитета:***

член-корр. РАН **Фирсов М.Л.**, директор ИЭФБ РАН

***Заместитель председателя оргкомитета:***

к.б.н. **Ким К.Х.**, заместитель директора ИЭФБ РАН

***Члены оргкомитета:***

к.б.н. **Гальперина Е.И.**, ученый секретарь ИЭФБ РАН

к.б.н. **Сухов И.Б.**, специалист по научно-организационной работе ИЭФБ РАН

к.б.н. **Кручинина О.В.**, научный сотрудник ИЭФБ РАН

к.б.н. **Шпилов В.Н.**, начальник ЦКП ИЭФБ РАН

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ:

***Председатель программного комитета:***

член-корр. РАН **Фирсов М.Л.**, ИЭФБ РАН

***Члены программного комитета:***

академик РАН **Анохин К.В.**, МГУ;

академик РАН **Балабан П.М.**, ИВНДИНФ РАН;

член-корр. РАН **Белюсов В. В.**, ФЦМН;

к.б.н. **Билан Д.С.**, ИБХ РАН;

д.б.н. **Брежестовский П.Д.**, КГМУ / INSERM;

д.б.н. **Зайцев А.В.**, ИЭФБ РАН;

д.б.н. **Малышев А.Ю.**, ИВНДИНФ РАН;

академик РАН **Островский М.А.**, ИБХФ РАН / МГУ.

**CONFERENCE ORGANIZING COMMITTEE**

**Chairman:**

**Firsov M.L.**, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS

**Deputy Chairman:**

**Kim K.Kh.**, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS

**Members of the organizing committee:**

**Galperina E.I.**, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS

**Sukhov I.B.**, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS

**Kruchinina O.V.**, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS

**Shipilov V.N.**, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS

**PROGRAM COMMITTEE:**

**Chairman:**

**Firsov M.L.**, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS

**Program committee members:**

**Anokhin K.V.**, Moscow State University / Anokhin Institute of Normal Physiology

**Balaban P.M.**, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS

**Belousov V.V.**, Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies / Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry / Pirogov Russian National Research Medical University

**Bilan D.S.**, Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences / Pirogov Russian National Medical Research University

**Bregestovski P.D.**, Kazan State Medical University / INSERM Institute of System Neuroscience

**Zaitsev A.V.**, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS,

**Malyshev A.Yu.**, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS,

**Ostrovsky M.A.**, Institute of Biochemical Physics RAS / Moscow State University

**ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Абакумов М.А. <sup>1,\*</sup>, Габашвили А.Н. <sup>1</sup>, Ефремова М.В. <sup>1,2</sup>, Семкина А.С. <sup>1</sup>  
<sup>1</sup> ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия  
<sup>2</sup> Гельмгольц центр, Мюнхен, Германия  
*\*E-mail: abakumov1988@gmail.com*

Магнитные наноматериалы на основе наночастиц оксидов железа находят все больше применений в различных областях биомедицины, в частности они могут выступать в качестве T2 контрастных агентов для МРТ. Магнитные наночастицы оксида железа обладают низкой токсичностью, а их модификация определенными покрытиями позволяет получать стабильные водные коллоидные растворы, пригодные для внутривенного введения с длительным временем циркуляции в кровотоке.

Одним из перспективных направлений использования магнитных наночастиц является визуализация клеток с помощью магнитно-резонансной томографии в живых организмах. Для этого полученные химическим путем магнитные наночастицы добавляют к клеткам до их введения в организм, однако в процессе жизнедеятельности клетки могут выбрасывать наночастицы путем экзоцитоза, а также концентрация метки неизбежно снижается с каждым актом деления клетки. Более привлекательной стратегией является использование генетически кодируемых конструкций, способных к синтезу биогенных магнитных наночастиц внутри клетки. Одной из таких конструкций является белок ферритин, выполняющий функцию депо железа в организме млекопитающих и способный депонировать до 3000 атомов железа. Однако получаемые наночастицы обладают аморфной структурой и обладают слабыми магнитными свойствами, что ограничивает их дальнейшее применение.

Для решения поставленной задачи нами было предложено использовать бактериальные белки инкапсулины, представляющие собой полые сферы размером до 40 нм, способные к депонированию до 30000 атомов железа внутри. С помощью лентивирусной трансдукции была получена клеточная линия мезенхимальных стволовых клеток человека стабильно экспрессирующая гены бактериального белка инкапсулина, фермента ферроксидазы и белка-переносчика железа. Методом просвечивающей электронной микроскопии был показано наличие наночастиц оксида железа в стволовых клетках, а также продемонстрирована принципиальная возможность обнаружения генетически модифицированных стволовых клеток методом МРТ после их введения в организм.

*Работы поддержаны грантом РФ №19-45-06302.*

**GENETICALLY ENCODED MAGNETIC NANOPARTICLES FOR NON-INVASIVE STEM CELL IMAGING**

Abakumov M.A.<sup>1,\*</sup>, Gabashvili A.N.<sup>1</sup>, Efremova M.V.<sup>1,2</sup>, Semkina A.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Helmholtz Centrum Munich, Munich, Germany

\*E-mail: abakumov1988@gmail.com

Magnetic nanomaterials based on iron oxide nanoparticles find more and more applications in various fields of biomedicine, in particular, they can act as T2 contrast agents for MRI. Magnetic iron oxide nanoparticles have low toxicity, and their modification with certain coatings makes it possible to obtain stable aqueous colloidal solutions suitable for intravenous administration with a long circulation time in the bloodstream.

One of the promising areas for the use of magnetic nanoparticles is the visualization of cells using magnetic resonance imaging in living organisms. To do this, chemically obtained magnetic nanoparticles are added to cells before they are introduced into the body, however, cells can release nanoparticles by exocytosis, and the concentration of the label inevitably decreases with each act of cell division. A more attractive strategy is the use of genetically encoded constructs capable of synthesizing biogenic magnetic nanoparticles inside the cell. One of these constructs is the ferritin protein, which functions as an iron depot in the body of mammals and is capable of depositing up to 3000 iron atoms. However, the resulting nanoparticles have an amorphous structure and weak magnetic properties, which limits their further application.

To solve this problem, we proposed to use bacterial encapsulin proteins, which are hollow spheres up to 40 nm in size, capable of depositing up to 30,000 iron atoms inside. Using lentiviral transduction, a cell line of human mesenchymal stem cells that stably expresses the genes of the bacterial protein encapsulin, the ferroxidase enzyme, and the iron carrier protein was obtained. Transmission electron microscopy showed the presence of iron oxide nanoparticles in stem cells, whereas MRI demonstrated the fundamental possibility of detecting genetically modified stem cells by after their introduction into the body.

*The work was supported by the RSF grant No. 19-45-06302.*

## **ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИИ ШИПИКОВОГО АППАРАТА НЕЙРОНА ПРИ ВЫРАБОТКЕ ГЕТЕРОСИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ**

Абонакур А., Смирнова Г.Р., Иджилова О.С.\*, Малышев А.Ю.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва,  
Россия

\*E-mail: [olgaidzh@ihna.ru](mailto:olgaidzh@ihna.ru)

Синаптическая пластичность считается основным клеточным механизмом обучения и памяти. Гетеросинаптическая пластичность — это подтип пластичности, при котором изменяется сила синаптической связи между теми нейронами, которые не были активны во время индукции пластичности. Он вносит вклад во множество нервных процессов, но является гораздо менее изученным явлением, чем гомосинаптическая пластичность. Настоящее исследование направлено на изучение морфологического субстрата этого вида пластичности.

Мы выдвинули гипотезу, что гетеросинаптическая потенция, вызванная внутриклеточной тетанизацией нейрона пачками потенциалов действия, вызывает локальную трансляцию немедленного раннего гена *ARC* и депрессию окружающих шипиков. Для проверки этой гипотезы мы провели серию экспериментов с изучением морфологических изменений флуоресцентно меченных шипиков после тетанизации нейронов. Для визуализации шипиков мы создали генетическую конструкцию, представляющую собой фьюжн красного флуоресцентного белка *tdTomato* с белком постсинаптического уплотнения  *Homer*. В экспериментах с культивируемыми нейронами было показано, что внутриклеточная тетанизация приводит к массивным перестройкам шипикового аппарата клетки, при которых часть шипиков увеличивается, а часть уменьшается. При этом прослеживается закономерность, заключающаяся в том, что увеличившиеся шипики, как правило, соседствуют с уменьшившимися, что свидетельствует в пользу выдвинутой нами гипотезы.

С целью дальнейшего улучшения методики визуализации шипиков мы создаем генетические конструкции с модифицированными флуоресцентными белками, которые обладают повышенной способностью встраиваться в мембрану. Для этого к C-концу флуоресцентного белка добавляется мотив из 20 аминокислот белка *c-Na-Ras* для посттрансляционного фарнезилирования. Было показано, что в нейронах, экспрессирующих фарнезилированный GFP, возможно провести съемку морфологии шипикового аппарата клетки с существенно большей детализацией, нежели это обычно удается с использованием нетаргетированного GFP.

Для снижения травматичности тетанизации при использовании метода петч-клямп в настоящее время мы разработали метод оптогенетической тетанизации нейрона. Для этого мы применили недавно описанный канальный родопсин, выделенный из водоросли *Platymonas subcordiformis* (*PsChR2*). Был отработан протокол оптогенетической стимуляции, позволяющий надежно индуцировать в нейронах, экспрессирующих *PsChR2*, пачки потенциалов действия с частотой 50–70 Гц.



**HETEROSYNAPTIC PLASTICITY-RELATED CHANGES IN THE MORPHOLOGY OF THE NEURONAL SPINE APPARATUS**

Abonakour A., Smirnova G.R., Idzhilova O.S.\*, Malyshev A.Y.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia

\*E-mail: [olgaidzh@ihna.ru](mailto:olgaidzh@ihna.ru)

Synaptic plasticity is considered to be the main cellular mechanism of learning and memory. Heterosynaptic plasticity is a subtype of plasticity in which synaptic strengths change between those neurons that were not active during the plasticity induction. It contributes to a variety of neural processes but is a much less studied phenomenon than homosynaptic plasticity. This research aims to study the morphological substrate of this type of plasticity.

We hypothesized that heterosynaptic potentiation induced by intracellular tetanization of a neuron by bursts of action potentials can initiate local translation of the immediate early *ARC* gene and provoke depression of surrounding spines. To test this hypothesis, we conducted a series of experiments to study the morphological changes in fluorescently labeled spines after neuronal tetanization.

To visualize the dendritic spines, we created a genetic construct that is a fusion of the red fluorescent protein tdTomato with the Homer postsynaptic scaffolding protein. In experiments with cultured neurons, it was shown that intracellular tetanization leads to massive rearrangements of the dendritic spine apparatus of the cell, in which some of the spines increase and some decrease. In addition, our data in general indicated that the enlarged spines, lie adjacent to the decreased ones, which is a pattern that supports our proposed hypothesis.

For a better visualization of the dendritic spines, we have designed genetic constructs with modified fluorescent proteins that have an increased ability to integrate into the membrane. For this, a motif of 20 amino acids of the c-Ha-Ras protein is added to the C-terminus of the fluorescent proteins for post-translational farnesylation. It has been demonstrated that in neurons expressing farnesylated GFP, it is possible to capture the morphology of the spiny apparatus of the cell with much greater details than is usually possible using untargeted GFP.

To reduce the cellular damage of tetanization when using the patch-clamp technique, we have developed a method for optogenetic tetanization of the neuron. For this, we use the recently characterized channelrhodopsin isolated from the alga *Platymonas subcordiformis* (PsChR2). A protocol of optogenetic stimulation was designed, which makes it possible to reliably induce bursts of action potentials with a frequency of 50–70 Hz in neurons expressing PsChR2.

## ВЛИЯНИЕ ФОТОСТИМУЛЯЦИИ СВЕТОУПРАВЛЯЕМОЙ НАТРИЕВОЙ ПМПЫ KR2 НА АКТИВНОСТЬ ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШИ

Амахин Д.В.\*, Трофимова А.М., Зайцев А.В.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: dmitry.amakhin@gmail.com

Одним из перспективных оптогенетических инструментов управления активностью нейронов является светуправляемая натриевая помпа KR2, которая под действием фотостимуляции выкачивает ионы натрия из клетки. В данной работе анализировалась возможность применения KR2-фотостимуляции для воздействия на эпилептоподобную активность в срезах энторинальной коры головного мозга мыши.

Работа была выполнена на мышах линии C57BL/6j (Рапполово, Россия), которым в возрасте 4–5 мес. вводили аденоассоциированный вектор AAV-PHP.eB-hSyn-KR2-YFP (МФТИ, Россия), с генами KR2 и маркерного белка YFP. Векторный конструктор экспрессировался в области латеральной энторинальной коры (ЛЭК). Через 4–5 недель изготавливались переживающие срезы мозга (300 мкм). Оптогенетическая стимуляция KR2-содержащих нейронов осуществлялась светом с длиной волны 530 нм. Исследования проводились с использованием метода патч-кламп в конфигурации целая клетка. Эпилептиформная активность в срезе вызывалась путем добавления в перфузирующий раствор 4-аминопиридина и снижения в нем концентрации ионов магния.

Фотостимуляция KR2 приводила к возникновению выходящих трансмембранных ионных токов, вызывающих гиперполяризацию мембраны пирамидных нейронов энторинальной коры. Показано, что в ответ на остановку светостимуляции KR2 происходит активация HCN-каналов, провоцирующая синаптическую активность в нейронной сети. В экспериментах с использованием *in vitro* модели эпилептиформной активности было показано, что продолжительная светостимуляция KR2 не способствовала остановке генерации эпилептиформных разрядов в коре. В то же время, прерывистая светостимуляция приводила к полному исчезновению продолжительной иктальной активности в энторинальной коре и замещению ее на режим генерации коротких разрядов, вызываемых кратковременной активацией HCN-каналов при выключении стимула. С помощью математического моделирования, основанного на полученных экспериментальных данных, было продемонстрировано, что потенциальные антиэпилептические эффекты светостимуляции KR2 определяются как гиперполяризующим током помпы, так и снижением концентрации внеклеточного калия, тогда как проэпилептические эффекты связаны с уменьшением внутриклеточной концентрации ионов натрия и ингибированию натрий-калиевой помпы.

Таким образом, фотостимуляция светуправляемой натриевой помпы KR2 является перспективным подходом для управления эпилептиформной активностью.

*Работа поддержана грантом РФФ № 21-15-00416.*

**EFFECTS OF PHOTOSTIMULATION OF THE LIGHT-DRIVEN SODIUM PUMP KR2 ON THE ACTIVITY OF PYRAMIDAL NEURONS IN THE MOUSE CEREBRAL CORTEX**

Amakhin D.V.\*, Trofimova A.M., Zaitsev A.V.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg, Russia

\*E-mail: dmitry.amakhin@gmail.com

One of the most promising optogenetic tools for controlling neuronal activity is the light-driven sodium pump KR2, which pumps sodium ions out of the cell. This study investigated the possibility of using KR2 photostimulation to control epileptiform activity in mouse entorhinal cortex slices.

The work was performed in C57BL/6j mice (Rappolovo, Russia) injected at 4–5 months of age with the adeno-associated vector AAV-PHP.eB-hSyn-KR2-YFP (MIPT, Russia) containing KR2 and YFP marker protein genes. The vector construct was expressed in the lateral entorhinal cortex (LEC). After 4–5 weeks, acute brain slices (300  $\mu\text{m}$ ) were prepared. Optogenetic stimulation of KR2-containing neurons was performed using light with a wavelength of 530 nm. Studies were performed using the patch-clamp method in a whole-cell configuration. Epileptiform activity in the slice was induced by adding 4-aminopyridine to the perfusion solution and reducing the concentration of magnesium ions.

Photostimulation of KR2 resulted in outward transmembrane ion currents that induced hyperpolarisation of the membrane of entorhinal cortex pyramidal neurons. It was shown that activation of HCN channels in response to cessation of KR2 light stimulation triggers rebound synaptic activity in the neuronal network. Using an *in vitro* model of epileptiform activity, we showed that prolonged light stimulation of KR2 did not prevent the generation of epileptiform discharges in the cortex. At the same time, intermittent light stimulation led to the complete disappearance of prolonged ictal activity in the entorhinal cortex and its replacement by the short discharges induced by short-term rebound activation of HCN channels. Using mathematical modelling based on the experimental data, it was shown that the potential antiepileptic effects of KR2 stimulation are mediated by both a hyperpolarising pump current and a decrease in extracellular potassium concentration, whereas the proepileptic effects are associated with a decrease in intracellular sodium ion concentration and consequent inhibition of sodium-potassium ATPase activity.

Therefore, photostimulation of the light-driven sodium pump KR2 is a promising approach to control epileptiform activity.

*Supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 21-15-00416).*

## НОВЫЕ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ pH СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ

Багаева Д.Ф.<sup>1,\*</sup>, Носов Г.А.<sup>2,3</sup>, Власова А.Д.<sup>1</sup>, Бухалович С.М.<sup>1</sup>, Ильинский Н.С.<sup>1</sup>, Горделий В.И.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

<sup>3</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

<sup>4</sup> Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Université Grenoble Alpes–Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives–CNRS, Grenoble, France  
*\*E-mail: багаева\_dina@mail.ru*

Оптогенетика является высокоэффективным и точным инструментом для изучения функций головного мозга (Roy D.S., et al., 2016). До недавнего времени оптогенетика в основном была сосредоточена на световом контроле функций мозга посредством экспрессии родопсинов на поверхности плазматической мембраны нейронов. Значительно меньше исследований направлено на оптогенетический контроль клеточных органелл.

В настоящее время существует новая стратегия, основанная на направленной экспрессии управляемой светом протонной помпы Arch3 в синаптических везикулах (Rost B.R., et al., 2016). Данный инструмент может функционально заменить эндогенные протонные насосы, обеспечивая оптогенетический контроль закисления синаптических везикул и накопление нейромедиаторов. Тем не менее, данный оптогенетический инструмент не позволяет контролировать pH синаптических везикул в сторону защелачивания.

В данной работе представлены результаты нового оптогенетического подхода для индуцированного светом защелачивания синаптических везикул. Новый подход разработан на недавно открытых внутренних протонных насосах, в частности, *NsXeR* (Shevchenko V., et al., 2017). В этой работе с помощью флуоресцентной микроскопии мы оценили доставку белка в синаптические везикулы, а также показали эффект оптогенетического защелачивания везикул. Также мы охарактеризовали эффекты, опосредованные протонной помпы *NsXeR* методом локальной фиксации потенциала. Результаты данного исследования могут быть полезны в исследованиях pH-зависимых дисфункций синаптических везикул и их влияния на передачу синаптического сигнала. Также этот инструмент выглядит перспективным в свете направленного оптогенетического отключения функций отдельных нейронов и синапсов.

**NEW OPTOGENETIC SYSTEMS FOR pH CONTROL OF SYNAPTIC VESICLES**

Bagaeva D.F.<sup>1</sup>, Nosov G.A.<sup>2,3</sup>, Vlasova A.D.<sup>1</sup>, Bukhalovich S.M.<sup>1</sup>, Ilyinsky N.S.<sup>1</sup>,  
Gordely V.I.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),  
Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Institution "Federal Center for Brain and Neurotechnologies"  
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov of the  
Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Université Grenoble Alpes–  
Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives–CNRS, Grenoble, France  
*\*E-mail: bagaeva\_dina@mail.ru*

Optogenetics is a highly efficient and accurate tool for studying brain functions (Roy D.S., et al., 2016). Until recently, optogenetics has mainly focused on light control of brain functions through the expression of rhodopsins on the plasma membrane surface of neurons. Significantly less research is directed at the optogenetic control of cell organelles.

Currently, there is a new strategy based on targeted expression of the light-driven proton pump Arch3 in synaptic vesicles (Rost B.R., et al., 2016). This tool can functionally replace endogenous proton pumps, providing optogenetic control of synaptic vesicle acidification and neurotransmitter accumulation. However, this optogenetic tool does not allow one to control the pH of synaptic vesicles towards alkalization.

This study presents the results of a new optogenetic approach for light-induced alkalization of synaptic vesicles. A new approach has been developed on recently discovered internal proton pumps, in particular, NsXeR (Shevchenko V., et al., 2017). In this work, we assessed protein delivery to synaptic vesicles and also showed the effect of optogenetic alkalization of vesicles using fluorescence microscopy. We also characterized the NsXeR proton pump-mediated effects by local potential clamping. The results of this study may be useful in the study of pH-dependent dysfunctions of synaptic vesicles and their impact on synaptic signal transmission. Also, this tool looks promising in the light of directed optogenetic shutdown of the functions of individual neurons and synapses.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННОГО ОКСИДА АЗОТА (NO) НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ НЕЙРОНОВ В ПОЛЕ CA1 ГИППОКАМПА МЫШИ

Байнаев-Мангилов Н.П.<sup>1</sup>, Вечкапова С.О.<sup>2</sup>, Карогодина Т.Ю.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр информационных и вычислительных технологий, Новосибирск, Россия

\*E-mail: [n.bainaev@g.nsu.ru](mailto:n.bainaev@g.nsu.ru)

Оксид азота (NO) – уникальный биохимический медиатор, участвующий в регуляции огромного количества жизненных процессов. В частности, NO является важным нейромедиатором и участвует в нескольких типах синаптической пластичности. Недостаток оксида азота может привести к развитию патологий нервной системы. Одним из многообещающих методов лечения подобных заболеваний может стать использование фотоактивных препаратов, способных высвободить оксид азота локально под воздействием света (Панфилов М. А. с соавт., 2022). Поэтому исследование влияния экзогенного оксида азота на нейроны является важным шагом к созданию таких лекарственных средств.

В этой работе мы исследовали влияние экзогенного NO на синаптическую пластичность нейронов в поле CA1 гиппокампа мыши. В качестве донора оксида азота используется разработанное в нашей лаборатории фотоактивируемое соединение N-нитрозо-производное BODIPY, поглощающее свет в области 520 нм. В качестве источника облучения используется светодиод мощности 1 Вт, имеющий длину волны излучения 520 нм, установленный над системой детектирования электрической активности срезов.

Эксперименты проводили на срезах гиппокампа двухмесячных самцов мышей линии ICR. Стимуляцию пирамидных нейронов поля CA1 и регистрацию вызванных потенциалов действия (ПД) производили с помощью стеклянных внеклеточных микроэлектродов, заполненных солевым раствором. Длительность стимулирующего импульса составляла 5 мс. Также нами был исследован процесс распада фотодонора в водном растворе под воздействием света. С использованием флуоресцентной метки DAR-2 в процессе фотораспада зарегистрировано образование оксида азота и оценен выход фотораспада. Для изучения влияния экзогенного NO на параметры ПД (амплитуда, длительность) проведены эксперименты с добавлением донора к срезам и облучением срезов светом. Также, приведены результаты серии экспериментов на срезах при разных концентрациях NO фотодонора для установления зависимости параметров ПД от концентрации.

**STUDY OF THE EFFECT OF EXOGENOUS NITRIC OXIDE (NO) ON THE SYNAPTIC PLASTICITY OF NEURONS IN THE CA1 FIELD OF THE MOUSE HIPPOCAMPUS**

Bainaev-Mangilev N.P.<sup>1</sup>, Vechkapova S.O.<sup>2</sup>, Karogodina T.Yu.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Federal research center for information and computational technologies, Novosibirsk, Russia

\*E-mail: [n.bainaev@g.nsu.ru](mailto:n.bainaev@g.nsu.ru)

Nitric oxide (NO) is a unique biochemical mediator involved in the regulation of a huge number of life processes. In particular, NO is an important neurotransmitter and is involved in several types of neuroplasticity. A lack of nitric oxide can lead to the development of pathologies of the nervous system. One of the promising treatments for such diseases may be the use of photoactive drugs that can release nitric oxide directly in the desired area when exposed to light (Panfilov M. A. et al., 2022). Therefore, the study of the effect of exogenous nitric oxide on neurons is an important step towards the creation of such drugs.

In this work, we plan to investigate the effect of exogenous NO on the synaptic plasticity of neurons in the CA1 field of the mouse hippocampus. The photoactivated compound N-nitroso derivative BODIPY developed in our laboratory, which absorbs light in the region of 520 nm, is used as a nitric oxide donor. As an irradiation source, a 1 W LED with a radiation wavelength of 520 nm is used, which is installed above the system for detecting the electrical activity of sections.

Experiments were performed on sections of the hippocampus of two-month-old male ICR mice. Stimulation of field CA1 pyramidal neurons and recording of evoked action potentials (APs) was performed using glass extracellular microelectrodes filled with saline. The duration of the stimulating pulse was 5 ms. We also studied the process of decay of a photodonor in an aqueous solution under the influence of light. Using the DAR-2 fluorescent label, the formation of nitric oxide in the process of photodecomposition was registered and the yield of photodecomposition was estimated. To study the effect of exogenous NO on the AP parameters (amplitude, duration), experiments were carried out with the addition of a donor to the sections and irradiation of the sections with light. Also, the results of a series of experiments on sections at different NO concentrations of the photodonor are presented to establish the dependence of the AP parameters on the concentration.

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ КЛАССИФИКАЦИИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МИКРОБНЫХ РОДОПСИНОВ**

Богданова Е.А.\*, Шайтан К.В., Новоселецкий В.Н.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*E-mail: elizaweas@gmail.com

Микробные родопсины – надсемейство фотоактивных ретиналь-связывающих мембранных белков, широко распространенных в микробном мире и среди низших эукариот. Представители этого надсемейства обладают общим семиспиральным строением, но демонстрируют высокое разнообразие функций: так они могут играть роль ионных насосов и управляемых светом ионных каналов, ферментов и фотосенсоров.

В банках данных белковых последовательностей содержится большое число в разной степени аннотированных последовательностей семиспиральных белков, включая и микробные родопсины. Как правило, автоматическое аннотирование новой последовательности включает в себя выявление так называемых сигнатур (например, 7 трансмембранных спиралей) и не является достаточно подробным. Альтернативным является аннотирование, опирающееся на сравнение новой последовательности с последовательностями белков, чья структура и функции уже изучены экспериментально. Однако такой подход не позволяет аннотировать значительную часть последовательностей, полученных в результате различных геномных и метагеномных проектов. В настоящей работе мы представляем метод классификации последовательностей микробных родопсинов, основанный на использовании рекуррентной нейросети. Обучение метода стало возможным благодаря использованию большого набора псевдопоследовательностей, полученных по специальному алгоритму и отражающих свойства природных последовательностей. Так, опираясь на три сотни известных последовательностей, относящихся к 14 семействам, мы получили более 10 тысяч псевдопоследовательностей, что позволило добиться 100% точности при классификации природных последовательностей тестового набора. Ещё одним гипотетическим способом применения предлагаемых нами псевдопоследовательностей является дизайн белков, не встречающихся в природе, но обладающих интересными спектральными свойствами, которые так же могут быть оценены методами машинного обучения.



## **MICROBIAL RHODOPSIN SEQUENCE CLASSIFICATIONS USING MACHINE LEARNING**

Bogdanova E.A.\*, Shaitan K.V., Novoseletsky V.N.  
Moscow State University, Moscow, Russia  
*\*E-mail: elizawe8@gmail.com*

Microbial rhodopsins are a superfamily of photoactive retinal-binding proteins widespread throughout the microbial and lower eucaryotes world. Members of this superfamily have a seven-helix structure and show a high diversity of functions. Thus, they can be ion pumps and light-driven ion channels, enzymes, and photosensors.

Protein sequence databanks contain many annotated sequences of seven-stranded proteins, including microbial rhodopsins, to varying degrees. Typically, automatic annotation of a new sequence involves the identification of so-called signatures (e.g., 7 transmembrane helices) and is not sufficiently detailed. An annotation based on comparison of the new sequence with protein sequences whose structure and functions have already been studied experimentally is an alternative. However, this approach does not allow one to annotate a significant part of the sequences obtained as a result of various genomic and metagenomic projects.

In this work, we present a method for classifying microbial rhodopsin sequences based on the use of a recurrent neural network. The training of the method became possible due to the use of a large set of pseudosequences obtained by a special algorithm and reflecting the properties of natural sequences. Thus, based on three hundred known sequences belonging to 14 families, we obtained more than 10 thousand pseudosequences, which made it possible to achieve 100% accuracy in classifying the natural sequences of the test set. Another hypothetical way to apply the proposed pseudosequences is the design of proteins that are not found in nature but have interesting spectral properties that can also be evaluated by machine learning methods.

## **РАЗРАБОТКА ОПТО- И ХЕМОГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИЙ АСТРОЦИТОВ В ДОЛГОВРЕМЕННЫХ ПЛАСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ**

Бородинова А.А.\*, Балабан П.М.

Институт Высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва,  
Россия

\*E-mail: borodinova.msu@mail.ru

До недавнего времени роль астроглии в регуляции долговременной синаптической пластичности и памяти была недооценена. Согласно современным представлениям, астроциты являются активным и неотъемлемым участником долговременных пластических процессов в мозге (обучение, память), а также вовлечены в развитие некоторых нейропатологий. Показано, что астроциты могут обмениваться «информацией» с пресинаптическими и постсинаптическими окончаниями нейронов, реагируя на сигналы нейронов активацией собственных сигнальных каскадов и выделяя специфические наборы сигнальных молекул (глиотрансмиттеров), способных изменить работу нейронов. Разбалансировка механизмов коммуникации астроцитов и нейронов может сопровождаться нарушением долговременной синаптической пластичности и памяти, а также может служить одной из причин развития нейропатологий. Все это делает астроциты перспективной мишенью для разработки способов управления работой нейронных сетей в норме и патологии.

При исследовании пластических процессов в мозге на сегодняшний день активно используют аденоассоциированные вирусные векторы (AAV), позволяющие добиться избирательной экспрессии различных генетически-кодируемых белков в желаемых популяциях клеток (нейроны, астроциты) заданных регионов мозга. Существующие на сегодняшний день варианты AAV вирусов существенно различаются по способности связываться с теми или иными рецепторами на поверхности клеток, что в конечном итоге определяет повышенный тропизм вируса к тем или иным клеточным популяциям и, соответственно, доставку генетического материала внутрь клетки. Не менее важным фактором является то, насколько специфичный промотор будет «защит» в конструкторе для контроля экспрессии генетически-кодируемых белков в желаемых популяциях клеток. Будут проанализированы принципы выбора оптимальных параметров для избирательной экспрессии генетических конструкторов в популяциях астроцитов.

Селективная экспрессия природных и синтетических генетически кодируемых белков (светочувствительные белки, хеморецепторы) в популяциях астроцитов позволяет использовать оптогенетические и хемогенетические подходы для управления сигнальными путями в астроцитах и, таким образом, исследовать их роль в регуляции пластических процессов в мозге в норме и патологии. В качестве примеров будут рассмотрены частные случаи использования ионотропных и метаботропных GPCR светочувствительных рецепторов (оптогенетика), синтетических хеморецепторов (хемогенетика) при исследовании механизмов долговременной пластичности и памяти у грызунов.

**DEVELOPMENT OF OPTO- AND CHEMOGENETIC CONSTRUCTS FOR THE STUDY OF ASTROCYTE FUNCTIONS IN LONG-TERM PLASTIC PROCESSES**

Borodina A.A.\*, Balaban P.M.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia

\*E-mail: borodina.msu@mail.ru

Until recently, the role of astroglia in the regulation of long-term synaptic plasticity and memory was underestimated. According to modern concepts, astrocytes are an active and integral participant in long-term plastic processes in the brain (learning, memory), and are also involved in the development of some neuropathologies. It was shown that astrocytes can exchange "information" with the presynaptic and postsynaptic endings of neurons, reacting to neuronal signals by activating their own signaling cascades and releasing specific sets of signaling molecules (gliotransmitters) that can change the functioning of neurons. The imbalance of the communication mechanisms of astrocytes and neurons may be accompanied by an impairment of long-term synaptic plasticity and memory, and may also serve as one of the reasons for the development of neuropathologies. All this makes astrocytes a promising target for developing ways to control the work of neural networks in norm and pathology.

To date, adeno-associated viral vectors (AAV) are actively used in the study of plastic processes in the brain, which make it possible to achieve selective expression of various genetically encoded proteins in the desired cell populations (neurons, astrocytes) of given brain regions. The currently existing variants of AAV viruses differ significantly in their ability to bind to certain receptors on the cell surface, which ultimately determines the increased tropism of the virus to certain cell populations and, accordingly, the delivery of genetic material inside the cell. An equally important factor is at what extent a specific promoter "incorporated" into the construct controls the expression of genetically encoded proteins in the desired cell populations. The principles of choosing optimal parameters for the selective expression of genetic constructs in astrocyte populations will be analyzed.

Selective expression of natural and synthetic genetically encoded proteins (photosensitive proteins, chemoreceptors) in astrocyte populations makes it possible to use optogenetic and chemogenetic approaches to control signaling pathways in astrocytes and, thus, to investigate their role in the regulation of plastic processes in the brain in norm and pathology. As examples, special cases of using the ionotropic and metabotropic GPCR light-sensitive receptors (optogenetics), synthetic chemoreceptors (chemogenetics) in the study of mechanisms of long-term plasticity and memory in rodents will be considered.

**ИССЛЕДОВАНИЕ РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК *IN VIVO* С  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАМАНОВСКОЙ МИКРОСПЕКТРОСКОПИИ И  
ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИНСТРУМЕНТОВ**

Браже Н.А.<sup>1,\*</sup>, Морозова К.С.<sup>1</sup>, Тяглик А.Б.<sup>1,2</sup>, Федотова А.А.<sup>1,2</sup>,  
Шестопалова М.С.<sup>2</sup>, Залыгин А.В.<sup>2</sup>, Олейников В.А.<sup>2</sup>, Билан Д.С.<sup>2</sup>,  
Семьянов А.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биорганической химии РАН, Москва, Россия

\*E-mail: nadiya.brazhe@gmail.com

Редокс-состояние клеток тесно связано с активностью дыхательной цепи (электронтранспортной цепи, ЭТЦ) митохондрий. Регуляция работы дыхательной цепи митохондрий важна для обеспечения клеток АТФ, а также для оптимизации количества супероксид-анион радикала, образующегося в ЭТЦ. Генерация  $O_2^-$  с последующим образованием других активных форм кислорода (АФК) может использоваться в сигнальных процессах или приводить к развитию окислительного стресса. Для понимания процессов регуляции активности ЭТЦ и их взаимосвязи с образованием АФК необходимы подходы, позволяющие *in vivo* оценить редокс-состояние ЭТЦ митохондрий и детектировать генерацию АФК.

Мы разработали подход, основанный на спектроскопии рамановского рассеяния с использованием генетически кодируемого биосенсора для мониторинга редокс-состояния ЭТЦ митохондрий и детекции образования  $H_2O_2$  в нейронах и астроцитах коры мозга мышей *in vivo*. Нейроны и астроциты идентифицировали по флуоресценции экспрессирующихся белков NirFP и GFP, соответственно, или по флуоресценции биосенсора NuPer7, изменение интенсивности флуоресценции которого использовали для мониторинга количества  $H_2O_2$ , образующейся в матриксе митохондрий. По пикам в рамановских спектрах определяли относительное содержание восстановленных цитохромов В и С-типов в ЭТЦ митохондрий и, таким образом, оценивали степень заполненности ЭТЦ электронами и устанавливали взаимосвязь между работой ЭТЦ и образованием  $H_2O_2$  в матриксе митохондрий. Было установлено, что при движении мыши ЭТЦ митохондрий астроцитов заполняется электронами, что сопровождается генерацией  $H_2O_2$ . В нейронах, напротив, снижалось относительное содержание восстановленных переносчиков электронов и не изменялась продукция  $H_2O_2$ . Мы предполагаем, что  $H_2O_2$ , образующаяся в астроцитах, необходима для сигнальных процессов между астроцитами и другими компонентами активной среды мозга. Предложенный подход может быть успешно использован для исследования редокс-процессов, протекающих в мозге, а также в других органах при различных патологиях, в частности, при развитии процессов воспаления.

*Работа выполнена при поддержке РФФ 23-44-00015.*

**MONITORING OF THE MITOCHONDRIA REDOX STATE OF CELLS *IN VIVO* BY MEANS OF RAMAN MICROSCOPY AND GENETICALLY ENCODED TOOLS**

Brazhe N.A.<sup>1,\*</sup>, Morozova K.I.<sup>1</sup>, Tiaglik A.B.<sup>1,2</sup>, Fedotova A.A.<sup>1,2</sup>, Shestopalova M.S.<sup>2</sup>, Zalygin A.V.<sup>2</sup>, Oleinikov V.A.<sup>2</sup>, Bilan D.S.<sup>2</sup>, Semyanov A.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*E-mail: [nadiya.brazhe@gmail.com](mailto:nadiya.brazhe@gmail.com)

The redox state of cells is closely related to the activity of the respiratory chain (electron transport chain, ETC) of mitochondria. Regulation of the mitochondrial respiratory chain is important for providing cells with ATP, as well as for optimizing the amount of superoxide-anion radical formed in the ETC. The generation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> followed by the formation of other reactive oxygen species (ROS) can be used in signaling processes or can lead to the development of oxidative stress. To understand the processes of regulation of ETC activity and its relation with the formation of ROS, novel approaches are needed for the *in vivo* assessment of the redox state of mitochondrial ETC and for the detection of ROS generation.

We have developed an approach based on Raman spectroscopy with a genetically encoded biosensor to monitor the redox state of mitochondria ETC and to detect hydrogen peroxide production in identified neurons and astrocytes in the mouse cerebral cortex *in vivo*. Neurons and astrocytes were identified by the fluorescence of the expressed NirFP and GFP proteins, respectively, or by the fluorescence of the HyPer7 biosensor. The change in the fluorescence intensity of HyPer7 was used to monitor the amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formed in the mitochondrial matrix. The peaks in the Raman spectra were used to determine the relative amount of reduced cytochromes of B and C types in the ETC of mitochondria and, thus, the degree of ETC loading with electrons. This approach allowed us to reveal the relationship between the ETC activity and the generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the mitochondrial matrix. It was found that under the mouse locomotion, the ETC of astrocyte mitochondria is overloaded with electrons, which is accompanied by the generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In neurons, on the contrary, the relative amount of reduced electron carriers decreases and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production does not change. We assume that astrocytic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is necessary for signaling processes between astrocytes and other components of the active brain milieu. The proposed approach can be successfully used to study redox processes in the brain, as well as in other organs in various pathologies, and in particular, under the development of inflammation processes.

*Supported by RSF (grant number 23-44-00015).*

## ИЗМЕНЕНИЯ АСТРОЦИТАРНОЙ КАЛЬЦИЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ ЛОКОМОЦИИ

Браже А.Р.<sup>1,2,\*</sup>, Федотова А.А.<sup>1,2</sup>, Семьянов А.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> ИБХ РАН, Москва, Россия

\*E-mail: [brazhe@biophys.msu.ru](mailto:brazhe@biophys.msu.ru)

Астроциты — ключевой элемент центральной нервной системы, вовлеченный в регуляцию синаптической передачи между нейронами, нейроваскулярное сопряжение и функциональные изменения в коре под действием нейромодуляторов. Известно, что локомоторная активность животных сопровождается норадренергической сигнализацией в различных отделах мозга, приводя к активации адренергических рецепторов на нейронах и астроцитах. Мы экспрессировали в соматосенсорной коре мышей генетически кодируемый кальциевый индикатор GCaMP6f под астроцитарным промотором и наблюдали активность астроцитов бодрствующих животных, размещенных на подвижной платформе. В состоянии покоя наблюдались разреженные, нескоординированные отдельные спонтанные кальциевые вспышки. Периоды локомоторной активности сопровождались глобальным повышением уровня кальциевого сигнала. На уровне отдельных астроцитарных доменов наблюдался стереотипный паттерн активации от периферии домена к соме. На уровне популяционной активности после начала движения инициировались множественные отдельные области с повышенным уровнем флуоресценции, которые затем сливались в единый глобальный ответ, продолжающийся и после завершения периода локомоции. Применение методов понижения размерности показало, что во время ответов на локомоцию кальциевая активность астроцитов синхронизируется и может быть описана несколькими пространственно-временными модами, формирующими динамическую систему.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-14-00033.*

**LOCOMOTION-DEPENDENT CHANGES IN ASTROCYTIC CALCIUM ACTIVITY**

Brazhe A.<sup>1,2,\*</sup>, Fedotova A.<sup>1,2</sup>, Semyanov A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, faculty of Biology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Bioorganic Chemistry RAS, department of Molecular Neurobiology,  
Moscow, Russia

\*E-mail: [brazhe@biophys.msu.ru](mailto:brazhe@biophys.msu.ru)

Astrocytes are a key component of the central nervous system, with implicated roles ranging from orchestrating synaptic transmission to shaping neural tissue response to neuromodulators or neurovascular coupling. It's well known that animal locomotion is accompanied by noradrenaline signaling broadcasted from *locus coeruleus* to many brain regions, activating adrenergic receptors on neurons and astrocytes. We expressed genetically encoded calcium sensor GCaMP6f in mouse somatosensory cortex under astrocyte-specific promoter and imaged astrocytic calcium signaling in awake animals on a moving platform. In quiescence, a sparse irregular spontaneous activity was observed. Bouts of locomotion were accompanied by a large-scale increase in calcium signal. At the single domain level, a stereotyped activation pattern from domain periphery to the soma was observed. At the population level the onset of locomotion was followed by initiation of multiple dispersed loci with high fluorescence level, which expanded and merged to form the global response, which could last well after the cessation of animal movement. Dimensionality reduction methods revealed that astrocytic calcium activity in response to locomotion can be explained by a few spatiotemporal modes, making up a dynamical system.

*Supported by RSF grant 22-14-00033.*

## ОПТОСЕНСОРНЫЙ АНАЛИЗ ГОМЕОСТАЗА ХЛОРА И ВОДОРОДА В СРЕЗАХ МОЗГА ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ

Брежестовский П.Д.<sup>1,2,\*</sup>, Петухова Е.О.<sup>1,3</sup>, Пономарева Д.Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт нейронаук, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

<sup>3</sup> Институт системных нейронаук, Университет Экс-Марсель, Марсель, Франция

<sup>2</sup> Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

\*E-mail: [pbreges@gmail.com](mailto:pbreges@gmail.com)

Оптосенсорика - направление исследований, обеспечивающее возможность неинвазивного мониторинга концентрации внутриклеточных ионов, активности ферментов, липидов и других клеточных компонентов с использованием специальных оптических сенсоров. В последние годы созданы различные типы генетически кодируемых сенсоров, изменяющих флуоресценцию при взаимодействии с определенными ионами или молекулами. Их использование обеспечило возможность неинвазивного мониторинга многих внутриклеточных процессов, включая изменение цАМФ, глюкозы, глутамата, лактата, различных ионов, а также нейрональной активности.

В функционировании клеток важную роль играют ионы  $H^+$  и  $Cl^-$ . Оба иона участвуют в регуляции многих клеточных процессов, а также модуляции функции различных белков, включая ионные каналы. Регуляция гомеостаза этих ионов поддерживается сложными взаимодействиями ионных транспортёров и обменников. Дисфункция или изменения в работе этих белков критически связана с этиологией ряда неврологических расстройств, включая эпилепсию, ишемию, аутоиммунные расстройства и невропатическую боль.

Для неинвазивного анализа внутриклеточных концентраций хлора ( $[Cl^-]_i$ ) и водорода ( $[H^+]_i$ ), мы создали линию трансгенных мышей, экспрессирующих в нейронах генетически кодируемый биосенсор для одновременной регистрации изменений этих ионов (ClorHensor) и получили карту его экспрессии в различных областях мозга.

В срезах мозга был проведён мониторинг этих ионов в различных экспериментальных условиях, включая изменение внешних концентраций ионов ( $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ), синаптическую стимуляцию, а также анализ роли транспортёров хлора KCC2 и NKCC1 в поддержании  $[Cl^-]_i$  в срезах гиппокампа.

Полученные результаты позволяют предполагать, что: (i) в соме нейронов и дендритах  $[Cl^-]_i$  могут значительно различаться; (ii) кинетика восстановления  $[H^+]_i$  примерно в 4 раза медленнее, чем  $[Cl^-]_i$ ; (iii) ингибирование основных транспортёров  $Cl^-$  приводит лишь к незначительным изменениям  $[Cl^-]_i$  и не влияет на кинетику восстановления базового уровня  $[Cl^-]_i$  после синаптической стимуляции.

В общем, результаты демонстрируют, что трансгенные мыши, экспрессирующие ClorHensor, представляют собой надёжный инструмент для неинвазивного одновременного анализа гомеостаза  $Cl^-$  и  $H^+$ .



## **OPTOSENSORIC ANALYSIS OF CHLORINE AND HYDROGEN HOMEOSTASIS IN BRAIN SLICES OF TRANSGENIC MICE**

Bregestovski P.D.<sup>1,2,\*</sup>, Petukhova E.O.<sup>1,3</sup>, Ponomareva D.N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Neurosciences, Kazan State Medical University, Kazan, Russia

<sup>2</sup> Institut de Neurosciences des Systemes, Aix-Marseille University, INSERM, INS, Marseille, France

<sup>3</sup> Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia

*\*E-mail: pbreges@gmail.com*

Optosensorics is the direction of research possessing the possibility of non-invasive monitoring of intracellular ions concentrations, activity of enzymes, lipids and other cellular components using specific optical sensors.

In recent years, various types of genetically encoded sensors have been created that change fluorescence when interacting with certain ions or molecules. Their use made it possible to noninvasively monitor many intracellular processes, including changes in cAMP, glucose, glutamate, lactate, different ions and neuronal activity.

H<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions play an important role in the functioning of cells. Both ions are involved in the regulation of many cellular processes, as well as the modulation of the function of various proteins, including ion channels. Regulation of the homeostasis of these ions is supported by complex interactions of ion transporters and exchangers. Dysfunction or changes in the functioning of these proteins are critically associated with the etiology of a number of neurological disorders, including epilepsy, ischemia, autoimmune diseases and neuropathic pain.

For non-invasive analysis of intracellular concentrations of chloride ([Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>) and hydrogen ([H<sup>+</sup>]<sub>i</sub>), we created a line of transgenic mice expressing a genetically encoded biosensor (ClopHensor) for simultaneous registration of changes in these ions in neurons and obtained a map of its expression in various brain regions.

[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> and [H<sup>+</sup>]<sub>i</sub> were monitored in brain slices under various experimental conditions, including changes in external ion concentrations (Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>), synaptic stimulation, as well as analysis of the role of Cl<sup>-</sup> transporters KCC2 and NKCC1 in maintaining [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> in hippocampal slices.

The obtained results suggest that: (i) [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> may differ significantly in the soma of neurons and in dendrites; (ii) recovery of [H<sup>+</sup>]<sub>i</sub> after synaptic stimulation is approximately 4 times slower than the kinetics of [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>; (iii) inhibition of the main transporters of Cl<sup>-</sup> (KCC2 and NKCC1) leads to only minor changes [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> and does not affect the kinetics of recovery of the baseline level of [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> after synaptic stimulation.

In general, the results demonstrate that transgenic mice expressing ClopHensor represent a reliable tool for non-invasive simultaneous analysis of Cl<sup>-</sup> and H<sup>+</sup> homeostasis.

**ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЯ НАРУШАЕТ ФОРМИРОВАНИЕ НЕРВНОЙ ТКАНИ В НЕОКОРТЕКСЕ И ГИППОКАМПЕ МОЗГА КРЫС ПО ДАННЫМ КОНФОКАЛЬНОЙ И ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ.**

Васильев Д.С.<sup>1,\*</sup>, Туманова Н.Л.<sup>1</sup>, Щербицкая А.Д.<sup>1,2</sup>, Михель А.В.<sup>1,2</sup>,  
Дубровская Н.М.<sup>1</sup>, Арутюнян А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктивной  
медицины им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

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

Пренатальная гипергомоцистеинемия вызывает нарушение плацентарного кровотока и может привести к серьезным изменениям в формировании мозга потомства. Данное исследование было проведено с целью анализа влияния пренатальной гипергомоцистеинемии (пГГЦ) на популяции нейрональных и глиальных клеток теменной коры и гиппокампа в раннем онтогенезе крыс.

Гипергомоцистеинемия была вызвана у самок крыс путем введения 0,15% водного раствора метионина в период с 4 по 21 день беременности. Было проанализировано распределение нейрональных и глиальных маркерных белков иммунофлуоресцентным анализом в первый месяц после рождения.

В первый месяц постнатального онтогенеза как в теменной коре, так и в области СА1 гиппокампа крысят, подвергнутых пГГЦ, снижалось количество Fox3-позитивных нейронов с вытянутыми телами, что свидетельствует о гибели проекционных пирамидных нейронов. В то же время, как в коре, так и в гиппокампе развивались нейровоспалительные процессы, выражающиеся в активации астроцитарной глии и микроглии, повышении уровня провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-6. Электронная микроскопия также выявила дегенеративные изменения в нейронах у пГГЦ крысят в первый месяц после рождения. На ультраструктурном уровне наблюдалось накопление лизосом и аутофагосом в цитоплазме тела и отростков нейронов, набухание эндоплазматического ретикулума и разрушение митохондрий. На взрослой стадии наблюдались остаточные патологические изменения, включая хроматолиз и нейрофиламентозную дегенерацию. Показано, что пГГЦ нарушает синаптогенез и миелинизацию как у молодых, так и у взрослых крыс. Было показано, что пГГЦ нарушает распределение постсинаптических маркерных белков PSD-95 и синаптоподина в гиппокампе, что указывает на снижение количества лабильных дендритных шипиков, в которых эти белки колокализуются. Как у молодых, так и у взрослых крыс с пГГЦ наблюдалось некоторое снижение содержания гликопротеина миелина олигодендроцитов, который участвует в стабилизации миелина. Электронная микроскопия выявила расслоение слоёв миелина как в гиппокампе, так и в мозолистом теле у животных с пГГЦ. Предполагается, что пГГЦ приводит к гибели нейронов, нейровоспалению, аутофагии, деградации миелина и синаптических терминалей, провоцируя развитие когнитивного дефицита.

*Поддержано Российским научным фондом (№ 22-15-00393).*

**MATERNAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA DISTURBS THE FORMATION OF NEURAL TISSUE IN NEOCORTEX AND HIPPOCAMPUS OF RAT BRAIN, ACCORDING TO THE DATA OF CONFOCAL AND ELECTRON MICROSCOPY**

Vasilev D.S.<sup>1,\*</sup>, Tumanova N.L.<sup>1</sup>, Shcherbitskaia A.D.<sup>1,2</sup>, Mikhel A.V.<sup>1,2</sup>,  
Dubrovskaya N.M.<sup>1</sup>, Arutjunyan A.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, Saint Petersburg, Russia

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

Maternal hyperhomocysteinemia causes the disruption of placental blood flow and can lead to serious disturbances in the formation of the offspring's brain. This study was performed to analyze the effect of prenatal hypoxia on the populations of neuronal and glial cells of the parietal cortex and hippocampus in early rat ontogenesis.

Maternal hyperhomocysteinemia (mHHC) was induced in female rats by administration of 0.15% aqueous methionine solution in the period of days 4–21 of pregnancy. The distribution of the neuronal and glial marker proteins was analyzed by immunofluorescent analysis on first month after birth.

In the first month of postnatal ontogenesis in both parietal cortex and CA1 area of hippocampus of mHHC pups, the number of Fox3-positive neurons with elongated bodies decreased, which indicates the death of projection pyramidal neurons. At the same time, both in the cortex and in the hippocampus, neuroinflammatory processes developed, expressed in the activation of astrocytic glia and microglia, an increase in the level of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6. Electron microscopy also revealed degenerative changes in the neurons in mHHC pups during the first month after birth. Accumulation of lysosomes and autophagosomes in the cell body and processes, swelling of the endoplasmic reticulum and destruction of the mitochondria were observed at the ultrastructural level. In adults residual pathological changes were observed including chromatolysis and neurofilamentous degeneration of the neurons. It was also shown that mHHC disturbs synaptogenesis and myelination in both young and adult stages. The mHHC was shown to disturb the distribution of postsynaptic marker proteins PSD-95 and synaptopodin in hippocampus suggesting the decrease of the labile dendritic spines where these proteins are colocalized. In both young and adult mHHC rats there were some decrease of the content of the oligodendrocyte myelin glycoprotein known to be involved to stabilization of the myelin sheets. Electron microscopy revealed the separation of the myelin sheets in both hippocampus and corpus callosum of mHHC animals. mHHC might lead to the neuronal death, neuroinflammation, autophagia of the neurons, the degradation of the myelin and synaptic terminals, leading to the development of the cognitive disfunctions.

*Supported by Russian Scientific Foundation (22-15-00393).*

## ВЛИЯНИЕ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ АСТРОЦИТОВ НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Герасимов Е.И.<sup>1</sup>, Ерофеев А.И.<sup>1</sup>, Безпрозванный И.Б.<sup>1,2</sup>, Власова О.Л.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого, Россия

<sup>2</sup> Юго-Западный медицинский центр Техасского университета, Даллас, штат Техас, США

\*E-mail: [olvasova@yandex.ru](mailto:olvasova@yandex.ru)

Астроциты, влияют на функцию нейронов различными способами, например, регулируя концентрацию ионов и нейромедиаторов, высвобождая глутрансмиттеры, которые могут действовать непосредственно на рецепторы нейронов, модулируя возбудимость нейронов, синаптическую передачу и пластичность. Астроциты и нейроны взаимодействуют напрямую с образованием трехчастного синапса. При стимуляции астроциты генерируют кальциевые волны с последующим высвобождением различных глутрансмиттеров, нейромодуляторов и факторов, регулирующих активность нейронов (Gorina Y. V., et al., 2022).

Для оценки влияния оптогенетической стимуляции метаботропного рецептора *Opto-a1AR*, экспрессируемого в астроцитах, на когнитивные функции трансгенных мышей линии *5xFAD*, а также на морфологию дендритных шипиков – места образования трехчастного синапса, *AAV-Opto-a1AR-EYFP* был инжектирован в гиппокамп мыши возраста 6 мес., и имплантировано оптоволокно над областью гиппокампа. Световые параметры для активации оптоконструкта составляли 5 мин импульсов длительностью 100 мс с интервалом 1 с (Gerasimov E.I., et al., 2022). По результатам поведенческого теста *fear conditioning* было зафиксировано отсутствие формирования долговременной памяти на 10 день у трансгенных мышей линии *5xFAD* (время замирания ( $\tau$ ) – мера памяти в данном тесте, до тона:  $19.53 \pm 9.33\%$  и во время тона:  $21.22 \pm 4.07\%$ ,  $n=6$ ,  $p=0.88$ ,  $t$ -тест Стьюдента). Оптогенетическая стимуляция привела к увеличению  $\tau$  на 10 день (до тона:  $20.32 \pm 9.39\%$ ; во время тона:  $51.17 \pm 7.55\%$ ,  $n=7$  для двух значений,  $p=0.038$ , тест Манна–Уитни). Анализ морфологии дендритных шипиков показал значительное уменьшение плотности грибовидных шипиков у трансгенных мышей линии *5xFAD* по сравнению с диким типом ( $32.52\% \pm 1.19\%$  и  $48.88\% \pm 1.2\%$ ,  $p < 0.0001$ ), в то время как в группе после 5-дневной оптогенетической стимуляции наблюдалось восстановление их плотности (*5xFAD*-эксп:  $46.14\% \pm 0.9\%$  vs *WT*-контроль:  $48.88\% \pm 1.2\%$ ,  $p > 0.99$ ).

В этом исследовании было определено, что импульсный режим с параметрами  $T = 1$  с,  $t = 100$  мс оказывает влияние на формирование долговременной пластичности в модели мышей с болезнью Альцгеймера.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-65-46004 (ОЛВ).*

**EFFECT OF OPTOGENETIC STIMULATION OF ASTROCYTES ON COGNITIVE FUNCTIONS OF MICE WITH ALZHEIMER'S DISEASE MODEL**

Gerasimov E.I.<sup>1</sup>, Erofeev A.I.<sup>1</sup>, Bezprozvanny I.B.<sup>1,2</sup>, Vlasova O.L.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA

\*E-mail: olvasova@yandex.ru

Astrocytes affect the function of neurons in various ways, for example, by regulating the concentration of ions and neurotransmitters, releasing gliotransmitters that can act directly on the receptors of neurons, modulating their excitability, synaptic transmission and plasticity. Astrocytes and neurons interact directly to form a three-part synapse. When stimulated, astrocytes generate calcium waves followed by the release of various neurotransmitters, neuromodulators and factors regulating the activity of neurons (Gorina Y. V., et al., 2022).

To assess the effect of optogenetic stimulation of the metabotropic Opto-a1AR receptor expressed in astrocytes on the cognitive functions of transgenic mice of the 5xFAD line, as well as on the morphology of dendritic spines – the site of the formation of a three-part synapse, AAV-Opto-a1AR-EYFP was injected into the hippocampus of mice aged 6 months and an optical fiber was implanted over the hippocampal region. Optostimulation parameters were 5 minutes of pulses with a duration of 100 ms with an interval of 1 s (Gerasimov E.I., et al., 2022). According to the results of the fear conditioning behavioral test, the absence of long-term memory formation on day 10 was recorded in transgenic mice of the 5xFAD line (the duration of freezing is a measure of memory in this test, up to a tone:  $19.53 \pm 9.33\%$  and during tone:  $21.22 \pm 4.07\%$ ,  $n=6$ ,  $p=0.88$ , Student's t-test). Optogenetic stimulation led to an increase in the freezing time by 10 days (before tone:  $20.32 \pm 9.39\%$ ; during tone:  $51.17\% \pm 7.55\%$ ,  $n=7$  for two values,  $p=0.038$ , Mann-Whitney test). Analysis of the morphology of dendritic spines showed a significant decrease in the density of mushroom spines in transgenic mice of the 5xFAD line compared with the wild type ( $32.52\% \pm 1.19\%$  and  $48.88\% \pm 1.2\%$ ,  $p < 0.0001$ ), while in the group after 5-day optogenetic stimulation, their density was restored (5xFAD-exp:  $46.14\% \pm 0.9\%$  vs WT-control:  $48.88\% \pm 1.2\%$ ,  $p > 0.99$ ).

It was determined that the pulse mode with parameters  $T = 1$  s,  $t = 100$  ms affects the formation of long-term plasticity in a model of mice with Alzheimer's disease.

*Supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 20-65-46004 (OLV).*

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА МИНИАТЮРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ  
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА АКТИВНОСТИ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ**

Герасимов Е.И.<sup>1,\*</sup>, Митенев А.В.<sup>1</sup>, Пчицкая Е.И.<sup>1</sup>, Ерофеев А.И.<sup>1</sup>, Чуканов В.С.<sup>1</sup>,  
Власова О.Л.<sup>1</sup>, Безпрозванный И.Б.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский политехнический институт Петра Великого Университет,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Юго-Западный медицинский центр Техасского университета, Даллас, штат Техас,  
США

\*E-mail: [Evgeniigerasimov1997@gmail.com](mailto:Evgeniigerasimov1997@gmail.com)

Визуализация нейрональной активности определённой области головного мозга свободно передвигающегося животного *in vivo* позволяет получить обширный массив информации о паттернах работы нейронов, изменении в их возбудимости и взаимосвязи между друг другом (Rubinov M., Sporns O., 2010). Метод, который позволяет визуализировать активность в целом нейронных сетей отделов головного мозга – микроскопия с применением минископа (Gerasimov E.I., et al., 2022). При массе в 3 грамма минископ обладает разрешением, достаточным для визуализации отдельных нейронов, что позволяет регистрировать изменения в работе нейронов при помощи экспрессии в них генетически кодируемых кальциевых индикаторов.

В данном исследовании инъекция вируса AAV-GCaMP6f была выполнена в гиппокамп 5-месячных диких мышей линии B6SJL, и через 3 недели над областью интереса фиксировалась градиентная линза и последующая фиксация опорной площадки. Изменения уровня кальция регистрировались с помощью Miniscope v3 в тесте «открытое поле». Для количественного анализа полученных данных об активности нейронов был разработан программный пакет, реализованный на языке программирования python, позволяющий количественно оценить параметры нейронной сети. На первом этапе определяется активное состояние нейронов. Нейрон активен, если производная его сигнала превышает пороговое значение. Далее производится вычисление статистик, описывающих поведение нейронной сети: уровень активности нейронной сети – параметр, отображающий количество активных нейронов за определенный промежуток времени; всплесковая активность нейронов – представляет собой количество «активаций клетки» за определенный промежуток времени; количество попарных корреляций между нейронами с применением коэффициента Пирсона. На основе значений попарных корреляций производится анализ связности сети (доля связанных нейронов в зависимости от порогового уровня) и анализ зависимости значения коэффициента Пирсона от расстояния между коррелирующими нейронами.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-15-00049 (ИБ).*

**METHOD OF MINIATURE FLUORESCENCE MICROSCOPY FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF NEURAL NETWORK ACTIVITY**

Gerasimov E.I.<sup>1,\*</sup>, Mitenev A.V.<sup>1</sup>, Pchitskaya E.I.<sup>1</sup>, Erofeev A.I.<sup>1</sup>, Chukanov V.S.<sup>1</sup>, Vlasova O.L.<sup>1</sup>, Bezprozvanny I.B.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic Institute University, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA

\*E-mail: [Evgeniigerasimov1997@gmail.com](mailto:Evgeniigerasimov1997@gmail.com)

Visualization of the neuronal activity of a certain area of the brain of a freely moving animal *in vivo* allows to obtain an extensive array of information about the patterns of neuronal activity, changes in their excitability and the connections between each other (Rubinov M., Sporns O., 2010). A method that allows you to visualize the activity of neural networks of brain departments in general is microscopy using a miniscope (Gerasimov E.I., et al., 2022). With a mass of 3 grams, the miniscope has a resolution sufficient to visualize individual neurons, which makes it possible to register changes in the work of neurons using the expression of genetically encoded calcium indicators in them.

In this study, an injection of AAV-GCaMP6f virus was performed into the hippocampus of 5-month-old wild mice of the B6SJL line, and after 3 weeks a gradient lens was implanted over the area of interest with the following baseplate fixation. Changes in calcium levels were recorded using Miniscope v3 in the "open field" test. For the quantitative analysis of the obtained data on the activity of neurons, a software package was developed, implemented in the python programming language, which allows quantifying the parameters of a neural network. At the first stage, the active state of neurons is determined. The neuron is active if the derivative of its signal exceeds the threshold value. Next, statistics describing the neural network are calculated: the activity level of the neural network is a parameter that displays the number of active neurons for a certain period of time; burst rate of neurons – represents the number of "cell activations" over a certain period of time; the level of pairwise correlations between neurons using the Pearson coefficient.

The presented approach to the study of the work of neural networks of the brain, in particular the hippocampus, will allow to identify and register violations in their work in pathological conditions of the brain in neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease.

*Supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 22-15-00049 (IB).*

## СОЗДАНИЕ ФОТОРЕГУЛИРУЕМЫХ СИСТЕМ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА CRISPR/CAS9 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИКЛИЧЕСКИХ ФОТОРАСЩЕПЛЯЕМЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Горленко Е.С.<sup>1,2,\*</sup>, Саковина Л.В.<sup>1,2</sup>, Новопашина Д.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

\*E-mail: e.gorlenko@g.nsu.ru

Актуальной задачей молекулярной и синтетической биологии является создание систем геномного редактирования CRISPR/Cas9 с регулируемой активностью. Введение фоточувствительных компонентов в состав олигонуклеотидных конструкций обеспечивает неинвазивную регуляцию системы путем облучения светом определенной длины волны с высоким пространственным и временным разрешением.

Целью работы является разработка подходов к созданию систем редактирования генома, действие которых можно регулировать путем УФ-облучения.

С использованием специально полученного фосфитамида на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола (PL) твердофазным фосфитамидным методом получали фотомодифицированные олигонуклеотиды, содержащие функциональные группы на 3'- и 5'-концах. Циклизацию синтезированных олигонуклеотидов проводили методом азид-алкинового циклоприсоединения в присутствии Cu(I). При облучении циклических фоторасщепляемых олигонуклеотидов УФ-светом длиной волны 365 нм была продемонстрирована их способность к линеаризации.

Для проверки эффективности действия системы в качестве модельного субстрата использовали плазмиду, содержащую мотив PAM и участок узнавания системой CRISPR/Cas9. «Включение» системы осуществляли с помощью циклических направляющих sgРНК, содержащих 2'-модифицированные рибонуклеотиды и один или два фоторасщепляемых линкера. Увеличение эффективности расщепления ДНК наблюдали за счет линеаризации sgРНК при облучении системы УФ-светом. Для «выключения» системы разработаны циклические блокирующие олигонуклеотиды с фоторасщепляемыми линкерами, способные после линеаризации связывать направляющую РНК и блокировать действие системы. Показано снижение эффективности расщепления ДНК на 15% после облучения при использовании блокирующих олигонуклеотидов.

Полученные результаты подтверждают перспективность предложенных подходов к использованию фоторасщепляемых циклических олигонуклеотидов в составе системы редактирования генома CRISPR/Cas9 для регуляции ее активности.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-14-00294.*



**DEVELOPMENT OF PHOTOREGULATABLE CRISPR/CAS9 GENE EDITING SYSTEMS USING CYCLIC PHOTOCLEAVABLE OLIGONUCLEOTIDES**

Gorlenko E.S.<sup>1,2,\*</sup>, Sakovina L.V.<sup>1,2</sup>, Novopashina D.S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

\* *E-mail: e.gorlenko@g.nsu.ru*

The actual problem of molecular and synthetic biology is the development of CRISPR/Cas9 gene editing systems with regulated activity. The integration of photosensitive components into the oligonucleotide structure provides non-invasive regulation of the system by irradiating with light of a certain wavelength with high spatial and temporal resolution.

The goal of this work is the development of photoreglatable CRISPR/Cas9 gene editing systems using cyclic photocleavable oligonucleotides.

Using a specially prepared phosphoramidite, based on 1-(2-nitrophenyl)-1,2-ethanediol (PL), photomodified oligonucleotides containing functional groups at the 3'- and 5'- ends were obtained by the solid-phase phosphoramidite method. The cyclization of the synthesized oligonucleotides was carried out using the azide-alkyne cycloaddition method in the presence of Cu(I). The ability of cyclic photo-cleavable oligonucleotides to linearize was demonstrated upon irradiation with UV light with a wavelength of 365 nm.

For investigation the effectiveness of the system we used a plasmid, containing a PAM motif and a CRISPR/Cas9 recognition site, as a model substrate. The "activation" of the system was carried out using cyclic guide crRNAs containing 2'-modified ribonucleotides and one or two photocleavable linkers. Increasing efficiency of DNA cleavage was observed due to the linearization of crRNA upon irradiation of the system with UV light. For "turning off" the system we designed and synthesized cyclic blocking oligonucleotides with photocleavable linkers, which can bind to the guide RNA after linearization and block the activity of the system. We observed the 15% reduction in the efficiency of DNA cleavage after irradiation with the use of blocking oligonucleotides.

Therefore, the results confirm the potential of proposed approaches to the usage of photocleavable cyclic oligonucleotides as a part of the CRISPR/Cas9 gene editing system to regulate its activity.

*Supported by the grant of Russian Science Foundation 22-14-00294.*

## **ХЕМОГЕНЕТИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННЫЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В НЕРВНЫХ КЛЕТКАХ СНИЖАЕТ СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ**

Джаппи Д.<sup>1</sup>, Калининченко А.Л.<sup>2,3</sup>, Соллус Г.М.<sup>2</sup>, Мальцев Д.И.<sup>1,2</sup>, Мухаметшина Л.Ф.<sup>2,3</sup>, Богданова Ю.А.<sup>4</sup>, Соколов Р.А.<sup>4</sup>, Моценко А.А.<sup>1</sup>, Подгорный О.В.<sup>1,2,5</sup>, Розов А.В.<sup>1,\*</sup>, Белоусов В.В.<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Россия; <sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия; <sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; <sup>4</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия; <sup>5</sup> Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия  
*\*E-mail: rozov1511@gmail.com*

Среди других клеток организма нейроны являются наиболее чувствительными клетками к окислительному стрессу. Главными причинами этого являются интенсивный энергетический метаболизм и особенности строения мембран нервных клеток. Старение мозга и нейродегенеративные заболевания такие, как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, всегда сопровождаются окислительным стрессом нейронов. Поэтому его часто рассматривают как причину таких патологических состояний. Однако до сих пор нет прямых доказательств этого. Связано это с отсутствием методологий для моделирования изолированного окислительного стресса. В своей работе мы применяем оксидазу D-аминокислот (DAAO) из дрожжей для того, чтобы создать изолированный окислительный стресс в нейронах путем хемогенетической продукции пероксида водорода. Проэкспрессировав в культивируемых нейронах из эмбрионального мозга мышей DAAO или его инактивированный мутант DAAO(R285A) (контроль) вместе с генетически кодируемым сенсором на пероксид водорода HuPer7, мы показали, что добавление к нейронам с DAAO D-норвалина вызывает продукцию в них пероксида водорода. Тогда как на контрольные клетки добавление субстрата не влияет. Для того, чтобы изучить физиологические эффекты хемогенетически продуцируемого пероксида водорода, вирусные вектора с DAAO или его инактивированным мутантом доставлялись в пирамидные нейроны поля CA1 гиппокампа взрослых мышей. В электрофизиологических экспериментах на переживающих срезах гиппокампа мы обнаружили, что хемогенетически индуцированный окислительный стресс подавляет долговременную потенцию, один из механизмов клеточной памяти. Это результат показывает, что в условиях окислительного стресса быстро «стирается» память нейронов. Наши наблюдения, вероятно, объясняют процессы, происходящие при возрастной деменции, когда еще не начали разрушаться нервные связи и дегенерировать нервные клетки. Полученные нами результаты имеют важное значение для проверки гипотезы о роли окислительного стресса в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и для создания более релевантных моделей таких заболеваний для изучения механизмов патогенеза на досимптомных стадиях.

*Проект поддержан грантами РНФ №№ 20-15-00280 (О.В.П.) и 22-15-00293 (А.В.Р.).*

## CHEMOGENETICALLY INDUCED INTRANEURONAL OXIDATIVE STRESS AFFECTS SYNAPTIC PLASTICITY

Jappy D.<sup>1</sup>, Kalinichenko A.L.<sup>2,3</sup>, Solius G.M.<sup>2</sup>, Maltsev D.I.<sup>1,2</sup>, Mukhametshina L.F.<sup>2,3</sup>, Bogdanova Y.A.<sup>4</sup>, Sokolov R.A.<sup>4</sup>, Moschenko A.A.<sup>1</sup>, Podgorniy O.V.<sup>1,2,5</sup>, Rozov A.V.<sup>1,\*</sup>, Belousov V.V.<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup> Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Moscow, Russia; <sup>2</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia; <sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; <sup>4</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia; <sup>5</sup> Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine at Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

\*E-mail: rozov1511@gmail.com

Among other cells in the organism, neurons are the most sensitive cells to oxidative stress. This sensitivity is linked to intensive energy metabolism and properties of neuronal cell membranes. Brain aging and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's are always accompanied by oxidative stress on neurons. Therefore, oxidative stress is often considered as the cause of such pathological conditions. However, there is still no direct evidence that support this view. This is due to the lack of methodologies for modeling isolated oxidative stress. In our work, we use yeast D-amino acid oxidase (DAAO) to emulate isolated oxidative stress in neurons through the chemogenetic production of hydrogen peroxide. By expressing DAAO or its inactivated mutant DAAO(R285A) (control) in cultured neurons from the embryonic mouse brain together with the genetically encoded hydrogen peroxide sensor HyPer7, we showed that the addition of D-norvaline to neurons with DAAO causes the production of hydrogen peroxide. Whereas the addition of the substrate does not have any effect on the control cells. In order to study the physiological effects of chemogenetically produced hydrogen peroxide, viral vectors with DAAO or its inactivated mutant were delivered to the pyramidal neurons of the CA1 field of the hippocampus of adult mice. In electrophysiological experiments on acute hippocampal slices, we found that chemogenetically induced oxidative stress suppresses long-term potentiation, one of the mechanisms of cellular memory. This observation probably explains the processes that occur in age-related dementia prior to appearance of obvious neurodegeneration. Our results are important for verifying the hypothesis of the role of oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative diseases and for creating more relevant models of such diseases for studying the mechanisms of pathogenesis.

*The project was funded by RSF grants No. 20-15-00280 (to O.V.P.) and No. 22-15-00293 (A.V.R.).*

**ХЕМОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ТРЕВОЖНОСТИ И ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОГО ПОВЕДЕНИЯ КРЫС «ПОДРОСТКОВОГО» И «ВЗРОСЛОГО» ВОЗРАСТОВ МИНДАЛИНОЙ**

Дыгало Н.Н.<sup>1,2,\*</sup>, Дрозд У.С.<sup>1,2</sup>, Булыгина В.В.<sup>1</sup>, Калинина Т.С.<sup>1,2</sup>, Комышева Н.П.<sup>1</sup>, Шишкина Г.Т.<sup>1</sup>, Ланшаков Д. А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

\* E-mail: [dygalo@bionet.nsc.ru](mailto:dygalo@bionet.nsc.ru)

С использованием хемогенетического подхода выясняли роль глутаматергических нейронов миндалины в регуляции тревожного и депрессивно-подобного поведения животных «подросткового» и «взрослого» возрастов. Для этого неонатальным или взрослым самцам крыс билатерально в миндалину вводили AAV векторы, экспрессирующие в глутаматергических нейронах DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs), которые под влиянием Clozapine-N-oxide (CNO): повышали (CaMKIIa-hM3D(Gq)-mCherry), снижали (CaMKIIa-hM4D(Gi)-mCherry) или не меняли (CaMKIIa-Egfp) активность нейронов. Через 4 недели после введения векторов, флуоресценция mCherry и Egfp, а также мРНК DREADDs подтвердили экспрессию векторов в миндалине. Стимуляция активирующего DREADD ослабляла через 30 мин проявление депрессивно-подобного поведения в тесте «подвешивание за хвост» (TST) молодых и взрослых крыс, которому сопутствовало повышение уровня мРНК bdnf в префронтальной коре по сравнению с ответами животных соответствующих возрастов, получавших введение в миндалину ингибирующих или нейтральных векторов. В отличие от TST, влияние хемогенетических воздействий на тревожность в тесте «светлый/темный бокс» (LDB) взрослых и ювенильных животных существенно различалось. Взрослые крысы с экспрессией в миндалине вектора, угнетающего активность нейронов, скрывались в темном отсеке LDB в 3 раза быстрее, чем животные всех остальных групп. Возможная причина такого поведения взрослых животных могла состоять в снижении активности глутаматергических нейронов миндалины, оцененной по уровню белка c-Fos, и содержания BDNF в этих нейронах, обеспечивающего, как считается, поведенческий ответ на стресс. В целом, впервые обнаружено, что хемогенетическая модуляция активности глутаматергических нейронов базолатеральной миндалины молодых и взрослых крыс вызывает как независимые от возраста, так и возраст-специфические изменения экспрессии BDNF в мозге, некоторые из которых способны обуславливать возрастные особенности поведения.

*Выполнение работы поддержано грантом РФФИ (№ 20-015-00129) и бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН (№ FWNR-2022-0023).*

**CHEMOGENETIC ANALYSIS OF GLUTAMATERGIC REGULATION OF ANXIETY AND DEPRESSION-LIKE BEHAVIOR IN "ADOLESCENT" AND "ADULT" RATS BY AMYGDALA**

Dygalo N.N.<sup>1,2,\*</sup>, Drozd U.S.<sup>1,2</sup>, Bulygina V.V.<sup>1</sup>, Kalinina T.S.<sup>1,2</sup>, Komysheva N.P.<sup>1</sup>, Shishkina G.T.<sup>1</sup>, Lanshakov D.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

\* *E-mail*: dygalo@bionet.nsc.ru

The role of amygdala glutamatergic neurons in the regulation of anxiety and depression-like behavior in "adolescent" and "adult" animals was investigated using chemogenetics. For this, neonatal or adult male rats were injected bilaterally into the amygdala with AAV vectors expressing in glutamatergic neurons DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs), which, upon binding to Clozapine-N-oxide (CNO): increase (CaMKIIa-hM3D(Gq)-mCherry), decrease (CaMKIIa-hM4D(Gi)-mCherry) or do not change (CaMKIIa-Egfp) neuronal activity. Four weeks after the injection of the vectors, mCherry and Egfp fluorescence as well as DREADDs mRNA confirmed the expression of the vectors in the amygdala. Stimulation of the activating DREADD increased the antidepressant-like behavior in the tail suspension test (TST) of rats of both ages, at 30 min after CNO injection. This was accompanied by an increase in the levels of bdnf mRNA in the prefrontal cortex compared to animals of other groups of corresponding ages. In contrast to TST, the effects of chemogenetics on anxiety in the light/dark box test (LDB) in adult and juvenile animals differed significantly. Adult rats expressing in the amygdala vector that inhibits neuronal activity hid in the dark LDB compartment 3 times faster than animals of all other groups. A possible reason for this behavior in adults may be a chemogenetical inhibition of the glutamatergic neurons activity in the amygdala, as was shown by the decreases in the levels of c-Fos and BDNF proteins in these neurons, which is believed to modulate behavioral responses to stress. In general, it was found for the first time that chemogenetic modulation of the activity of glutamatergic neurons in the basolateral amygdala of young and adult rats causes both age-independent and age-specific changes in BDNF expression in the brain, some of which can determine age-related behavioral features.

*Supported by RFBR (№ 20-015-00129), and the budget project of ICG SB RAS (№ FWNR-2022-0023).*

**РАЗРАБОТКА МИКРОЭЛЕКТРОДА ДЛЯ СОВМЕЩЕНИЯ МЕТОДОВ РЕГИСТРАЦИИ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И КАЛЬЦИЕВОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА МЫШЕЙ *IN VIVO*.**

Ерофеев А.И.<sup>1</sup>, Винокуров Е.К.<sup>1,\*</sup>, Власова О.Л.<sup>1</sup>, Безпрозванный И.Б.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия,

<sup>2</sup> Юго-Западный медицинский центр Техасского университета, Даллас, штат Техас, США

\*E-mail: eg.vinokurov@yandex.ru

Технология прижизненной кальциевой визуализации с помощью однофотонного миниатюрного флуоресцентного микроскопа (минископа) является современным и мощным инструментом для исследования нейронных сетей в различных областях мозга. Использование минископа позволяет регистрировать нейронную активность на свободно передвигающихся лабораторных животных, в отличие от традиционно применяемой двухфотонной визуализации.

Семейство генетически кодируемых индикаторов кальция GCaMP широко представлено в научной практике и часто используется в исследованиях нейронной активности *in vivo*. Кальциевая сигнализация связывает мембранную возбудимость и клеточные биологические функции и играет важную роль в визуализации активности нейронов. Данный метод дает возможность понять функциональные взаимосвязи путем регистрации больших популяций нейронов. Тем не менее, достижимое временное разрешение ограничено медленной кинетикой связывания  $Ca^{2+}$ , поскольку генетически кодируемые флуоресцентные индикаторы  $Ca^{2+}$  на основе кальмодулина всегда демонстрируют увеличенное время затухания флуоресценции. Другими словами, регистрация высокочастотных потенциалов действия может быть ограничена динамикой кальциевого сенсора, соответственно кальциевая визуализация *in vivo* не отражает всю активность нейронных сетей. Одним из возможных путей решения данной проблемы является совмещение электрофизиологической регистрации и оптической визуализации.

В данной работе мы спроектировали и изготовили микроэлектрод, адаптированный под размеры градиентной линзы и совмещенный с ней. Данный микроэлектрод представляет собой трехслойную структуру прямоугольной формы из полиимидной пленки и контактных/токопроводящих дорожек из золота, нанесенных методом термоформовки. На одной из сторон пленки расположены 12 открытых токопроводящих контактов для регистрации локальных полевых потенциалов, а на другой стороне аналогичное количество токопроводящих дорожек для подключения коннектора, осуществляющего передачу данных на плату обработки.

Разработанный микроэлектрод позволит объединить методы прижизненной кальциевой визуализации с помощью минископа и электрофизиологической регистрации. Такой подход позволит более детально исследовать активность нейронных сетей, а также картировать мозг свободно движущихся лабораторных животных с высоким пространственно-временным разрешением, что расширит возможности исследований в области нейробиологии.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-75-00028 (АИЕ).*

**DEVELOPMENT OF A MICROELECTRODE TO COMBINE METHODS FOR RECORDING ELECTROPHYSIOLOGICAL ACTIVITY AND CALCIUM IMAGING OF MOUSE HIPPOCAMPAL NEURONS *IN VIVO*.**

Erofeev A.I.<sup>1</sup>, Vinokurov E.K.<sup>1</sup> \*, Vlasova O.L.<sup>1</sup>, Bezprozvanny I.B.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Neurodegeneration, Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia,

<sup>2</sup>University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA

\*E-mail: [eg.vinokurov@yandex.ru](mailto:eg.vinokurov@yandex.ru)

The technology of lifetime calcium imaging using a single-photon miniature fluorescence microscope (miniscope) is a modern and powerful tool for studying neuronal networks in various brain regions. The use of the miniscope makes it possible to record neural activity on freely moving laboratory animals, in contrast to the traditionally used two-photon imaging.

The GCaMP family of genetically encoded calcium indicators is widely represented in scientific practice and is often used in studies of neuronal activity *in vivo*. Calcium signaling links membrane excitability and cellular biological functions and plays an important role in imaging neuronal activity. This method provides an opportunity to understand functional relationships by recording large populations of neurons. However, the achievable temporal resolution is limited by the slow kinetics of Ca<sup>2+</sup> binding because genetically encoded calmodulin-based Ca<sup>2+</sup> fluorescent indicators always exhibit an increased fluorescence attenuation time. In other words, registration of high-frequency action potentials may be limited by calcium sensor dynamics. Accordingly, calcium imaging *in vivo* does not reflect the entire activity of neuronal networks. One possible way to solve this problem is to combine electrophysiological registration and optical imaging.

In this work, we designed and manufactured a microelectrode adapted to the size of the gradient lens and combined with it. This microelectrode is a three-layer rectangular structure made of a polyimide film and gold contact/conducting tracks applied by thermoforming. On one side of the film there are 12 open conductive contacts for registration of local field potentials, and on the other side there is a similar number of conductive tracks for connection of the connector that transfers data to the processing board.

The developed microelectrode will allow combining methods of lifetime calcium imaging using a miniscope and electrophysiological registration. This approach will enable a more detailed study of the activity of neuronal networks, as well as mapping the brains of freely moving laboratory animals with high spatial and temporal resolution, which will expand the possibilities of research in the field of neurobiology.

*Supported by the Russian Science Foundation grant no. 22-75-00028 (A.I.E.).*

## ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ ЭПИЛЕПСИИ

Зайцев А.В.\* , Проскурина Е.Ю., Трофимова А.М., Постникова Т.Ю., Ергина Т.Ю.,  
Амахин Д.В., Тиселько В.С., Чижов А.В.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: [aleksey\\_zaitsev@mail.ru](mailto:aleksey_zaitsev@mail.ru)

По оценкам ВОЗ почти 1% населения страдает от эпилепсии. Несмотря на успехи в создании новых противоэпилептических препаратов, полного избавления от судорожных припадков не удается достичь почти у трети больных.

Одним из перспективных подходов к лечению эпилепсии может стать генная терапия. Так как эпилептическая активность обусловлена нарушением баланса возбуждения и торможения, то усилия исследователей направлены в первую очередь на регуляцию возбудимости нейронов. Первоначально, основные подходы были основаны на гиперэкспрессии ингибирующих пептидов, таких как галанин или NPY, или подавлении возбудимости нейронов путем гиперэкспрессии в них калиевых каналов. Однако эти воздействия должны быть хорошо рассчитаны и строго дозированы, так как скорректировать экспрессию в дальнейшем сложно. При недостаточной экспрессии противосудорожный эффект не достигается, а при избыточной – происходит нарушение функционирования нейронных сетей из-за сильного торможения.

Поэтому интересны методические подходы к лечению, при которых воздействие на возбудимость нейронов в эпилептическом очаге можно контролировать. Таким преимуществом обладают оптогенетический метод. Оптогенетика использует свет для изменения возбудимости определенных популяций нейронов и, более того, может быть использована в парадигме биологической обратной связи, при которой источник света активируется только при риске генерации судорожной активности. Однако в оптогенетическом подходе есть ряд технических сложностей с подведением источника света и риск развития иммунного ответа на экспрессию чужеродных родопсинов. В докладе рассмотрен опыт практического применения оптогенетических инструментов для *in vitro* моделей эпилептиформной активности

Наличие большого спектра методов генной терапии эпилепсии, доказавших свою эффективность в доклинических исследованиях, позволяет предположить, что клиническое испытание некоторых из этих методов начнется уже в ближайшие годы.

*Работа поддержана грантом РФФ 21-15-00430.*



**OPTOGENETIC APPROACH FOR THE TREATMENT OF EPILEPSY**

Zaitsev A.V. \*, Proskurina E.Y., Trofimova A.M., Postnikova T.Y., Ergina J.L., Amahin D.V.,  
Tiselko V.S., Chizhov A.V.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of RAS, Saint Petersburg,  
Russia

\*E-mail: [aleksey\\_zaitsev@mail.ru](mailto:aleksey_zaitsev@mail.ru)

The WHO estimates that nearly 1% of the population suffers from epilepsy. Despite advances in the development of new antiepileptic drugs, seizures cannot be completely eliminated in nearly one-third of patients.

One promising approach to the treatment of epilepsy may be gene therapy. Because epileptic activity is caused by an imbalance between excitation and inhibition, researchers have focused primarily on regulating neuronal excitability. Initially, the main approaches were based on the hyperexpression of inhibitory peptides such as galanin or NPY, or the suppression of neuronal excitability by the hyperexpression of potassium channels in neurons. However, these effects should be well calculated and strictly dosed, as it is difficult to correct the expression later. If the expression is too low, the anticonvulsant effect will not be achieved, and if the expression is too high, the neuronal networks will be impaired due to strong inhibition.

For this reason, methodological approaches to treatment in which the effect on the neuronal excitability in the epileptic focus can be controlled are of great interest. Optogenetic methods offer such an advantage. Optogenetics uses light to alter the excitability of specific neuronal populations and can also be used in a biofeedback paradigm in which the light source is activated only at the risk of generating seizure activity. However, the optogenetic approach has a number of technical difficulties in delivering the light source and the risk of developing an immune response to the expression of rhodopsins. This report reviews the experience with the practical application of optogenetic tools for in vitro models of epileptiform activity.

The availability of a wide range of gene therapy approaches for epilepsy that have demonstrated efficacy in preclinical studies suggests that clinical trials of some of these approaches will begin in the next few years.

*Supported by the Russian Science Foundation (project number 21-15-00430).*

## МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЗАХВАТА И ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОГО УПРАВЛЕНИЯ АКТИВНОСТЬЮ НЕЙРОНОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПАМЯТИ

Ивашкина О.И.<sup>1,2,\*</sup>, Торопова К.А.<sup>1,2</sup>, Рогожникова О.С.<sup>1,2</sup>, Докукин Н.В.<sup>1,3</sup>,  
Анохин К.В.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Институт перспективных исследований мозга МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; <sup>2</sup> Лаборатория нейронного интеллекта МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; <sup>3</sup> НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия

\* E-mail: oivashkina@gmail.com

Накапливающиеся в нейронах данные свидетельствуют о том, что головной мозг представляет собой комплекс взаимосвязанных распределенных нейронных систем, взаимодействия внутри и между которыми составляют главную суть его функций. Для эффективной работы с подобными сложными системами необходимы специфические методические подходы, позволяющие: (1) визуализировать эти глобальные клеточные сети *ex vivo* и (2) изучать функциональные свойства нейронов этих когнитивных сетей *in vivo*, а также (3) проводить каузальный анализ этих сетей посредством избирательного управления составляющих их нейронов. В последнее время был разработан новый подход, в основе которого лежит способность немедленных ранних генов (НРГ), в т.ч., *c-fos*, выступать сенсором активации нейронов. Экспрессия НРГ используется в качестве триггера Cre-Lox рекомбинации, обеспечивающей внесение перманентной модификации в геном активированных клеток. Генетически «захваченная» таким образом нейронная сеть оказывается пожизненно модифицирована путем активации экспрессии репортерного (кодирующего флуоресцентный белок (ФБ) или кальциевый сенсор) или актуаторного (кодирующего оптогенетический канал (ОК)) генов. Применяемая CreER рекомбиназа активна в клетках исключительно в присутствии синтетического антагониста эстрогена – тамоксифена, таким образом, момент «генетического захвата» определяется двумя факторами: экспрессией НРГ в клетке на фоне новизны и введением тамоксифена. В первой части работы использовали мышей линии Fos-Cre-dTomato. Для этого с помощью методов двойного мечения было оценено перекрытие двух популяций клеток в мозге – активированных в ситуации первого обследования обстановки (помеченных путем Cre-рекомбинации ФБ tdTomato) и обследования уже хорошо знакомой обстановки (выявляемых по экспрессии НРГ *c-fos*). Было использовано две группы мышей: первая группа обследовала одну и ту же обстановку дважды, а вторая - обследовала две разные обстановки. Было показано, что одну и ту же обстановку с низким уровнем новизны в мозге кодируют в значительной степени одни и те же нейроны. При этом, разные обстановки с высоким уровнем новизны кодируются в мозге разными, практически не перекрывающимися популяциями нейронов. Во второй части работы использовали животных линии Fos-Cre-ChR2, у которых в генетически захваченной энграмме экспрессируется ОК каналородпсин-2, позволяющий специфически стимулировать активность клеток. Была проведена оптогенетическая стимуляция небольшой части изначально помеченной когнитивной группы для проверки возможности извлечения полной когнитивной группы при активации ее части. Показано, что такая стимуляция энграммы, захваченной в ситуации низкой новизны для животного, не может привести к извлечению из памяти всей изначальной энграммы целиком, активируя только небольшую ее часть. При этом, однако, стимуляция нейронов энграммы, захваченной в ситуации высокой новизны для животного, может привести к извлечению из памяти существенной части изначальной энграммы.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Некоммерческого Фонда развития науки и образования «Интеллект» и проекта МОН РФ № 075-15-2020-801.*

## GENETIC TRAPPING AND OPTOGENETIC CONTROL METHODS FOR MEMORY FUNCTIONS STUDIES

Ivashkina O.I.<sup>1,2,\*</sup>, Toropova K.A.<sup>1,2</sup>, Rogozhnikova O.S.<sup>1,2</sup>, Dokukin N.V.<sup>1,3</sup>,  
Anokhin K.V.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Institute for Advanced Brain Studies, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Laboratory of Neuronal Intelligence, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Anokhin Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia

\* E-mail: oivashkina@gmail.com

Data accumulating in neuroscience suggest that brain is a complex of tightly interconnected distributed neuronal systems, and that their internal and external interactions comprise the core of the brain's functions. For the effective interrogation of such complex functional systems, we need methods, that should: (1) visualize these global cellular networks *ex vivo*, (2) investigate functional properties of the neurons in these cognitive networks *in vivo*, and (3) perform casual analysis of these networks through selective manipulation of neuronal functions in said networks.

Recently, a new approach has been developed, which is based on the ability of immediate early genes (IEGs), including c-fos, to act as a sensor for neuronal activation. The expression of IEG is used as a trigger for Cre-Lox recombination, which drives the permanent modification in the genome of the activated cell. The neural network genetically "trapped" in this way is lifelong modified by the expression of reporter (encoding fluorescent protein (FB) or calcium sensor) or actuator (encoding optogenetic channel (OC)) genes. The CreER recombinase, used in this approach is only active in cells in the presence of a synthetic estrogen antagonist, tamoxifen. So. the moment of "genetic trapping" is determined by two factors: the expression of IEG in the cell due to the novelty and the tamoxifen injection.

In the first part of the work, transgenic Fos-Cre-dTomato micewere used. Utilizing double labeling methods, the overlap of two neuronal populations was examined: first, activated after the first context exploration (marked by FB tdTomato after Cre recombination) and second, activated after an already well-known context exploration (detected by the expression of IEG c-fos). Two groups of mice were used: the first group explored the same context twice, and the second examined two different contexts. We demonstrated that the same context with a low level of novelty in the brain is encoded largely by the same neurons. At the same time, different contexts with a high level of novelty are encoded in the brain by different, practically non-overlapping populations of neurons.

In the second part of the work, transgenic Fos-Cre-ChR2 mice were used, in which channelrhodopsin-2 is expressed in the genetically captured engram, which allows specifically stimulating cell activity. Optogenetic stimulation of a small part of the initially labeled cognitive group was performed to test the possibility of retrieval of a complete cognitive group when its part was activated. We demonstrated that such stimulation of an engram captured in low novelty situation for an animal cannot lead to the retrieval of the entire original engram, activating only a small part of it. At the same time, however, stimulation of the neurons of an engram captured in high novelty situation can lead to the retrieval of an essential part of the original engram.

*Supported by Non-Commercial Foundation for Support of Science and Education "INTELLECT" and by the Russian Ministry of Science and Higher Education Project 075-15-2020-801.*

**ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ КАТИОННОГО  
КАНАЛЬНОГО РОДОПСИНА ИЗ ВОДОРΟΣЛИ *PLATYMONAS SUBCORDIFORMIS***

Иджилова О.С.\* , Смирнова Г.Р., Малышев А.Ю.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

\*E-mail: [olgaidzh@gmail.com](mailto:olgaidzh@gmail.com)

Оптогенетика нашла широкое применение в современной экспериментальной биологии. Большое разнообразие новых исследовательских задач требует постоянного расширения арсенала эффективных специализированных оптогенетических инструментов.

Данное исследование посвящено изучению свойств нового канального родопсина PsChR2 из водоросли *P. subcordiformis*. PsChR2 был экспрессирован в нейронах первичных культур гиппокампа мыши путем вирусной трансдукции. Было показано, что при импульсной световой стимуляции на длине волны 470 нм такие нейроны стабильно генерируют светоиндуцированные потенциалы действия на частотах до 40–50 Гц, в то время как для контрольной группы нейронов, экспрессирующей классический ChR2, максимальная частота ответов не превышала 20–30 Гц. Таким образом, PsChR2 значительно лучше, чем ChR2, подходит для обеспечения высокочастотной световой стимуляции нейронов, вероятно за счет своей меньшей десенситизации.

В ряде *all-optical* экспериментальных схем опсины, максимум поглощения которых находится в синей области спектра (такие, как рассматриваемые здесь PsChR2 и ChR2), используются в комбинации с красными флуоресцентными зондами, для возбуждения которых необходим зеленый свет. Мы показали, что в нейронах, экспрессирующих как PsChR2, так и ChR2, стимуляция зеленым светом с длиной волны 530 нм, часто используемой для возбуждения красных флуоресцентных зондов, вызывает генерацию потенциалов действия. В противоположность этому, при длине волны стимулирующего света 550 нм светоиндуцированные токи были пренебрежимо малы. Эти данные необходимо учитывать при оптической регистрации с применением красных флуоресцентных зондов в нейронах, экспрессирующих PsChR2 и ChR2.

**ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDY OF THE PROPERTIES OF CATIONIC CHANNELRHODOPSIN FROM THE ALGA *PLATYMONAS SUBCORDIFORMIS***

Idzhilova O.S.\*; Smirnova G.R., Malyshev A.Y.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, RAS, Moscow, Russia

\*E-mail: [olgaidzh@gmail.com](mailto:olgaidzh@gmail.com)

Optogenetics has found wide application in the modern experimental biology. A large variety of new research challenges calls for a continuous expansion of the optogenetics kit of effective specialized tools.

Here, we studied the properties of the new channelrhodopsin PsChR2 from the alga *P. subcordiformis*. PsChR2 was expressed in the neurons of murine primary hippocampal cultures via viral transduction. Upon 470 nm pulsed light stimulation, neurons consistently fired light-evoked action potentials at the rates of up to 40–50 Hz, while in the control ChR2-expressing group, peak firing rates did not exceed 20–30 Hz. Thus, PsChR2 is much better than ChR2 suited for high-frequency light stimulation of neurons, probably due to its reduced desensitization.

In a number of all-optical experiment setups, opsins whose absorption maximum lies within the blue spectral region (such as PsChR2 or ChR2) are used alongside with red fluorescent probes, which require green excitation light. In both PsChR2- and ChR2-expressing neurons, 530 nm light stimulation, which is commonly used to excite red fluorescent probes, induced action potential generation. In contrast, upon 550 nm light stimulation, the light-induced currents were negligible. These data must be taken into account when performing optical recording with red fluorescent probes from PsChR2- and ChR2-expressing neurons.

**ДОСТАВКА ГЕНОВ В СРЕДНИЙ И ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ МОЗГ МОЛОДИ КЕТЫ ONCORHYNCHUS KETA С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСНОГО ВЕКТОРА ГИППОКАМПА МЫШИ**

Капустянов И.А.\*, Пущина Е.В., Шамшурина Е.В., Варакин А.А.

Национальный научный центр морской биологии имени А. В. Жирмунского, ДВО РАН, Владивосток, Россия

\*E-mail: [ilyaak9772@gmail.com](mailto:ilyaak9772@gmail.com)

В настоящей работе мы использовали мышинные рекомбинантные аденоассоциированные вирусные векторы (гAAV) с кальциевым индикатором GCaMP6m, которые обычно применяются для дорсального гиппокампа мышей, но ранее не использовались для доставки генов в мозг рыб.

Целью нашей работы было изучить возможность трансдукции гAAV в гиппокампе мышей в клетки головного мозга молоди кеты и последующим определением фенотипа клеток, меченных гAAV, методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). Доставку гена *in vivo* осуществляли внутрочерепной инъекцией вектора, содержащего GCaMP6m-GFP, непосредственно в область мезэнцефалического тегмента молоди (годовалой) кеты, *Oncorhynchus keta*. Встраивание AAV в клетки головного мозга молодь кеты оценивали через 1 неделю после однократного введения вектора. Экспрессию AAV в областях среднего мозга и промежуточного мозга молоди *O. keta* оценивали с помощью КЛСМ с последующим иммуногистохимическим анализом локализации нейрон-специфического кальций-связывающего белка HuCD в сочетании с окрашиванием ядер с помощью DAPI.

Методом КЛСМ показана экспрессия GFP-экспрессирующих (GFP+) клеток, ядер и гранул, экспрессия кальций связывающего белка нейрональной дифференцировки HuCD, а также коэкспрессия GFP и HuCD (GFP+/HuCD+) в диэнцефалоне и в мезэнцефалоне. Наибольшее число GFP+/HuCD+ клеток в передней гипоталамической бухте обусловлено интенсивным anterogradным внутриклеточным транспортом. Наличие большого числа GFP+ и GFP+/HuCD+ клеток в тегменте связано с распространением аденовирусного вектора в результате посттравматических нейрогенных процессов. Наличие минимального количества GFP+ и GFP+/HuCD+ клеток в мезэнцефалической ретикулярной формации обусловлено минимальной плотностью распределения клеток в данной области и ограниченном ретроградном внутриклеточном транспорте в каудальном направлении. Таким образом, проведённые исследования впервые на молоди кеты *O. keta* показали эффективную трансдукцию генов гAAV гиппокампа млекопитающих в клетки мезэнцефалона и диэнцефалона через 1 неделю после однократного введения.

**A CONFOCAL MICROSCOPIC STUDY OF GENE TRANSFER INTO THE  
MESENCEPHALON AND DIENCEPHALON OF JUVENILE CHUM SALMON,  
ONCORHYNCHUS KETA, USING MOUSE ADENO-ASSOCIATED VIRAL VECTORS**

Kapustyanov I.A.\*, Puschina E.V., Shamshurina E.V., Varaksin A.A.  
Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok, Russia  
\*E-mail: [ilyaak9772@gmail.com](mailto:ilyaak9772@gmail.com)

In the present work, we used mouse recombinant adeno-associated viral vectors (rAAV) with a calcium indicator GCaMP6m that are usually applied for the dorsal hippocampus of mice but were not previously used for gene delivery into fish brain.

The aim of our work was to study the feasibility of transduction of rAAV in the mouse hippocampus into brain cells of juvenile chum salmon and subsequent determination of the phenotype of rAAV-labeled cells by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Delivery of the gene in vivo was carried out by intracranial injection of a GCaMP6m-GFP-containing vector directly into the mesencephalic tegmentum region of juvenile (one-year-old) chum salmon, *Oncorhynchus keta*. The incorporation of AAV into the brain cells of juvenile chum salmon was assessed 1 week after a single injection of the vector. AAV expression in the midbrain and diencephalon regions of juvenile *O. keta* was assessed using CLSM followed by immunohistochemical analysis of the localization of the neuron-specific calcium-binding protein HuCD in combination with nuclear staining with DAPI.

The method of CLSM shows the expression of GFP-expressing (GFP+) cells, nuclei and granules, the expression of the calcium-binding protein of neuronal differentiation HuCD, as well as the co-expression of GFP and HuCD (GFP+/HuCD+) in the diencephalon and mesencephalon. The largest number of GFP+/HuCD+ cells in the anterior hypothalamic is due to intense anterograde intracellular transport. The presence of a large number of GFP+ and GFP+/HuCD+ cells in tegmentum is associated with the spread of the adenoviral vector as a result of post-traumatic neurogenic processes. The presence of a minimum number of GFP+ and GFP+/HuCD+ cells in the mesencephalic reticular formation is due to the minimum density of cell distribution in this area and limited retrograde intracellular transport in the caudal direction. Thus, the studies carried out for the first time on juvenile chum salmon *O. keta* showed effective transduction of rAAV mammalian hippocampus genes in mesencephalon and diencephalon cells 1 week after a single injection.

**ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ АКТИВАЦИИ G-БЕЛОК-ЗАВИСИМОГО СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ ХИМЕРНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ**

Карпушев А.В.\*, Чилигина Ю.А.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: akarpushev@yandex.ru*

Одним из перспективных инструментов оптогенетического протезирования сетчатки являются химерные белки, состоящие из двух структурно-функциональных компонентов: светочувствительного домена зрительного пигмента, родопсина или меланопсина, и С-концевого участка метаболитного глутаматного рецептора mGluR6. Такая оптически управляемая белковая конструкция способна активировать Go-белок-зависимый сигнальный каскад, что может быть использовано для превращения ON-биполярных клеток в фоторецепторные.

Исследование эффективности передачи сигнала от химерного рецептора к Go белку выполняется с помощью электрофизиологического скрининга в гетерологической экспрессионной системе, клетках линии НЕК293. В клетках, трансфицированных экспрессионными векторами, содержащими гены светочувствительного химерного рецептора или порообразующих субъединиц G-белок-активируемого калиевого канала внутреннего выпрямления Kir3.1/3.2, реконструируется сигнальный путь свето-зависимой активации калиевых каналов. Оценка работы сигнального пути производится путем регистрации ионного тока входящего выпрямления методом локальной фиксации потенциала в конфигурации отведения от целой клетки. Успешно трансфицированные клетки определяются по флюоресценции коэкспрессированного белка iRFP.

В пилотных экспериментах на клетках, трансфицированных плазмидой с геном родопсина, было показано что импульс света длительностью 10 с и длиной волны 520 нм вызывал ток входящего направления с пиковой плотностью  $16.0 \pm 1.3$  пА/пФ при поддерживаемом потенциале  $-80$  мВ. Клетки, трансфицированные плазмидой с геном глутаматного рецептора mGluR6, отвечали генерацией ионного тока входящего направления, пиковой плотностью  $14.1 \pm 2.0$  пА/пФ при перфузии наружным раствором, содержавшим 1мМ глутамата натрия. Таким образом, установлено, что клеточная модель содержит все компоненты необходимые для активации G-белок-зависимого сигнального каскада и тестирования светочувствительных химерных рецепторов.

*Работа поддержана Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2022-296, на создание и развитие научного центра мирового уровня «Павловский центр «Интегративная физиология - медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости».*



**ELECTROPHYSIOLOGICAL TESTING OF G-PROTEIN-DEPENDENT SIGNALING  
CASCADE ACTIVATION BY LIGHT-SENSITIVE CHIMERIC RECEPTORS**

Karpushev A.V., Chiligina Yu.A.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St-Petersburg,  
Russia

*E-mail: akarpushev@yandex.ru*

One of the promising tools for retinal optogenetic prosthetics are chimeric proteins consisting of two structural components: the light-sensitive domain of the visual pigment, rhodopsin or melanopsin, and the C-terminal segment of the metabotropic glutamate receptor mGluR6. This optically controlled protein construct is capable of activating the Go-protein-dependent signaling cascade, which can be used to turn ON-bipolar cells into photoreceptor cells.

The signal transduction efficiency from the chimeric receptor to the Go protein is investigated using electrophysiological screening in a heterologous expression system, HEK293 cells. The signaling pathway of light-dependent activation of potassium channels is reconstructed in cells transfected with expression vectors containing genes of the light-sensitive chimeric receptor or pore-forming subunits of the G-protein-activated inward-rectifier potassium channel Kir3.1/3.2. The signal transduction is assessed by recording the inward-rectifier ion current with whole-cell patch clamp technique. Successfully transfected cells are identified by the fluorescence of the coexpressed iRFP protein.

In pilot experiments on cells transfected with a plasmid containing the rhodopsin gene, it was shown that a light pulse of 10 s and 520 nm wavelength induced an inward directional current with a peak density of  $16.0 \pm 1.3$  pA/pF at the holding potential of -80 mV. Cells transfected with a plasmid containing the mGluR6 glutamate receptor gene responded by generating an inward directional ionic current with a peak density of  $14.1 \pm 2.0$  pA/pF when perfused with an external solution containing 1 mM sodium glutamate. Thus, the cell model has been shown to contain all components necessary for the activation of the G-protein-dependent signaling cascade and testing of the light-sensitive chimeric receptors.

Supported by the Ministry of Education and Science of Russia, Grant No. 075-15-2022-296, for the creation and development of the world-class scientific center «Pavlovsk Center «Integrative Physiology to Medicine, High-Tech Healthcare, and Stress Resistance Technologies».

*Supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 21-15-00416).*

**РЕГИСТРАЦИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ *IN VIVO* В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШИ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ БИОСЕНСОРОВ**

Катруха В.А.<sup>1,2</sup>, Храмова Ю.В.<sup>2,1</sup>, Чеботарев А.С.<sup>2,3</sup>, Иванова А.Д.<sup>1</sup>, Мартынов Г.Н.<sup>2,3</sup>,

Ланин А.А.<sup>2,3</sup>, Федотов А.Б.<sup>2,3</sup>, Билан Д.С.<sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Российский квантовый центр, Сколково, Россия

<sup>4</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени

Пирогова, Москва, Россия

\*E-mail: d.s.bilan@gmail.com

Генетически кодируемые биосенсоры позволяют регистрировать динамику изменения некоторых биохимических параметров клетки *in vivo* в режиме реального времени. Установка в черепе животного краниального окна – оптически прозрачного импланта – позволяет детектировать сигнал биосенсора с поверхностных слоев мозга различными методами микроскопии. С использованием биосенсоров, мультифотонной микроскопии и метода фототромбоза сосудов возможно изучать процессы, происходящие в ходе ишемического инсульта.

Мышам линии C57Bl/6 проводили операцию, в ходе которой формировали круглое отверстие в черепе и инъецировали в кору мозга (координаты инъекции: AP: 1; ML –1,5; DV –0,6) аденоассоциированные вирусы 9 серотипа (AAV9), содержащие ген сенсора пероксида водорода hUPer7 с митохондриальной локализацией под нейрональным промотором (hSyn1-H7-mito). Контрольной группе мышей инъекцию не проводили. Далее проводили установку покровного стекла и металлического адаптера для фиксации мыши в микроскопе. Спустя 3 недели после установки краниального окна, исследовали методом мультифотонной микроскопии, области коры мозга, экспрессирующей биосенсор. На контрольных животных проводили адаптацию методики моделирования ишемического инсульта методом фототромбоза с использованием красителя бенгальского розового. После чего применяли эту методику на животных, чьи нейроны экспрессировали сенсор. Ишемическое повреждение подтвердили с помощью окраски трифенил-2,3,5-тетразолия хлоридом (ТТХ).

Использование описанных технологий позволило зарегистрировать флуоресценцию биосенсора hSyn1-H7-mito в отдельных нейронах на глубине до 550 нм. Использование мультифотонной микроскопии позволило визуализировать сенсор на субклеточном уровне. В режиме реального времени у обеих групп мышей был проведен и зарегистрирован фототромбоз поверхностных сосудов коры мозга, подтвержденный при окраске ТТХ.

Мы разработали метод установки краниальных окон и провели регистрацию флуоресценции генетически кодируемого биосенсора hUPer7 в коре головного мозга мышей, а также адаптировали методику проведения фототромботического инсульта. При использовании различных биосенсоров, эта технология позволит наблюдать за течением инсульта.

**IN VIVO REGISTRATION OF BIOCHEMICAL PROCESSES IN THE MOUSE  
CEREBRAL CORTEX USING GENETICALLY ENCODED BIOSENSORS**

Katrukha V.A.<sup>1,2</sup>, Khramova Y.V.<sup>2,1</sup>, Chebotarev A.S.<sup>2,3</sup>, Ivanova A.D.<sup>1</sup>, Martynov G.N.<sup>2,3</sup>,  
Lanin A.A.<sup>2,3</sup>, Fedotov A.B.<sup>2,3</sup>, Bilan D.S.<sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow

<sup>3</sup> Russian Quantum Center, Skolkovo

<sup>4</sup> Pirogov Russian National Medical Research University, Moscow

\*E-mail: [d.s.bilan@gmail.com](mailto:d.s.bilan@gmail.com)

Genetically encoded biosensors allow the registration of the dynamics of changes in some biochemical parameters of a cell in vivo in real-time. Installation of a cranial window, an optically transparent implant in the animal skull, allows the detection of biosensor signal from the surface layers of the brain by various microscopy methods. Using biosensors, multiphoton microscopy and the vascular photothrombosis method it is possible to study the processes occurring during ischemic stroke.

The operation was performed on C57Bl/6 mice. During the operation, a circular hole was formed in the skull and adenoassociated viruses of serotype 9 (AAV9) containing the hydrogen peroxide sensor gene HyPer7 with mitochondrial localization under the neuronal promoter (hSyn1-H7-mito) were injected (injection coordinates: AP: 1; ML -1.5; DV -0.6) into the brain cortex. We did not perform the injection in the control group of mice. Next, we installed a coverslip, as well as a metal adapter to fix the mouse in the microscope. Three weeks after the installation of the cranial window, we examined by multiphoton microscopy, the areas of the brain cortex expressing the biosensor. In a group of control animals, we performed an adaptation of the technique to simulate ischemic stroke by photothrombosis using Bengal Rose dye. We then applied this technique to animals whose neurons expressed the sensor. The ischemic lesion was confirmed using triphenyl-2,3,5-tetrazolium chloride (TTC) staining.

The use of the techniques we described made it possible to record the fluorescence of the hSyn1-H7-mito biosensor in individual neurons at depths of up to 550 nm. The use of multiphoton microscopy made it possible to visualize the sensor at the subcellular level. Real-time photothrombosis of cortical vessels was performed and recorded in both groups of mice, confirmed by TTC staining.

We developed a method to install cranial windows and recorded the fluorescence of the genetically encoded HyPer7 biosensor in the cortex of mice and adapted a technique for photothrombotic stroke. Using different biosensors, this technology will allow the monitoring of the development of stroke.

**МЕТОДИКА ВОСПРОИЗВОДИМОЙ СЕНСОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ  
БОДРСТВУЮЩЕЙ МЫШИ, РЕГИСТРАЦИЯ ОТВЕТА В КОРЕ МОЗГА МЕТОДОМ  
ШИРОКОПОЛЬНОЙ ОПТИЧЕСКОЙ НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИИ**

Кислухина Е.Н.<sup>1,\*</sup>, Лизунова Н.В.<sup>1,2</sup>, Шарипов Р.Р.<sup>3</sup>, Сурин А.М.<sup>1,3</sup>, Бакаева З.В.<sup>1</sup>,  
Пинелис В.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

\*E-mail: Kislukhina.EN@ya.ru

Современные нейробиологические подходы позволяют проводить широкий спектр исследований на бодрствующих животных. Различные методы, такие как двух- и трех-фотонная микроскопия, широкополная оптическая нейровизуализация (ШОН), можно сочетать с системами фиксации положения головы при обеспечении иллюзии свободного передвижения. Многие научные задачи требуют многократной подачи одинакового сенсорного стимула, что сложно реализуемо на активно движущемся животном и требует подбора амплитуды стимула и протокола стимуляции.

В работе были использованы мыши линии C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J (Jackson Laboratory), экспрессирующие в нейронах GCaMP6f – флуоресцентный сенсор ионов  $Ca^{2+}$ . Животным в возрасте 2,5 месяцев проводили операцию «краниальное окно», таким образом, активность больших полушарий можно было регистрировать сквозь прозрачный череп. Съемку проводили методом ШОН в режиме флуоресценции (измерение  $[Ca^{2+}]_i$ : возбуждение 470 нм, регистрация эмиссии  $520 \pm 20$  нм) одновременно со съемкой в режиме отраженного света (гемодинамика: светорассеяние 505 нм) с частотой 20 Гц для каждого из двух сигналов.

Была разработана методика воспроизводимой унилатеральной зрительной и тактильной стимуляции. Для тактильной стимуляции использовали слабый электрический ток амплитудой 30 мкА, 60 мкА и 90 мкА (варьировала ввиду индивидуальной чувствительности животных). Мышам были имплантированы кольца из медицинской стали (толщина 0,41 мм,  $d_{\text{внутр}} = 1,1$  мм), закрепленные под ахиллово сухожилие. Провода крепили к кольцам при помощи серфинов только на время записи.

Для зрительной стимуляции белый светодиод закрепляли непосредственно на штативе для головы. Абажур препятствовал попаданию света в поле зрения второго глаза. Была подобрана амплитуда тока 125 мкА, что соответствует около 5% максимальной яркости использованного светодиода.

Были протестированы протоколы непрерывной стимуляции (4 с), импульсной стимуляции (200 мс x 4; 1Гц) и частой стимуляции (100 мс x 20; 5 Гц) раз в 20 с (всего 10 пачек стимулов).

Каждый импульс стимула на 150–200 мс вызывал повышение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  в контралатеральной относительно стимула первичной зрительной или сенсорной коре соответственно. К 250 мс сигнал распространялся на симметричную зону во втором полушарии, области активации расширялись, и затем происходила передача сигнала на ретроспленальную кору. От 1 к 4 с стимуляции наблюдалось увеличение притока крови к активированным областям.

**THE METHOD FOR REPRODUCIBLE SENSORY STIMULATION IN AWAKE MOUSE,  
AND CORRESPONDING RESPONSES IN THE CORTEX RECORDED BY WIDE-FIELD  
OPTICAL MAPPING**

Kislukhina E.N.<sup>1,\*</sup>, Lizunova N.V.<sup>1,2</sup>, Sharipov R.R.<sup>3</sup>, Surin A.M.<sup>1,3</sup>, Bakaeva Z.V.<sup>1</sup>,  
Pinelis V.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Center for Children's Health Federal state autonomous  
institution of the Russian Federation Ministry of Health, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute Of General Pathology And Pathophysiology, Moscow, Russia

\*E-mail: Kislukhina.EN@ya.ru

A wide range of studies on awake animals become possible due to modern neurobiology approaches. Various methods, such as two- and three-photon microscopy, wide-field optical mapping (WFOM), can be combined with head fixation systems with the illusion of free movement. Many scientific tasks require repeated delivery of the unified sensory stimulus, which is difficult to implement on an actively moving animal. This requires scrupulous selection of stimulus amplitude, and a stimulation protocol.

C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J mice (Jackson Laboratory), which express GCaMP6f, a fluorescent  $Ca^{2+}$  ion sensor in neurons, were used in this work. Animals at the age of 2.5 months underwent a "cranial window" operation, so the activity of the cortex could be recorded through a transparent skull. Recordings was carried out by the WFOM method in the fluorescence mode ( $[Ca^{2+}]_i$  measurement: excitation 470 nm, emission registration  $520 \pm 20$  nm) and in the reflected light mode (hemodynamics: light scattering 505 nm) simultaneously at a frequency of 20 Hz for each of the two signals.

A technique for reproducible unilateral visual and tactile stimulation was developed. For tactile stimulation, a weak electric current with an amplitude of 30  $\mu A$ , 60  $\mu A$ , and 90  $\mu A$  was used (it varied due to the individual sensitivity of the animals). Medical steel rings were implanted (thickness 0.41 mm,  $d_{int} = 1.1$  mm) under the Achilles tendon. The wires were attached to the rings with serfins only at a time of recording.

For visual stimulation, a white LED was mounted directly on a head stand. The lampshade prevented light from entering the field of view of the second eye. A current amplitude of 125  $\mu A$  was selected, which corresponds to about 5% of the maximum brightness of the LED used.

The following stimulation protocols were tested: continuous stimulation (4 s), pulsed stimulation (200 ms x 4; 1 Hz) and frequent stimulation (100 ms x 20; 5 Hz) with stimuli every 20 s, 10 stimuli packs total.

In these stimulation protocols an increase in the intracellular concentration of  $Ca^{2+}$  was caused at 150–200 ms in the contralateral primary visual or sensory cortex, respectively. By 250 ms, the signal propagated to the symmetric zone in the second hemisphere, the activation areas expanded, and then the signal was transmitted to the retrosplenial cortex. From 1 to 4 s of stimulation, there was an increase in blood flow in the activated areas.

## ВКУСОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ НАСЕКОМЫХ В КАЧЕСТВЕ ХЕМОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИНСТРУМЕНТА В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Колесов Д.В.<sup>4,\*</sup>, Иванова В.О.<sup>2</sup>, Соколинская Е.Л.<sup>4</sup>, Калинина А.П.<sup>4</sup>, Беялов К.И.<sup>3</sup>, Балабан П.М.<sup>2</sup>, Лукьянов К.А.<sup>1</sup>, Никитин Е.С.<sup>2</sup>, Богданов А.М.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>4</sup> Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

\*E-mail: [kolesov14@inbox.ru](mailto:kolesov14@inbox.ru)

Одно из направлений хемогенетики – это управление активностью электрически возбудимых клеток, таких как нейроны, кардиомиоциты, бета-клетки поджелудочной железы. Однако широко используемые на данный момент хемогенетические инструменты не лишены недостатков. Так, и семейство метаботропных рецепторов DREADD, и лиганд-зависимые катионные каналы группы PSAM активируются узким спектром синтетических лигандов с неясным механизмом прохождения гематоэнцефалического барьера. Это обстоятельство снижает их ценность как молекулярного инструмента для многоканальной (т.е. одновременной и независимой) стимуляции нескольких клеточных популяций *in vivo*.

В настоящей работе мы предлагаем использовать вкусовые рецепторы насекомых (группы DmGr43-like) в качестве многоканального хемогенетического инструмента. Эти рецепторы, являющиеся катион-неселективными ионными каналами, имеют десятки высоко специфичных лигандов, потенциально позволяющих в условиях гетерологической экспрессии управлять отдельными субпопуляциями клеток независимо друг от друга.

Для демонстрации возможности использования рецепторов насекомых в качестве хемогенетического инструмента мы выбрали три рецептора клады DmGr43-like с разной специфичностью: VmGr9 (лиганд - фруктоза), VmGr10 (лиганд - инозитол), TcGr20 (лиганд - маннитол). Нами была осуществлена экспрессия всех трех рецепторов в клетках Нек293 и показана их мембранная локализация. Было продемонстрировано, что клетки, экспрессирующие данные рецепторы демонстрируют строго специфический ответ на свой лиганд и не реагируют на добавление лигандов других рецепторов.

На следующем этапе исследования мы экспрессировали VmGr9, VmGr10 и TcGr20 в электровозбудимых клетках мыши – нейронах и кардиомиоцитах. С помощью метода current clamp мы зарегистрировали потенциал действия в ответ на добавление соответствующих лигандов к нейронам. Для проверки работоспособности рецепторов в кардиомиоцитах мыши был применен кальциевый сенсор GCaMP6s: все рецепторы реагировали на добавление своего специфического лиганда и не отвечали на остальные.

Таким образом, нами была продемонстрирована принципиальная возможность использования вкусовых рецепторов насекомых VmGr9, VmGr10 и TcGr20 в качестве хемогенетического инструмента для управления активностью электровозбудимых клеток млекопитающих.

## INSECT GUSTATORY RECEPTORS AS A CHEMOGENETIC TOOL IN MAMMALIAN CELLS

Kolesov D.V.<sup>4,\*</sup>, Ivanova V.O.<sup>2</sup>, Sokolinskaya E.L.<sup>4</sup>, Kalinina A.P.<sup>4</sup>, Belyalov K.I.<sup>3</sup>,  
Balaban P.M.<sup>2</sup>, Lukyanov K.A.<sup>1</sup>, Nikitin E.S.<sup>2</sup>, Bogdanov A.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, RAS, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

\*E-mail: kolesov14@inbox.ru

Manipulating the activity of electrically excitable cells, such as neurons, cardiomyocytes, and pancreatic beta cells, represents a major direction of chemogenetics. However, there are obvious limitations characteristic of the currently used chemogenetic tools. Thus, both a family of DREADD metabotropic receptors and the ligand gated cation channels belonging to a PSAM group are activated by a narrow spectrum of synthetic ligands with unclear mechanism of blood-brain barrier crossing. This fact reduces their value as a molecular tool for multichannel (i.e., simultaneous and independent) stimulation of several cell populations *in vivo*.

In the present work, we propose to use insect taste receptors (DmGr43-like group) as a multichannel chemogenetic tool. These receptors, which are nonselective cation channels, have dozens of highly specific ligands, potentially allowing independent control of individual cell subpopulations under heterologous expression conditions.

To demonstrate the possibility of using insect receptors as a chemogenetic tool, we selected three DmGr43-like clade receptors with different specificities: BmGr9 (ligand - fructose), BmGr10 (ligand - inositol), and TcGr20 (ligand - mannitol). We expressed all three receptors in Hek293 cells and showed their membrane localization. It was clearly demonstrated that cells expressing these receptors show a highly specific response to their ligands and do not respond to the ligands of 'sister' receptors.

In the next step of our study, we expressed BmGr9, BmGr10 and TcGr20 in electrically excitable murine cells - neurons and cardiomyocytes. Using the current clamp technique, we recorded the action potential in response to the addition of the corresponding ligands to the neurons. The GCamp6s calcium sensor was used to test receptor operability in murine cardiomyocytes: all receptors responded to the addition of their specific ligand and did not respond to the others.

We thus provided a proof-of-concept regarding application of the insect gustatory receptors BmGr9, BmGr10 and TcGr20 as a chemogenetic tool for controlling the activity of electrically excitable mammalian cells.

## ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЗРЕНИЯ ПРИ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ОПСИНОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В КЛЕТКАХ СЕТЧАТКИ

Колотова Д.Е.<sup>1,\*</sup>, Иджилова О.С.<sup>1</sup>, Смирнова Г.Р.<sup>1</sup>, Островский М.А.<sup>2</sup>, Малышев А.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт Высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

\*E-mail: kolotova.darya@yandex.ru

При дегенеративных заболеваниях сетчатки происходит гибель фоторецепторных клеток и потеря зрения. Существует несколько подходов к восстановлению зрительных функций при таких заболеваниях, одним из которых является осуществление эктопической экспрессии светоактивируемых мембранных белков (опсинов) в нейронах сетчатки. В данной работе мы исследовали опсины животного происхождения в качестве потенциальных инструментов для оптогенетического протезирования сетчатки при их экспрессии в нейронах культур гиппокампа и сетчатки.

Экспрессию опсинов (коротко- и средневолновой опсины колбочек и опсин палочек) в первичных культурах гиппокампа крыс обеспечивали при помощи метода электропорации в суспензии. Для обеспечения эктопической экспрессии опсинов в клетках сетчатки проводилась интравитреальная инъекция вирусных частиц, несущих гены опсинов, в глаза мышей линий C57Black/6, C3H/Cr1 и RD1\_KO. Для оценки функционирования опсинов в нейронах применяли оптическую детекцию транслокации флуоресцентно-меченной  $\gamma$ -субъединицы G-белка (на культурах) и регистрацию методом петч клемп в режиме «целая клетка» (на культурах и препаратах изолированной сетчатки). Восстановление зрения оценивали с помощью поведенческого тестирования в трапециевидном водном лабиринте Морриса.

У нейронов первичной культуры гиппокампа, трансфицированных генами исследуемых опсинов, отсутствовали электрофизиологические ответы на свет, однако была показана активация палочкового опсина с помощью детекции транслокации  $\gamma$ -субъединицы G-белка. При световой стимуляции ганглиозных клеток сетчатки, экспрессирующих коротковолновой опсин колбочек или опсин палочек, наблюдалась их длительная деполяризация.

Было найдено, что вирусная трансдукция сетчатки мышей RD1\_KO вирусом с коротковолновым колбочковым опсином под сильным неспецифическим промотором CAG вызывает выраженную экспрессию опсина в ганглиозных, биполярных и горизонтальных клетках. Тестирование трансдуцированных животных в водном лабиринте Морриса показало, что у них частично восстанавливается зрительная функция. Таким образом, неспецифическую эктопическую экспрессию коротковолнового колбочкового опсина в клетках сетчатки можно рассматривать как потенциальный способ восстановления зрения при заболеваниях, вызывающих патологическое перерождение сетчатки.



## **OPTOGENETIC VISION RESTORATION VIA ECTOPIC EXPRESSION OF ANIMAL OPSINS IN RETINAL CELLS**

Kolotova D.E.<sup>1,\*</sup>, Idzhilova O.S.<sup>1</sup>, Smirnova G.R.<sup>1</sup>, Ostrovsky M.A.<sup>2</sup>, Malyshev A.Yu.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS, Moscow, Russia

*\*E-mail: kolotova.darya@yandex.ru*

Retinal degenerative diseases cause retinal photoreceptor degeneration and vision loss. There are several approaches to restoring visual functions in such diseases. One approach is ectopic expression of light-activated membrane proteins (opsins) in retinal neurons. In our project, we investigated animal opsins as potential tools for optogenetic vision restoration via their expression in hippocampal neurons and retinal cells.

The expression of opsins (short- and medium-wavelength cone opsins and rod opsin) in primary rat hippocampus neurons was achieved using electroporation of cells in suspension. To ensure ectopic expression of opsins in retinal cells, C57Black/6, C3H/Crl and RD1\_KO mice were injected intravitreally with viral particles carrying genes of opsins. Optical detection of the translocation of the fluorescently labeled G protein gamma subunit (on cultures) and whole-cell patch-clamp (on cultures and on isolated retina) were used to assess the activity of opsins in neurons. Vision restoration was assessed using behavioral testing in the trapezoid Morris water maze.

Primary hippocampal neurons transfected by the genes of the studied opsins showed no electrophysiological responses to light. Nevertheless, rod opsin activation in such neurons was demonstrated by detecting the G protein gamma subunit translocation. Light stimulation of retinal ganglion cells expressing short-wavelength cone opsin or rod opsin led to prolonged cell depolarization.

We found that viral transduction of the retina in RD1\_KO mice with short-wavelength cone opsin under a strong non-specific CAG promoter causes pronounced opsin expression in ganglion, bipolar, and horizontal cells. Testing of the transduced animals in the Morris water maze showed that they partially recovered visual function. Thus, nonspecific ectopic expression of short-wavelength cone opsin in retinal cells can be considered as a potential way to restore vision in diseases that cause retinal degeneration.

**ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ СЕНСОРЫ СЕМЕЙСТВА НУРОСРАТЕС ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ (ПСЕВДО)ГИПОГАЛОГЕННЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ**

Костюк А.И.<sup>1,2,3,\*</sup>, Тосунян М.-А.<sup>4,5,6</sup>, Раевский Р.И.<sup>1</sup>, Панова А.С.<sup>1,2,3</sup>, Сергеева А.Д.<sup>1,7</sup>, Янушкевич С.В.<sup>1,8</sup>, Баранов М.С.<sup>1,9</sup>, Мессенс Й.<sup>4,5,6</sup>, Белоусов В.В.<sup>1,2,3,10,11</sup>, Билан Д.С.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия; <sup>2</sup> Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия; <sup>3</sup> Лаборатория экспериментальной онкологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия; <sup>4</sup> VIB-VUB Center for Structural Biology, Брюссель, Бельгия; <sup>5</sup> Brussels Center for Redox Biology, Брюссель, Бельгия; <sup>6</sup> Structural Biology Brussels, Vrije Universiteit Brussel, Брюссель, Бельгия; <sup>7</sup> Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; <sup>8</sup> Ягеллонский Университет, Факультет Биохимии, Биофизики и Биотехнологии, Краков, Польша; <sup>9</sup> НИЛ химии лекарственных субстанций, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия; <sup>10</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва, Россия; <sup>11</sup> Institute for Cardiovascular Physiology, Georg August University Göttingen, Геттинген, Германия

\*E-mail: alexander.kostyuk@inbox.ru

(Псевдо)гипогалогенные кислоты представляют собой класс высокореакционных молекул, которые возникают под действием гемовых пероксидаз позвоночных и служат для борьбы с патогенными микроорганизмами. Однако, в тех случаях, когда их синтез выходит из-под контроля, они повреждают собственные ткани организма и вносят существенный вклад в развитие как острого, так и хронического воспаления. До сих пор в литературе не были описаны многие аспекты окислительного стресса, вызываемого обсуждаемыми соединениями, а конкретные молекулярные механизмы, которые лежат в основе их токсических эффектов, остаются неясными. В первую очередь подобное положение дел связано с тем, что традиционные аналитические методы по измерению (псевдо)гипогалогенных кислот, к которым относятся хромогенные красители, а также детекция специфичных маркеров, не способны обеспечить желаемую чувствительность и пространственно-временное разрешение.

Для преодоления описанной проблемы наш коллектив разработал генетически кодируемый сенсор, Нуросратес, который не подвержен перечисленным недостаткам. Нуросратес был получен путем интеграции кругового пермутанта желтого флуоресцентного белка в область подвижной петли транскрипционного репрессора NsmR. В присутствии всех (псевдо)гипогалогенных кислот, а также их реакционноспособных производных, инструмент демонстрирует обратимый радиометрический ответ с максимальной амплитудой около 2 раз. Исследования кинетических свойств сенсора показали, что он обладает необычно высокой чувствительностью к галаминам ( $\sim 6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), которые, по всей видимости, выступают его физиологическими мишенями. Нуросратес характеризуется высокой селективностью в отношении целевых аналитов за исключением некоторых артефактов, возникающих под действием пероксинитрита. Нам также удалось расшифровать пространственную структуру сенсора, что проливает свет не только на механизм его функционирования, но и других индикаторов со схожим строением. Нуросратес подходит для решения широкого круга исследовательских задач с вовлечением модельных систем разного уровня сложности. В частности, с его помощью мы визуализировали редокс-стресс в живых бактериях, фагоцитируемых первичными нейтрофилами человека, а также в тканях *Danio rerio*, подверженных воспалению. На текущий момент наши исследования сосредоточены на получении новых версий инструмента с оптимизированными параметрами. Например, нам удалось создать ряд конструкций с увеличенной (вплоть до 5–6 раз) амплитудой ответа.

**GENETICALLY ENCODED SENSORS FROM HYPOCRATES FAMILY FOR VISUALIZATION OF (PSEUDO)HYPOHALOUS ACIDS AND THEIR DERIVATIVES**

Kostyuk A.I.<sup>1,2,3,\*</sup>, Tossounian M.-A.<sup>4,5,6</sup>, Raevskii R.I.<sup>1</sup>, Panova A.S.<sup>1,2,3</sup>, Sergeeva A.D.<sup>1,7</sup>, Yanushkevich S.V.<sup>1,8</sup>, Baranov M.S.<sup>1,9</sup>, Messens J.<sup>4,5,6</sup>, Belousov V.V.<sup>1,2,3,10,11</sup>, Bilan D.S.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia; <sup>2</sup> Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia; <sup>3</sup> Laboratory of Experimental Oncology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia; <sup>4</sup> VIB-VUB Center for Structural Biology, Vlaams Instituut voor Biotechnologie, Brussels, Belgium; <sup>5</sup> Brussels Center for Redox Biology, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium; <sup>6</sup> Structural Biology Brussels, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium; <sup>7</sup> Biological Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; <sup>8</sup> Jagiellonian University, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Kraków, Poland; <sup>9</sup> Laboratory of Medicinal Substances Chemistry, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia; <sup>10</sup> Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia; <sup>11</sup> Institute for Cardiovascular Physiology, Georg August University Göttingen, Göttingen, Germany.

\*E-mail: alexander.kostyuk@inbox.ru

(Pseudo)hypohalous acids are highly reactive molecules that emerge under the action of vertebrate heme peroxidases and serve to confront pathogenic microorganisms. However, when their synthesis gets out of control, they damage the host tissues and make contribution to the development of chronic and acute inflammation. Up to now, many aspects of oxidative stress caused by these compounds have not been described in literature, and exact molecular mechanisms underlying their toxic effects remain unclear. The main reason for this situation is that traditional analytical methods for (pseudo)hypohalous acids measurement, which include chromogenic dyes and detection of specific markers, are not capable of providing the desired sensitivity and spatiotemporal resolution.

To overcome the described problems our team has developed a genetically encoded sensor, Hypocrates, which is not prone to such drawbacks. Hypocrates was constructed by integrating circularly permuted yellow fluorescent protein into the flexible loop of transcription repressor NemR. All (pseudo)hypohalous acids and their reactive metabolites trigger reversible ratiometric response of the instrument with the maximum amplitude of two times. Kinetic experiments revealed that the sensor demonstrates an unusually high sensitivity towards halamines ( $\sim 6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), which apparently are its physiological targets. Hypocrates is highly selective for the specific analytes, with the exception of some peroxynitrite-related artifacts. We also managed to decipher the spatial structure of the sensor, which sheds light not only on the mechanism of its functioning, but of other indicators with similar architecture. Hypocrates is suitable for achieving various research goals with implementation of model systems of different complexity. In particular, we used it to visualize redox stress in live bacteria phagocytosed by primary human neutrophils, as well as in *Danio rerio* inflamed tissues. Our current investigation is focused on the development of new versions of the instrument with optimized parameters. Thus, we obtained a number of constructs with enhanced response amplitude (up to 5-6 times).

## РЕДОКС-БИОСЕНСОРЫ В МОДЕЛЯХ *IN VIVO*

Котова Д.А.<sup>1</sup>, Иванова А.Д.<sup>1</sup>, Костюк А.И.<sup>1,2</sup>, Раевский Р.И.<sup>1</sup>, Кельмансон И.В.<sup>1</sup>, Панова А.С.<sup>1</sup>, Сергеева А.Д.<sup>1,3</sup>, Храмова Ю.В.<sup>3,1</sup>, Катруха В.А.<sup>1,3</sup>, Трифонова А.П.<sup>1</sup>, Судоплатов М.А.<sup>1</sup>, Чебаненко В.В.<sup>3,1</sup>, Почечуев М.С.<sup>3</sup>, Чеботарев А.С.<sup>3,4</sup>, Ланин А.А.<sup>3,4</sup>, Федотов И.В.<sup>3,4</sup>, Федотов А.Б.<sup>3,4</sup>, Белоусов В.В.<sup>1,2,5</sup>, Билан Д.С.<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии. им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия; <sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия; <sup>3</sup> Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; <sup>4</sup> Российский Квантовый Центр, Сколково, Москва, Россия; <sup>5</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Федеральное медико-биологическое Агентство, Москва, Россия

\*E-mail: d.s.bilan@gmail.com

Генетически кодируемые биосенсоры на основе флуоресцентных белков используют в современных исследованиях в области биологии и медицины для регистрации динамики различных биологических процессов. Окислительно-восстановительные (далее редокс-) реакции происходят в клетках как в норме, так и при развитии различных патологических состояний. Изучение динамики реакций с участием короткоживущих соединений с высокой реакционной способностью в живых клеточных системах *in vivo* стало возможно благодаря появлению редокс-биосенсоров. Недавними разработками нашей команды являются биосенсор Hucocrates для визуализации гипогалогенного стресса (НОС1, НОВr, НОСCN и их производные, например, хлорамины) и биосенсор Perslc для визуализации полисульфидов. Свойства данных биосенсоров детально охарактеризованы *in vitro*, мы продемонстрировали их успешное применение в различных моделях *in vivo*. Биосенсоры открывают новые возможности для исследований сложных биологических процессов. Например, ишемический инсульт головного мозга сопровождается острыми изменениями метаболизма и сигналинга клеток тканей уже с первых секунд после остановки кровоснабжения. В патогенезе задействованы различные типы клеток и тканей, поэтому воссоздать такие условия в системах *in vitro* невозможно. Мы разработали подход на основе генетически кодируемых биосенсоров и оптоволоконного интерфейса, что позволяет регистрировать динамику биохимических процессов в ишемизированной ткани *in vivo* с момента окклюзии артерии. Применяя данную технологию, мы выявили динамику некоторых редокс-событий и ацидоза в острой фазе инсульта, а также в последующие несколько суток. Мы сравнили динамику продукции пероксида водорода в нейронах и астроцитах, установив, что именно астроциты отличаются большей генерацией пероксида водорода в области ишемии. Мы также показали, что гипергликемия не влияет на динамику пероксида водорода при развитии ишемического инсульта, однако усугубляет последствия в виде большего повреждения мозга. При развитии такого сложного заболевания как инсульт могут быть задействованы разные структуры мозга, в тканях которых динамика патологических процессов может отличаться. Имплантируя оптические волокна в разные координаты мозга, мы сравнили, как протекает динамика ацидоза в центральной области ишемического повреждения, а также в зоне пенумбры. Zebrafish *Danio rerio* приобретает все большую популярность в мире в качестве модельного объекта для *in vivo* исследований, в том числе для изучения биохимических процессов, лежащих в основе различных заболеваний. Мы также применяем разрабатываемые биосенсоры в тканях *D.rerio* для исследования воспалительных реакций. Созданная платформа исследования с применением генетически кодируемых биосенсоров может быть применена для реализации широкого спектра задач в исследованиях *in vivo*.

При поддержке гранта РФФ 22-15-00299.

## REDOX BIOSENSORS FOR *IN VIVO* MODELS

Kotova D.A.<sup>1</sup>, Ivanova A.D.<sup>1</sup>, Kostyuk A.I.<sup>1,2</sup>, Raevskii R.I.<sup>1</sup>, Kelmanson I.V.<sup>1</sup>, Panova A.S.<sup>1</sup>, Sergeeva A.D.<sup>1,3</sup>, Khramova Y.V.<sup>3,1</sup>, Katrukha V.A.<sup>1,3</sup>, Trifonova A.P.<sup>1</sup>, Sudoplatov M.A.<sup>1</sup>, Chebanenko V.V.<sup>3,1</sup>, Pochechuev M.S.<sup>3</sup>, Chebotarev A.S.<sup>3,4</sup>, Lanin A.A.<sup>3,4</sup>, Fedotov I.V.<sup>3,4</sup>, Fedotov A.B.<sup>3,4</sup>, Belousov V.V.<sup>1,2,5</sup>, Bilan D.S.<sup>1,2,\*</sup>  
<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia; <sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia; <sup>3</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; <sup>4</sup>Russian Quantum Center, Skolkovo, Moscow Region, Russia; <sup>5</sup>Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia  
\*E-mail: d.s.bilan@gmail.com

Genetically encoded biosensors based on fluorescent proteins are used in modern research in biology and medicine to record the dynamics of various biological processes. Redox reactions occur in cells both in normal conditions and during the development of various pathological conditions. The study of the dynamics of reactions involving short-lived highly reactive compounds *in vivo* has become possible due to the development of redox biosensors. Recent developments by our team include Hypocrates biosensor for hypohalous stress imaging (HOCl, HOBr, HOSCN and their derivatives such as chloramines) and Perslc biosensor for polysulfide imaging. The properties of these biosensors have been characterized in detail *in vitro*, and we have demonstrated their successful application in various *in vivo* models.

Biosensors open up new possibilities for studying complex biological processes. For example, an ischemic stroke of the brain is accompanied by acute changes in the metabolism and signaling of cells from the very first seconds after the blood supply stops. Various types of cells and tissues are involved in pathogenesis; therefore, it is impossible to recreate such conditions in *in vitro* systems. We have developed an approach based on genetically encoded biosensors and a fiber optic interface, which makes it possible to record the dynamics of biochemical processes in ischemic tissue *in vivo* from the moment of arterial occlusion. Using this technology, we revealed the dynamics of some redox events and acidosis in the acute phase of a stroke, as well as in the next few days. We compared the dynamics of hydrogen peroxide production in neurons and astrocytes, establishing that it is astrocytes that are characterized by greater generation of hydrogen peroxide in the ischemic region. We have also shown that hyperglycemia does not affect the dynamics of hydrogen peroxide during the development of ischemic stroke, but exacerbates the consequences in the form of more brain damage. With the development of such a complex disease as a stroke, different brain structures may be involved, in the tissues of which the dynamics of pathological processes may differ. By implanting optical fibers in different coordinates of the brain, we compared how the dynamics of acidosis proceeds in the central area of ischemic damage, as well as in the penumbra zone.

Zebrafish *Danio rerio* is becoming increasingly popular in the world as a model object for *in vivo* research, including the study of biochemical processes underlying various diseases. We are also using developed biosensors in *D. rerio* tissues to study inflammatory responses.

The created research platform using genetically encoded biosensors can be used to implement a wide range of tasks in *in vivo* research.

Supported by RSF grant 22-15-00299.

## НЕЛИНЕЙНО-ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ РЕДОКС-БИОСЕНСОРОВ В ЖИВЫХ ЖИВОТНЫХ

Ланин А.А.<sup>1,2,\*</sup>, Чеботарев А.С.<sup>1,2</sup>, Мартынов Г.Н.<sup>1,2</sup>, Шохина А.Г.<sup>3,4</sup>, Билан Д.С.<sup>3</sup>, Белоусов В.В.<sup>3,4</sup>, Федотов А.Б.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Физический факультет, МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Российский Квантовый Центр, Сколково, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии РАН им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

<sup>4</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва, Россия

\*E-mail: lanin@physics.msu.ru

Широкий пласт работ по мониторингу активных форм кислорода (АФК) *in vivo* с клеточным разрешением был проведен при помощи широкопольной и конфокальной флуоресцентной микроскопии на оптически прозрачных биологических объектах: *Caenorhabditis elegans*, личинках *Danio rerio* и *Xenopus laevis*. Переход на исследование редокс сигналинга у грызунов, более близкой модели человеку, затруднителен из-за сильного рассеяния ткани в оптическом диапазоне. Одним из решений проблемы является вживление световодных зондов, успешно примененный для исследования динамики ацидоза в глубоких слоях коры и хвостом ядре мозга крысы при ишемическом инсульте и реперфузии (Pochechuev M.S., et al., 2022). Субклеточное пространственное разрешение на глубинах до 1 мм в биоткани в перспективе может предоставить двухфотонный опрос сенсоров. Мы в работе обращаем внимание на ряд важных проблем, сопровождающих переход к нелинейно-оптической визуализации редокс сенсоров в живых животных. Мы разработали инструментарий для количественного измерения спектров эффективности двухфотонного возбуждения сенсоров АФК. Это позволило измерить нелинейные свойства ряда сенсоров SyHer3s, HyPer7, HyProcates, для дальнейшего дизайна двухфотонного эксперимента с максимальной яркостью и динамическим диапазоном ответа (Chebotarev A.S., et al., 2021). Предложена схема двухфотонного опроса ратиометрических сенсоров на базе одного лазерного генератора, которая позволяет записывать динамику сигнала, возникающего эндогенным или экзогенным путем (Chebotarev A.S., et al., 2020). Наконец, представлены первые результаты по визуализации сенсоров в гепатоцитах печени и пирамидальных нейронах глубоких слоев коры мозга анестезированной мыши.

*Работа по развитию нелинейно-оптических методов визуализации поддержана грантом РНФ № 22-72-10044.*

**NONLINEAR OPTICAL MICROSCOPY OF REDOX BIOSENSORS *IN VIVO***

Lanin A.A.<sup>1,2,\*</sup>, Chebotarev A.S.<sup>1,2</sup>, Martynov G.N.<sup>1,2</sup>, Shokhina A.G.<sup>3,4</sup>, Bilan D.S.<sup>3</sup>,  
Belousov V.V.<sup>3,4</sup>, Fedotov A.B.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Physics Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Russian Quantum Center, Skolkovo, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

\**E-mail: lanin@physics.msu.ru*

A wide spectrum of works aimed on the *in vivo* monitoring of reactive oxygen species (ROS) with a cellular resolution in optically transparent biological models (*Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio* and *Xenopus laevis* larvae) has been performed using wide-field and confocal fluorescence microscopy. A switch to the study of redox signaling in rodents, a closer model to humans, is difficult because of the strong scattering of the tissue in the optical range. One solution of the problem is the implantation of special optical fibers for excitation and reading the indicators of ROS. This method has been successfully applied to study the dynamics of acidosis in the deep layers of the cortex and caudate nucleus of the rat brain during ischemic stroke and reperfusion (Pochechuev M.S., et al., 2022). Subcellular spatial resolution at depths of up to 1 mm in the biotissues could be provided by two-photon interrogation of fluorescent sensors in perspective. We have developed a toolkit for quantitative measurement of a two-photon excitation efficiency spectrum of ROS sensors. This allowed us to measure the nonlinear properties of a number of sensors SypHer3s, HyPer7, Hypocrates, to further design two-photon experiments with maximum brightness and dynamic response range (Chebotarev A.S., et al., 2021). A scheme for two-photon interrogation of ratiometric sensors based on a single laser oscillator has been proposed, which allows recording the dynamics of the signal arising endogenously or exogenously (Chebotarev A.S., et al., 2020). Finally, the first results on imaging ROS sensors in hepatocytes of the mouse liver and in pyramidal neurons of the anesthetized mouse brain cortex are presented.

*The work on the development of nonlinear optical imaging methods was supported by the Russian Science Foundation with grant No. 22-72-10044.*

## **ИНГИБИРОВАНИЕ ВОДНОГО КАНАЛА AQP4 ВЫЗЫВАЕТ УСИЛЕНИЕ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНОВОЙ ПАТОЛОГИИ В ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС**

Лапшина К.В.\*, Кайсманова М.П., Ханина М.В., Гузеев М.А., Екимова И.В.  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия  
*\*E-mail: ksenia.lapshina@gmail.com*

Известно, что водный канал аквапорин-4 (AQP4) является важным компонентом глимфатической системы, обеспечивающей очистку паренхимы головного мозга от различных метаболитов и амилоидогенных белков. Нарушение функционирования этой системы может способствовать прогрессированию нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Паркинсона (БП). Важную роль в патогенезе БП играет нарушение фолдинга белка  $\alpha$ -синуклеина и его посттрансляционные модификации (в частности, фосфорилирование по Ser129), способствующие агрегации и образованию токсичных олигомеров, вызывающих нейродегенерацию. Цель данного исследования - оценить влияние фармакологического ингибирования AQP4 на развитие  $\alpha$ -синуклеиновой патологии в компактной части черной субстанции (кЧС) в модели доклинической стадии БП у крыс.

Эксперименты выполнены на самцах крыс популяции Вистар. Активность водного канала AQP4 подавляли с помощью ингибитора TGN-020, введенного в боковой желудочек головного мозга. Модель доклинической стадии БП получали с помощью специфического ингибитора протеасом лактацистина (ЛЦ), который вводили билатерально в кЧС. Для оценки динамики  $\alpha$ -синуклеиновой патологии в черной субстанции применяли двойное иммуноочемение с применением антител против  $\alpha$ -синуклеина и тирозингидроксилазы, метод «ловушка на фильтре» и Вестерн-блоттинг.

Установлено, что ЛЦ-модель БП характеризовалась повышением уровня общей формы  $\alpha$ -синуклеина, а также его фосфорилированной по Ser129 и агрегированной форм в черной субстанции. С помощью конфокальной микроскопии выяснено, что ЛЦ вызывал накопление  $\alpha$ -синуклеина в дофаминергических нейронах кЧС. Предварительное введение TGN-020 вызывало значительное усугубление  $\alpha$ -синуклеиновой патологии в ЛЦ-модели БП, проявлявшееся наличием в нейронах кЧС крупных агрегатов  $\alpha$ -синуклеина и увеличением содержания общей, фосфорилированной по Ser129 и агрегированной форм  $\alpha$ -синуклеина в 1.6, 1.3 и 2 раза соответственно по сравнению с действием одного ЛЦ. Выявленное нами усиление ЛЦ-индуцируемой  $\alpha$ -синуклеиновой патологии в кЧС при ингибировании AQP4 может быть результатом ухудшения глимфатического клиренса aberrантного  $\alpha$ -синуклеина и других метаболитов из ткани головного мозга. Полученные данные свидетельствуют о важном вкладе AQP4 в молекулярные механизмы нейропротекции, и могут иметь большое значение для разработки новых подходов превентивной терапии БП.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-25-00607.*



**INHIBITION OF WATER CHANNEL AQP4 AGGRAVATES ALPHA-SYNUCLEIN PATHOLOGY IN SUBSTANTIA NIGRA IN A RAT MODEL OF PARKINSON'S DISEASE**

Lapshina K.V.\*, Kaismanova M. P., Khanina M.V., Ekimova I.V.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg, Russia

\*E-mail: [ksenia.lapshina@gmail.com](mailto:ksenia.lapshina@gmail.com)

The water channel aquaporin4 (AQP4) is known to be an important part of glymphatic system, which provides the clearance of brain parenchyma from various metabolites and amyloidogenic proteins. Its dysfunction can contribute to the progression of neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease (PD). The central role in PD pathogenesis belongs to the misfolding of the  $\alpha$ -synuclein and its post-translational modifications, particularly phosphorylation at Ser129, evoking the formation of toxic oligomers of  $\alpha$ -synuclein and the development of neurodegeneration. Our study was aimed to evaluate the effect of AQP4 inhibition on the development of  $\alpha$ -synuclein pathology in the substantia nigra pars compacta (SNpc) in a rat model of the preclinical stage of PD.

The experiments were carried out on male Wistar rats. Water channel AQP4 was inhibited using the inhibitor TGN-020 injected into the lateral ventricle of the brain. The model of the preclinical stage of PD was reproduced using the proteasome inhibitor lactacystin (LC) injected bilaterally into the SNpc. The  $\alpha$ -synuclein pathology in the substantia nigra was assessed using double immunostaining with antibodies against  $\alpha$ -synuclein and tyrosine hydroxylase, as well as filter trap assay and Western blotting.

In the LC model of PD, we observed an increase in level of the total, phosphorylated by Ser129 and aggregated forms of the  $\alpha$ -synuclein in nigral tissue. Confocal microscopy revealed that LC injections evoked the accumulation of  $\alpha$ -synuclein in dopaminergic neurons of SNpc. The pretreatment with TGN-020 evoked the significant aggravation of  $\alpha$ -synuclein pathology in the LC-model of PD, which was manifested by the accumulation of  $\alpha$ -synuclein aggregates in SNpc and by the increase in the content of the total, Ser129-phosphorylated and aggregated forms of  $\alpha$ -synuclein by 1.6, 1.3 and 2 times respectively compared to LC alone. The aggravation of the LC-induced  $\alpha$ -synuclein pathology in the nigrostriatal system caused by pharmacological inhibition of AQP4 can be a result of the impairment of the glymphatic clearance of aberrant  $\alpha$ -synuclein and other metabolites from brain tissue. Data obtained suggest an important contribution of the AQP4 to the molecular mechanisms of neuroprotection and can be useful for the development of novel preventive therapeutic approaches for PD.

*Supported by the RSF grant № 22-25-00607.*

## ШИРОКОПОЛЬНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИЯ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МЫШЕЙ ПРИ ФОТОИНДУЦИРОВАННОМ ИНСУЛЬТЕ

Лизунова Н.В.<sup>1,2,\*</sup>, Кислухина Е.Н.<sup>1</sup>, Шарипов Р.Р.<sup>3</sup>, Сурин А.М.<sup>1,3</sup>, Горбачева Л.Р.<sup>2,4</sup>, Бакаева З.В.<sup>1</sup>, Пинелис В.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

<sup>4</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва

\*E-mail: natalia.lizunova18@mail.ru

Борьба с последствиями инсульта – актуальная проблема здравоохранения во всем мире. Поврежденные области мозга имеют ограниченные возможности к регенерации и единственным путем восстановления утраченных функций является нейрональная пластичность. С развитием методов визуализации мозга появилась возможность непосредственного наблюдения за перестройкой сетей в мозге. Одним из таких методов является широкополюсная оптическая нейровизуализация (ШОН). ШОН позволяет регистрировать активность нейронов как напрямую, например, посредством оценки кальциевых сигналов, так и косвенно, по регистрации метаболических процессов в мозге. В данной работе изучены возможности ШОН для анализа изменений активности коры мозга, вызванных инсультом.

В экспериментах была использована линия трансгенных мышей, экспрессирующих в нейронах флуоресцентный сенсор  $\text{Ca}^{2+}$  GCaMP6f (JAX stock #025393). Локальный инсульт моделировали при помощи фотоиндуцированного тромбоза (бенгальский розовый(БР) 20 мг/кг, 6,7 мг/мл, в/в; лазер 532 нм, 10 мВт, 10 мин;  $\varnothing = 2$  мм; AP = -1; ML = -2). Активность мозга регистрировали методом ШОН до ФТ, через 3 мин, 24 ч и 7 д после ФТ (кальций: возбуждение 470 нм, эмиссия 530 нм, 20 Гц; гемодинамика: светорассеяние 505 нм, 20 Гц).

Изменения флуоресценции GCaMP6f у контрольных животных, соответствующие нормальной активации нейронов, составляли, в среднем, 11% (максимум 47%) от базового уровня флуоресценции. На первых минутах после индукции инсульта наблюдалось резкое (более, чем на 200%) увеличение уровня флуоресценции сенсора, что можно интерпретировать как кальциевую дизрегуляцию в нейронах очага. В пораженном полушарии у 4 из 9 мышей в период 3-10 мин после окончания засветки лазером была зарегистрирована распространяющаяся кортикальная деполяризация. Анализ главных и независимых компонент позволил выделить кластеры функциональной активности. При этом кластеры кальциевой и гемодинамической активности имели разную структуру. Зоны кальциевой активности у здоровых животных частично совпадают с анатомическими зонами коры. Инсульт вызывает нарушение распределения кластеров и нарушение взаимодействия между зонами коры, как в очаге, так и в удаленных областях.

Таким образом, ШОН позволяет оценивать острые и оставленные эффекты фокального инсульта на кальциевый гомеостаз. Метод полезен для анализа реорганизации функциональных зон коры мозга, а также неинвазивного отслеживания динамики изменения размера очага инсульта.

**WIDE-FIELD OPTICAL MAPPING OF CHANGES IN MICE CEREBRAL CORTEX  
ACTIVITY UNDER PHOTOTHROMBOTIC STROKE**

Lisunova N.V.<sup>1,2\*</sup>, Kislukhina E.N.<sup>1</sup>, Sharipov R.R.<sup>3</sup>, Surin A.M.<sup>1,3</sup>, Gorbacheva L.R.<sup>2,4</sup>,  
Bakaeva Z.V.<sup>1</sup>, Pinelis V.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Center for Children's Health Federal state autonomous  
institution of the Russian Federation Ministry of Health, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of general pathology and pathophysiology, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

\*E-mail: natalia.lisunova18@mail.ru

The struggle with the consequences of stroke is an urgent health problem worldwide. Damaged brain tissue has limited possibilities for regeneration and the only way to restore lost functions is neuronal plasticity. The development of brain imaging techniques provides the opportunity to directly observe the brain networks reorganization. One of such methods is Wide-Field Optical Mapping (WFOM). allows to detect neuronal activity both directly, for example, by evaluating calcium signals, and indirectly, by registering metabolic processes in the brain (Ma et al., 2016). In this paper, the possibilities of WFOM for analyzing changes in the activity of the cerebral cortex caused by stroke are studied.

Transgenic mice expressing calcium fluorescent sensor GCaMP6f in neurons (JAX stock #025393) were used in the experiments. Local stroke was modeled using photoinduced thrombosis (Rose Bengal 20 mg/kg, 6.7 mg/ml, IV; laser 532 nm, 10 MW, 10 min;  $\varnothing = 2$  mm; AP = -1; ML = -2). Brain activity was recorded by WFOM before photothrombotic stroke, 3 min, 24 h and 7 d after (GCaMP6f: excitation 470 nm, emission 530 nm, 20 Hz; hemodynamics: light scattering 505 nm, 20 Hz).

Changes in GCaMP6f fluorescence in control animals corresponding to normal neuronal activation were in average 11% (maximum 47%) from the baseline fluorescence level. In the first minutes after the induction of stroke, a sharp (more than 200% from the baseline) increase in the level of sensor fluorescence was observed, which can be interpreted as calcium dysregulation in the neurons of the damage core. In the affected hemisphere, spreading cortical depolarization was registered in 4 out of 9 mice in the period 3-10 minutes after the end of laser illumination. Principal and independent component analysis allowed us to identify clusters of functional activity. Clusters of calcium and hemodynamic activity had a different structure. Clusters of calcium activity in healthy animals partially coincided with the anatomical cortical zones. Stroke caused disruption of cluster distribution and impairment of interaction between cortical zones, both nearby the damage core and in remote areas.

Thus, WFOM allows us to evaluate the acute and delayed effects of focal stroke on calcium homeostasis. This method is useful for analysis of cortical functional areas reorganization, as well as for non-invasive tracking of changes in stroke core size.

**МУЛЬТИХРОМОФОРНЫЕ ФОТОАКТИВНЫЕ БЕЛКИ ДЛЯ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ**

Максимов Е.Г.

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*\*E-mail: emaksimoff@yandex.ru*

Многие фотосинтетические организмы используют каротиноиды в качестве дополнительных хромофоров в составе пигмент-белковых комплексов, обеспечивающих эффективное поглощение света в сине-зеленой части спектра, регуляцию процессов трансформации энергии и защиту клеточных мембран от фотоповреждения. Исследование принципов модульной организации водорастворимого оранжевого каротиноидного белка цианобактерий позволило нам разработать методы сборки фотоуправляемых сплит-доменных систем и способы доставки каротиноидов в клеточные мембраны. Белок-опосредованная доставка открывает новые возможности для солюбилизации гидрофобных каротиноидов и контролируемого обогащения клеточных мембран природными антиоксидантами, а также позволяет приступить к исследованию на клеточных моделях специфического семейства протонных и натриевых насосов, способных связывать каротиноиды в качестве дополнительного хромофора. В докладе будут раскрыты структурные и функциональные особенности ряда каротиноидных белков и их модификаций, оптимизированных для оптогенетических приложений.

**MULTICHROMOPHORE PHOTOACTIVE PROTEINS FOR OPTOGENETIC APPLICATIONS**

Maksimov E.G.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*\*E-mail: emaksimoff@yandex.ru*

Many photosynthetic organisms use carotenoids as additional chromophores in pigment-protein complexes to ensure efficient light absorption in the blue-green part of the spectrum, regulation of energy transformation and protection of cell membranes from photodamage. The investigation of the principles of modular organization of water-soluble orange carotenoid protein in cyanobacteria allowed us to develop methods for the assembly of photo-controlled split-domain systems and ways to deliver carotenoids into cell membranes. Protein-mediated delivery opens up new opportunities for solubilization of hydrophobic carotenoids, controlled enrichment of cell membranes with natural antioxidants, and allows investigation of a specific family of proton and sodium pumps capable of binding carotenoids as an additional chromophore on cellular models. The report will reveal the structural and functional features of a number of carotenoid proteins and their modifications optimized for optogenetic applications.

## **РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ К СОЗДАНИЮ ХИМЕРНЫХ ОПСИНОВ ДЛЯ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОТЕЗИРОВАНИЯ СЕТЧАТКИ**

Мешалкина Д.А.\*, Ни В.И., Фирсов М.Л.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: [postoronniW@yandex.ru](mailto:postoronniW@yandex.ru)

Пигментный ретинит является широко распространённой генетической причиной слепоты, при этом идентифицировано более 190 различных генов, мутации в которых могут приводить к ней (Daiger et al., 2013). Оптогенетическое протезирование при этом заболевании предполагает универсализацию подхода к восстановлению зрительной функции за счёт придания светочувствительности нейрональным клеткам сетчатки, сохраняющимся после дегенерации фоторецепторных клеток. Из-за того, что данные нейроны сетчатки не имеют элементов морфологии, характерных для фоторецепторных клеток, они не могут обеспечить сравнимую эффективность экспрессии опсинов, и поэтому принципиальной проблемой становится чувствительность протезированной сетчатки. Решение этой проблемы вовлекает несколько задач: 1. сохранение светочувствительности опсина, 2. улучшение сопряжения опсина с каскадом передачи сигнала в протезируемых клетках, 3. увеличение клеточной специфичности экспрессии опсина. Решение первых двух задач требует разработки новых вариантов опсинов на основании существующих, химеризованных с рецепторами, взаимодействующими с Gαо-белковой субъединицей, обеспечивающей передачу метаболического сигнала в биполярных клетках сетчатки. В нашей работе были использованы методы рационального дизайна белковых молекул для создания плазмидных векторов для экспрессии химер родопсина человека и GPCR, взаимодействующих с Gαо. В качестве химерируемого GPCR кроме характерного для биполярных нейронов GRM6 (метаболического глутаматного рецептора) были также взяты HTR1B (рецептор серотонина) и MTR1A (рецептор мелатонина). На основании общности структуры GPCR для создания химер от родопсина были взяты трансмембранные и внеклеточные участки молекулы, а от химерируемых GPCR вторые и третьи цитоплазматические петли и С-конец. Для характеристики свойств полученных химерных опсинов была создана клеточная тест-система на основе клеток SH-SY5Y, экспрессирующая G-белки биполярных нейронов и несущая ген транскрипционного репортера уровня cAMP. Такая тест-система позволяет разнести во времени момент активации химерного опсина светом и момент считывания сигнала красного флуоресцентного белка mRuby2, что позволяет снизить фоновую активацию тестируемого опсина и тест-системы, соответственно. С использованием полученной системы планируется протестировать ряд полученных химерных опсинов и провести их сравнение с родопсином.

*Работа поддержана Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2022-296, на создание и развитие научного центра мирового уровня «Павловский центр «Интегративная физиология - медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости».*

**DEVELOPMENT OF THE NEW APPROACHES FOR CHIMERIC OPSIN  
CONSTRUCTION FOR OPTOGENETIC RETINA PROSTHESIS**

Meshalkina D.A.\*, Ni V.I., Firsov M.L.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg,  
Russia

\*E-mail: [postoronniiW@yandex.ru](mailto:postoronniiW@yandex.ru)

Retinitis pigmentosa is a common genetic cause of blindness, with more than 190 different genes identified that can be mutated (Daiger et al., 2013). Optogenetic prosthetics for this disease provides the universalization of the approach to the restoration of visual function by imparting light sensitivity to neuronal retina cells that persist after degeneration of photoreceptor cells. Due to the fact that these retinal neurons lack morphological elements characteristic of photoreceptor cells, they cannot provide a comparable efficiency of opsin expression, and therefore the sensitivity of the prosthesis retina becomes a fundamental problem. The solution to this problem requires research in several directions: 1. maintaining the photosensitivity of opsin, 2. improving the coupling of opsin to the signal transduction cascade in prosthetic cells, 3. increasing the cell specificity of opsin expression. The first two directions require the development of new variants of opsins based on existing ones chimerized with receptors interacting with the Gao protein subunit, responsible for the transmission of a metabotropic signal in bipolar retinal cells. In our work, methods of rational design of protein molecules were used to obtain plasmid vectors for the expression of chimeras of human rhodopsin and GPCRs interacting with Gao. As a chimerizable GPCRs, in addition to GRM6 (metabotropic glutamate receptor) characteristic of bipolar neurons, HTR1B (serotonin receptor) and MTR1A (melatonin receptor) were also taken. Based on the common structure of all GPCR, to obtain the chimeras transmembrane and extracellular regions of the molecule were taken from rhodopsin, and second and third cytoplasmic loops and the C-terminus were taken from chimerized GPCRs. To characterize the properties of the obtained chimeric opsins, we created a cellular test system based on SH-SY5Y cells, which expresses the G-proteins of bipolar neurons and carries the transcriptional reporter for the cAMP level. Such a test system makes it possible to separate in time the moment of activation of the chimeric opsin by light and the moment of reading the signal from the red fluorescent protein mRuby2, which makes it possible to reduce the background activation of the tested opsin and the test system, respectively. Using the resulting system, it is planned to test a number of obtained chimeric opsins and compare them with rhodopsin.

*Supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, agreement No. 075-15-2022-296, for the creation and development of a world-class scientific center "Pavlov Center "Integrative Physiology - Medicine, High-Tech Healthcare and Stress Resistance Technologies".*

**МОДУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ ЗАПОМИНАНИЯ ПУТЁМ  
СЕЛЕКТИВНОЙ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ АСТРОЦИТОВ  
ГИППОКАМПА МЫШЕЙ ЛИНИИ CD1**

Михайлов И.Г.<sup>1,2,\*</sup>, Авдеева А.Ю.<sup>3</sup>, Шуваев А.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

<sup>2</sup> Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

<sup>3</sup> Институт Физики им. Л.В. Киренского ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

\*E-mail: medw.medwed2015@yandex.ru

Астроциты являются невозбудимыми клетками мозга и, как установлено в последнее время, эффективно модулируют активность нейрональных сетей на разных уровнях ЦНС. В частности, имеются веские основания полагать, что они играют важнейшую роль в процессах формирования памяти за счет взаимодействия с локальными нейронами. Целью исследования является оценка вклада астроцитов в формирование памяти на уровне гиппокампа. Мы предполагаем, что оптогенетическая активация астроцитов приведет к выделению глутрансмиттеров и улучшению запоминания у мышей.

В этом исследовании использовали 12-недельных самок мышей CD-1. Мы вводили AVV GFAP-CatCh(PM)-eYFP (3 мкл) в CA3 зону обоих гиппокампов (AP–2.0 мм; ML±2 мм от брегмы; DV–2.0 мм). Оптостимуляция производилась через 7 дней после введения с помощью светодиода ( $\lambda=480$  нм, 20 мс с частотой 0.1Гц), прикрепленного над зоной инъекции к костям черепа. Уровень запоминания оценивался при проведении поведенческого теста «Fear conditioning» (Adamsky A. et al., 2018).

После 3 дня тестирования часть мышей отбиралась для нарезки живых срезов (Shuvaev A.N. et al., 2022) и дальнейшей записи пВПСР в ответ на TBS. Также часть мышей отбиралась для ИГХ оценки срезов мозга на уровень экспрессии белка-маркера активности нейронов c-Fos.

Экспериментально показано, что оптогенетическая стимуляция астроцитов гиппокампа, экспрессирующих CatCh, усиливает формирование памяти (CatCh hv+=40±7.87%, CatCh hv–=17±5.07%,  $p=0.03$ ). Такие животные запоминают лучше окружающую среду, в которой происходило их обучение днём ранее. Это подтверждается экспрессией большого количества белка-маркера активности нейронов c-Fos (2163.1±19.81/мкм<sup>2</sup>) и (2027.2±28.8/мкм<sup>2</sup>), в срезах мозга мышей групп CatCh hv+ и CatCh hv– соответственно,  $p=0.00037$ . Также полученные данные демонстрируют появление синаптической пластичности в нейронах CA1 зоны гиппокампа (CatCh hv+=148±19.55%, CatCh hv–=64.4±14.86%,  $p=0.01$ ).

Выражаем благодарность проф. С. Каспарову из университета Бристоля (Великобритания) за предоставленные оптогенетические AVV.



**MODULATION OF CELLULAR MEMORY MECHANISMS BY SELECTIVE OPTOGENETIC ACTIVATION OF HIPPOCAMPAL ASTROCYTES IN CD 1 MICE**

Mikhailov I.G.<sup>1,2,\*</sup>, Avdeeva A.Yu.<sup>3</sup>, Shuvaev A.N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

<sup>2</sup> Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

<sup>3</sup> Kirensky Institute of Physics FRC SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

\*E-mail: medw.medwed2015@yandex.ru

Astrocytes are non-excitabile brain cells and have recently been found to effectively modulate neural networks at different levels of the CNS. There are good reasons to believe that they play an important role in the processes of memory formation due to interaction with local neurons. The aim of the study is to evaluate the contribution of astrocytes to memory formation at the hippocampal level. We hypothesize that optogenetic activation of astrocytes will lead to the release of gliotransmitters and improved memory in mice.

This study used 12-week-old female CD-1 mice. We injected AVV GFAP-CatCh(PM)-eYFP (3  $\mu$ l) into the CA3 zone of both hippocampuses (AP–2.0 mm; ML $\pm$ 2 mm from bregma; DV–2.0 mm). Optostimulation was performed 7 days after injection using the LED ( $\lambda$ =480 nm, 20 ms, frequency 0.1Hz) attached to the skull bones above the injection zone. The memory level was assessed during the behavioral test “Fear conditioning” (Adamsky A. et al., 2018 Jun 28).

After 3 days of testing, some mice were selected for cutting live sections (Shuvaev A.N. et al., 2022) and further recording of fEPSP in response to TBS. Also, some mice were selected for IHC evaluation of brain slices for the level of expression of the protein-marker of neuronal activity c-Fos.

Optogenetic stimulation of hippocampal astrocytes expressing CatCh enhances memory formation (CatChhv+=40 $\pm$ 7.87%, CatChhv–=17 $\pm$ 5.07%,  $p$ =0.03). Such animals remember better the environment in which they were trained the day before. This is confirmed by the expression of a large amount of the c-Fos neuron activity marker protein (2163.1 $\pm$ 19.81/ $\mu$ m<sup>2</sup>) и (2027.2 $\pm$ 28.8/ $\mu$ m<sup>2</sup>) in brain sections of mice of the CatChhv+ and CatChhv– groups, respectively,  $p$ =0.00037. Also, the data obtained demonstrate the appearance of synaptic plasticity in the CA1 neurons of the hippocampus zone (CatChhv+=148 $\pm$ 19.55%, CatChhv–=64.4 $\pm$ 14.86%,  $p$ =0.01).

The authors are very grateful to Prof. S. Kasparov from the University of Bristol (Great Britain) for providing optogenetic AVVs.

## **РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМЫХ СЕНСОРОВ КЛЕТОЧНОГО МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА**

Николаев Д.М.<sup>1</sup>, Миронов В.Н.<sup>1</sup>, Панов М.С.<sup>2,3</sup>, Рязанцев М.Н.<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский академический университет РАН им. Ж.И. Алферова,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,  
Санкт-Петербург, Россия

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

Генетически-кодируемые инструменты нашли широкое применение в оптогенетических исследованиях для контроля нейрональной активности и ее визуализации. В данное время для измерения активности нейронов наиболее используемыми инструментами являются кальциевые сенсоры. Альтернативным классом инструментов, которые позволяют напрямую регистрировать изменение мембранного потенциала с высоким временным разрешением, являются потенциал-зависимые сенсоры мембранного потенциала (GEVI), в частности, сенсоры на основе мембранного белка, археородопсина-3 (Arch). Важным направлением исследований в этой области является создание новых GEVI с увеличенной интенсивностью флуоресценции и сдвинутой в длинноволновую область поглощения. Предложенные на данный момент флуоресцентные сенсоры на основе Arch получены методом направленной эволюции. Использование альтернативного подхода, рационального дизайна, ограничивалось отсутствием данных о детальном механизме, определяющем потенциал-зависимую флуоресценцию этих сенсоров.

В данной работе был изучен механизм, определяющий интенсивность флуоресценции одного из наиболее широко используемых классов сенсоров на основе Arch. На основе полученных данных проведен рациональный дизайн новых сенсоров. Полученные белки характеризуются наиболее сдвинутыми в длинноволновую область полосами поглощения по сравнению с известными аналогами, а также квантовыми выходами флуоресценции сравнимыми с наиболее яркими и широко используемыми в оптогенетике сенсорами на основе Arch. В докладе будут рассмотрены существующие сенсоры на основе Arch, будет описан использованный подход к дизайну новых сенсоров и полученные результаты. Также будут рассмотрены подходы, которые могут использоваться для дальнейшей разработки новых сенсоров с улучшенными характеристиками.

*Работа выполнена на средства гранта Российского научного фонда № 20-13-00303, при поддержке Министерства Образования и Науки Российской Федерации (проект FSRM-2023-0005).*

## **DEVELOPMENT OF FLUORESCENT GENETICALLY-ENCODED SENSORS OF CELL MEMBRANE POTENTIAL**

Nikolaev D.M.<sup>1</sup>, Mironov V.N.<sup>1</sup>, Panov M.S.<sup>2,3</sup>, Ryazantsev M.N.<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Nanotechnology Research and Education Centre RAS, Saint Petersburg Academic University, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia

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

Genetically encoded tools have found wide application in optogenetic studies for the control and imaging of neuronal activity. At present, the most widely used tools for measuring the activity of neurons are calcium indicators. An alternative class of instruments that allow direct recording of changes in membrane potential with high temporal resolution are genetically-encoded voltage indicators (GEVIs), in particular, sensors based on the membrane protein, archaerhodopsin-3 (Arch). An important area of research in this field is the development of new GEVIs with increased fluorescence intensity and red-shifted absorption band maxima. The currently proposed Arch-based fluorescent sensors were obtained via a directed evolution approach. The application of an alternative approach, rational design, was limited by the lack of data on the detailed mechanism of voltage-dependent fluorescence of these sensors.

In this work, we studied the mechanism that determines the fluorescence intensity of one of the most widely used classes of Arch-based sensors. Using the obtained data, we performed a rational design of new sensors. The obtained proteins are characterized by the most red-shifted absorption band maxima compared to Arch-based sensors reported to date, as well as fluorescence quantum yields comparable to the brightest and most widely used Arch-based sensors. The report will include the review of existing Arch-based sensors, the description of the approach used for the design of new sensors in our work and the obtained results. The approaches that can be used for further development of new sensors with improved properties will also be considered.

*Supported by Russian Science Foundation (project № 20-13-00303), the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Project FSRM-2023-0005).*

**РАЗРАБОТКА ФОТОУПРАВЛЯЕМЫХ МОДУЛЯТОРОВ ГЛУТАМАТНЫХ ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ AMPA И NMDA ТИПОВ**

Николаев М. В.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: [fmedfstud@gmail.com](mailto:fmedfstud@gmail.com)

Глутаматные ионотропные рецепторы обеспечивают быстрые процессы возбуждения в ЦНС позвоночных, играют важную роль в синаптической пластичности, процессах обучения и памяти, а их гиперактивация сопровождается многими патологическими состояниями. Фотоуправляемые лиганды – это перспективные инструменты для изучения функций глутаматных рецепторов с высочайшим временным и пространственным разрешением. Разработка таких соединений, обладающих высокой активностью, избирательностью и эффектом фотопереключения, является актуальной проблемой нейрофармакологии. Мы синтезировали серию азобензол-содержащих аминов и исследовали их действие на глутаматные ионотропные рецепторы AMPA и NMDA типов в электрофизиологических экспериментах на нейронах мозга крысы (пэтч кламп регистрация агонист-вызванных токов в конфигурации «целая клетка»). Вещество DENAQ (диэтиламин-азобензол-четвертичный аммоний) и его близкие структурные аналоги избирательно угнетали NMDA рецепторы, их действие было светозависимым. Для соединения PurgAQ (пирролидин-азобензол-четвертичный аммоний), наиболее активного в отношении NMDA рецепторов, величины ИК50 в условиях без освещения и в монохроматическом свете составляли 2 и 14 мкМ, соответственно. PurgAQ угнетает NMDA рецепторы не зависимо от концентрации агониста, активности рецепторов, или мембранного потенциала, и поэтому может обеспечить стабильный фотоконтроль глутаматных рецепторов в реальных динамически меняющихся условиях, сопровождающих синаптическую активность. Вещество QAQ (четвертичный аммоний- азобензол- четвертичный аммоний) является светозависимым блокатором ионных каналов кальций-проницаемых AMPA рецепторов. Это открывает перспективы разработки селективных фотоуправляемых блокаторов данного подтипа AMPA рецепторов. Результаты работы демонстрируют принципиально разные возможности контроля глутаматных ионотропных рецепторов с помощью фоточувствительных лигандов за счёт взаимодействия с разными участками рецепторов и важны для дальнейшей разработки новых соединений с высокой активностью и избирательностью действия.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта № 23-24-00481.*

**DEVELOPMENT OF PHOTOCONTROLLED MODULATORS OF GLUTAMATE IONOTROPIC RECEPTORS AMPA AND NMDA TYPES**

Nikolaev M.V.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg, Russia

\*E-mail: [fmedfstud@gmail.com](mailto:fmedfstud@gmail.com)

Glutamate ionotropic receptors provide excitation processes in the CNS of vertebrates, play an important role in synaptic plasticity, learning and memory processes, and their hyperactivation accompanies many pathological conditions. Photocontrolled ligands are promising tools for studying the functions of glutamate receptors with high temporal and spatial resolution. The development of such compounds with high activity, selectivity, and photoswitching effect is an important problem in neuropharmacology. We synthesized a series of azobenzene-containing amines and studied their effect on glutamate ionotropic AMPA and NMDA receptors in electrophysiological experiments on rat brain neurons (whole cell patch clamp recording). Substance DENAQ (diethylamine-azobenzene-quaternary ammonium) and its close structural analogs selectively inhibited NMDA receptors, their action was light-dependent. For the compound PyrAQ (pyrrolidine-azobenzene-quaternary ammonium), which is the most active against NMDA receptors, the IC<sub>50</sub> values under conditions without illumination and in monochromatic light were 2 and 14  $\mu\text{M}$ , respectively. PyrAQ inhibits NMDA receptors regardless of agonist concentration, receptor activity, or membrane potential, and therefore can provide stable photocontrol of glutamate receptors under the real dynamic conditions that accompany synaptic activity. Substance QAQ (quaternary ammonium-azobenzene-quaternary ammonium) is a light-dependent blocker of ion channels of calcium-permeable AMPA receptors. This opens up prospects for the development of selective photocontrolled blockers of this AMPA receptor subtype. The results of this work demonstrate fundamentally different possibilities for controlling glutamate ionotropic receptors using photosensitive ligands due to interaction with different parts of the receptors and are important for the further development of new compounds with high activity and selectivity of action.

*Supported by the Russian Science Foundation within the framework of research project no. 23-24-00481.*

## НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ФОТОПЕРЕКЛЮЧАЕМОГО МЕСТНОГО АНЕСТЕТИКА ЭТЕРКАИНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Ноев А.Н.<sup>1,2,\*</sup>, Сутемьева Ж.А.<sup>1</sup>, Лихобабина Д.А.<sup>1</sup>, Кузнецов Н.Д.<sup>1</sup>, Суворов Н.В.<sup>1</sup>, Морозова Н.Б.<sup>2</sup>, Васильев Ю.Л.<sup>3,4</sup>, Панкратов А.А.<sup>2</sup>, Грин М.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> МИРЭА-Российский технологический университет, Москва, Россия

<sup>2</sup> МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>3</sup> Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия

\*E-mail: [aleksej-noev@yandex.ru](mailto:aleksej-noev@yandex.ru)

Боль является одной из наиболее распространённых причин, снижающих уровень жизни современного человека. Блокаторы потенциал-зависимых натриевых каналов ( $Na_v$ ) являются одними из основных препаратов, способных снижать или полностью купировать болевые ощущения. Данные соединения обладают рядом побочных эффектов, наиболее яркими из которых являются остановка дыхания и сердца. Одним из способов повысить селективность действия блокаторов  $Na_v$  каналов и снизить количество побочных эффектов каналов является использование молекул с управляемой светом биологической активностью в рамках подхода фотофармакологии. На данный момент описаны несколько управляемых светом блокаторов  $Na_v$  каналов, среди которых можно выделить этеркаин, для которого возможность обратимой управляемой светом местной анестезии была продемонстрирована нами *in vivo* (Noev A., et al., 2022).

Целью данной работы являлась разработка новых производных этеркаина и исследование их физико-химических и биологических свойств. Было выделено несколько направлений исследования: получение соединений на основе этеркаина с улучшенной водорастворимостью, термодинамической стабильностью, а также исследование взаимосвязи "структура-активность".

Были получены производные этеркаина с амидным и сложноэфирным линкером между липофильной частью и азот-содержащим фрагментом. Синтез данных производных проводился путём реакции соответствующих amino- и гидроксизобензолов с хлорацетилхлоридом с последующим алкилированием. Было показано, что амидное производное обладает меньшей местноанестетической активностью на модели поверхностной анестезии на роговице глаза кролика. Для увеличения водорастворимости было получено 4-карбоксыпроизводное, так же обладающее местноанестетической активностью. С целью увеличения термодинамической стабильности цис-формы из соответствующих фторанилинов были получены орто-фтор-производные, обладающие увеличенным временем полупревращения цис-транс при сохранении биологического эффекта.

Таким образом, были получены новые производные управляемого светом местного анестетика этеркаина с улучшенными свойствами. Полученные результаты подчёркивают актуальность дальнейших исследований с целью создания фотопереключаемых блокаторов  $Na_v$  каналов с разнообразными физико-химическими и биологическими свойствами, пригодных для клинического использования и/или фундаментальных исследований.

**NEW DERIVATIVES OF PHOTOSWITCHABLE LOCAL ANESTHETIC ETHERCAINE AND THEIR PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES INVESTIGATION**

Noev A.N.<sup>1,2,\*</sup>, Sutemiya Z.A.<sup>1</sup>, Likhobabina D.A.<sup>1</sup>, Kuznetsov N.D.<sup>1</sup>, Suvorov N.V.<sup>1</sup>,  
Morozova N.B.<sup>2</sup>, Vasil'ev Y.L.<sup>3,4</sup>, Pankratov A.A.<sup>2</sup>, Grin M.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MIREA-Russian Technological University, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

<sup>4</sup>Kazan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kazan, Russia

\*E-mail: [aleksei-noev@yandex.ru](mailto:aleksei-noev@yandex.ru)

Pain is one of the most common causes that reduce the standard of living of a modern person. Voltage-gated sodium channel blockers are one of the main pharmacological classes that can reduce or completely stop pain signals transduction in the body. As a rule, Na<sub>v</sub> channel blockers are used as local anesthetics, however, there are also can be used as a treatment for chronic pain with systemic administration of drugs. All of these compounds have a number of side effects, the most striking of which are respiratory and cardiac arrest. One way to increase the selectivity of Na<sub>v</sub> channel blockers and reduce the number of side effects is to use molecules with light-controlled biological activity as a part of the photopharmacology approach. To date, several light-controlled Na<sub>v</sub> channel blockers have been described, among which ethercaine can be distinguished, for which the possibility of reversible *in vivo* light-controlled local anesthesia was demonstrated by us earlier (Noev A., et al., 2022).

The purpose of this work was the development of new derivatives of ethercaine and the study of their physicochemical and biological properties. Several directions of the research were identified: preparation of compounds based on ethercaine with improved water solubility, thermodynamic stability, as well as the study of the structure-activity relationship.

Ethercaine derivatives with an amide and ester linkers between the lipophilic part and the nitrogen-containing fragment were obtained. The synthesis of these derivatives was carried out by the reaction of the corresponding amino- and hydroxy-azobenzenes with chloroacetyl chloride, followed by morpholine alkylation. It has been shown that the amide derivative has less local anesthetic activity in a surface anesthesia model on a rabbit's eye cornea. To increase water solubility, the 4-carboxy derivative was obtained, which also has local anesthetic activity. In order to increase the thermodynamic stability of the Z-form, *ortho*-fluoro derivatives were prepared from the corresponding fluoroanilines. Derivatives obtained have increased Z-isomer half-life times while maintaining the biological effect.

Thus, new derivatives of the light-controlled local anesthetic ethercaine with improved properties were prepared and their biological properties were studied on the model of surface anesthesia *in vivo*. The results obtained emphasize the relevance of further development of new photoswitchable Na<sub>v</sub> channel blockers with various physicochemical and biological properties suitable for clinical use and/or fundamental research.

## ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРОТЕЗИРОВАНИЕ СЕТЧАТКИ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ

Островский М.А.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия  
Кафедра молекулярной физиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
*\*E-mail: ostrovsky3535@mail.ru*

Принципиальная возможность оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки человека в настоящее время доказана. В мире ведутся четыре клинических испытания; во всех этих испытаниях используется генно-модифицированный Channelrhodopsin-2 (ChR2). В наиболее успешном испытании (фазы III) использован ChrimsonR-tdTomato, доставленный в ганглиозные клетки с помощью адено-ассоциированного вируса (AAV2/7m8). При этом для световой стимуляции оказалось необходимым создать сложную оптическую систему с камерой, смонтированную в очках (Sahel J-A., et al., 2021). Пациент в результате после обучения смог увидеть предметы, но только при использовании «очков».

На сегодняшний день микробиальные родопсины являются наиболее реальными «инструментами» для оптогенетического протезирования. Однако метаболитные, G-белок-связывающие зрительные родопсины колбочек или палочек представляются наиболее перспективными, поскольку позволяют повысить чувствительность протезированной клетки к свету на один или два порядка и, по всей вероятности, отказаться от «очков».

И ганглиозные, и биполярные клетки дегенеративной сетчатки перспективны для протезирования. Каждый из этих двух вариантов имеет свои функциональные и методические преимущества и недостатки. При этом неселективное протезирование нервных клеток также можно рассматривать как одну из возможностей.

К настоящему времени созданы эффективные технологии доставки генетического материала в клетки сетчатки. Новые серотипы AAV (AAV2/7m8) в комбинации с мощными и компактными промоторами позволяют достичь высокой селективности и эффективности трансдукции выбранного для протезирования типа клеток сетчатки на животных моделях. При этом по-прежнему остаётся актуальной проблемы трансляция технологии оптогенетического протезирования от животных моделей к человеку. По-видимому, в ближайшее время следует ожидать раскрытия результатов клинических испытаний различных вариантов оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки человека, которые будут критичны для определения приоритетов дальнейшего развития этой технологии.



**OPTOGENETIC RETINAL PROSTHETICS: STATE OF THE ART**

Ostrovsky M.A.

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences  
Department of Molecular Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State  
University

*\*E-mail: ostrovsky3535@mail.ru*

The fundamental possibility of optogenetic prosthetics of the degenerative human retina has now been proven. There are four clinical trials in progress worldwide; all of these trials use genetically modified Channelrhodopsin-2 (ChR2). The most successful trial (Phase I/II) used Chrimson R-tdTomato delivered to ganglion cells with adeno-associated virus (AAV2/7m8). At the same time, for light stimulation, it turned out to be necessary to create a complex optical system with a camera mounted in glasses (Sahel J-A., et al., 2021). As a result, after training, the patient was able to see objects, but only when using "glasses".

To date, microbial rhodopsins are the most realistic "tools" for optogenetic prosthetics. However, metabotropic, G-protein-binding visual rhodopsins of cones or rods seem to be the most promising, since they make it possible to increase the sensitivity of the prosthetic cell to light by one or two orders of magnitude and, in all likelihood, to abandon the "glasses".

Both ganglion and bipolar cells of the degenerative retina are promising for prosthetics. Each of these two options has its functional and methodological advantages and disadvantages. At the same time, non-selective prosthetics of nerve cells can also be considered as one of the possibilities.

To date, effective technologies have been created for delivering genetic material to retinal cells. New AAV serotypes (AAV2/7m8) in combination with powerful and compact promoters make it possible to achieve high selectivity and transduction efficiency of the retinal cell type chosen for prosthetics in animal models. At the same time, the problem of translating the technology of optogenetic prosthetics from animal models to humans still remains an urgent problem. Apparently, in the near future we should expect the disclosure of the various options of the clinical trials results for optogenetic prosthetics of the degenerative human retina, which will be critical for determining the priorities for further development of the technology.

**ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВЕДЕННЫЙ GRP78 ПРОНИКАЕТ В ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ КОМПАКТНОЙ ЧАСТИ ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ И ПРЕПЯТСТВУЕТ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ В КРЫСИНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА**

Пази М.Б.\*, Екимова И.В.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: pazimariia@gmail.com

Болезнь Паркинсона (БП) - нейродегенеративное заболевание, которое на сегодняшний день остается неизлечимым из-за поздней диагностики и отсутствия эффективной нейропротективной терапии. Мисфолдинг и накопление токсичных форм белка  $\alpha$ -синуклеина ( $\alpha$ -син) считается основным молекулярным механизмом нейродегенерации при БП. Глюкозорегулируемый белок теплового шока (Grp78) предотвращает образование и накопление цитотоксических  $\alpha$ -син-олигомеров в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР). Bellucci и соавт. (2010) продемонстрировали, что Grp78 образует комплекс с  $\alpha$ -син в ЭПР и что уровни Grp78 повышены в клетках в животных моделях БП. Grp78 также действует как регулятор ответа ЭПР-стресса, вовлеченного в патогенез БП. Таким образом, Grp78 является перспективной молекулой для разработки методов лечения БП. Сверхэкспрессия Grp78 продемонстрировала нейропротекторный эффект на модели  $\alpha$ -синуклеиновой патологии, старческой дегенерации сетчатки и других патологий. Интраназальное введение в настоящее время рассматривается как альтернативный метод доставки лекарств в мозг, который позволяет обходить гематоэнцефалический барьер и направлять лекарства непосредственно в центральную нервную систему. Наши данные о нейропротективном потенциале экзогенного Grp78 в крысиной модели БП, индуцированной лактацистином (ЛЦ), предполагают биодоступность Grp78 для головного мозга при интраназальном введении, однако это требует экспериментального подтверждения.

Белок Grp78, меченный Alexa-555, вводили интраназально самцам крыс линии Вистар (6 месяцев) после микроинъекции ЛЦ (0,4 мкг/мкл) в компактную черную субстанцию (кЧС). Локализацию меченого шаперона Grp78 оценивали с помощью флуоресцентной иммуногистохимии и конфокальной микроскопии.

Интраназально доставленный меченый Grp78 проникает в мозг и локализуется в дофаминовых нейронах (ДА) кЧС через 3 ч после его введения. Наблюдается слияние флуоресцентных сигналов от экзогенного Grp78 и анти-Grp78 антител, что указывает, что флуоресцентный сигнал получен от меченого Grp78. Меченый шаперон был также обнаружен в других областях мозга, вовлеченных в БП.

Экзогенный Grp78 при интраназальном введении проникает в мозг и интернализуется ДА-нейронами кЧС. Увеличение уровня Grp78 в нейронах кЧС ослабляло нейродегенерацию в модели БП на грызунах, что указывает на его нейропротективный потенциал.

*Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭФБ РАН ААААА-А18-118012290427-7.*

**INTRANASALLY INJECTED GRP78 PENETRATES INTO NIGRAL DOPAMINE NEURONS AND REVERSES THE PROCESS OF NEURODEGENERATION IN THE RAT MODEL OF PARKINSON'S DISEASE**

Pazi M.B.\*, Ekimova I.V.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Saint Petersburg, Russia  
\*E-mail: pazimaria@gmail.com

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease which to date remains incurable due late diagnosis and lack of effective neuroprotective therapy. Misfolding and accumulation of toxic forms of  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) protein is considered main molecular mechanism of neurodegeneration during PD. Glucose-regulated heat shock protein (Grp78) prevents the formation and accumulation of cytotoxic  $\alpha$ -syn oligomers in the endoplasmic reticulum (ER). Bellucci et al. (2010) demonstrated that Grp78 forms a complex with  $\alpha$ -syn in ER and that Grp78 levels are increased in cells in animal models of PD. Grp78 also acts as a regulator of unfolded protein response involved in PD pathogenesis. Thus, Grp78 is a prospective molecule in developing PD treatment. Grp78 overexpression demonstrated neuroprotective effect in the model of  $\alpha$ -synuclein pathology, senile retina degeneration and other pathologies. Intranasal administration is now considered as an alternative method of drug delivery into the brain, which allows bypassing the blood-brain barrier and targeting drugs directly to the central nervous system. Our data on neuroprotective potential of exogenous Grp78 in the lactacystin (LC)-induced model of PD in rats suggest its bioavailability to the brain during intranasal administration, yet it requires experimental confirmation.

Grp78 protein labelled by Alexa-555 was administered intranasally to male Wistar rats (6 months) after microinjection of LC (0.4  $\mu$ g/ $\mu$ l) into substantia nigra pars compacta (SNpc). Localization of a fluorescently labelled chaperone Grp78 was assessed using fluorescent immunohistochemistry и confocal microscopy.

Intranasally delivered labeled Grp78 penetrates into brain and is localized in the dopamine (DA) neurons in the SNpc 3 h after its administration. We also observed merging of the fluorescent signals, detected from exogenous Grp78 and anti-Grp78 antibodies, indicating that fluorescent signal is obtained from the labelled Grp78. Labeled chaperone was also found in other brain regions affected by PD.

Exogenous Grp78, when administered intranasally, penetrates into the brain and is internalized by DA neurons of the SNpc. An increase in the level of Grp78 in the SNpc neurons attenuated neurodegeneration in a rodent model of PD, which indicates its neuroprotective potential.

*Supported by state Assignment AAAAA-A18-118012290427-7.*

**АНАЛИЗ РОЛИ ТРАНСПОРТЁРОВ KCC2 И NKCC1 В ПОДДЕРЖАНИИ  
ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЛОРА В СРЕЗАХ ГИППОКАМПА  
ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ**

Петухова Е.О.<sup>1,2</sup>, Пономарева Д.Н.<sup>1,3,\*</sup>, Брежестовский П.Д.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Институт нейронаук, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

<sup>2</sup> Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>3</sup> Институт системных нейронаук, Университет Экс-Марсель, Марсель, Франция  
\*E-mail: idaria.ponomareva@gmail.com

В настоящее время актуальным остается вопрос о регуляции внутриклеточной концентрации хлора ( $[Cl]_{in}$ ) в нейронах как в условиях *in-vivo*, так и *ex-vivo*. Трудности с решением этой проблемы породили споры и оставили под сомнение валидность экспериментов на срезах мозга. Для решения этих и многих других вопросов мы используем линию трансгенных мышей экспрессирующих генетически кодируемый биосенсор хлора и водорода (ClorHensor). Конструкция прикреплена к промотору Thy1, что обеспечивает специфическую экспрессию биосенсора в нейронах.

Целью работы является определение роли KCC2 и NKCC1 в поддержании внутриклеточной концентрации хлора в CA1 зоне срезов гиппокампа. Для этого оценивали влияние блокаторов транспортеров KCC2 (VU0240551) и NKCC1 (буметанид) на базовую концентрацию  $[Cl]_{in}$  и на восстановление  $[Cl]_{in}$  после высокочастотной электрической стимуляции коллатералей Шаффера.

Флуоресцентные сигналы регистрировали при 31.5 °C и постоянной перфузии срезов физраствором. Регистрацию изменений  $[Cl]_{in}$  проводили от популяции нейронов, обеспечивающих оценку средних значений  $[Cl]_{in}$ , в дальнейшем обозначаемых как  $[Cl]_{cp}$ .

В контрольных условиях,  $[Cl]_{cp}$  в пирамидном слое в разных срезах варьировала в диапазоне от 10 до 19 мМ и составляла в среднем  $12.6 \pm 0.7$  мМ ( $n=13$ ). В *stratum radiatum* и *stratum oriens*  $[Cl]_{cp}$  была достоверно ниже:  $4.6 \pm 0.4$  мМ ( $n=13$ ) и  $4.7 \pm 0.3$  мМ ( $n=13$ ), соответственно. Добавление блокатора транспортера KCC2 (VU0240551, 10  $\mu$ M) достоверно повышало  $[Cl]_{cp}$  во всех трех зонах: в *s. pyramidale* – на  $0.2 \pm 0.02$  мМ, в *s. radiatum* и *s. oriens* – на  $0.09 \pm 0.01$  мМ и  $0.11 \pm 0.01$  мМ, соответственно ( $n=6$ ). Эффект блокатора транспортера NKCC1 (буметанида, 10  $\mu$ M), был более выражен:  $[Cl]_{cp}$  снижалась на  $0.48 \pm 0.05$  мМ,  $0.44 \pm 0.04$  мМ и  $0.52 \pm 0.02$  мМ в *s. pyramidale*, *s. radiatum* и *s. oriens*, соответственно ( $n=10$ ). Время восстановления  $[Cl]_{cp}$  после высокочастотной электрической стимуляции коллатералей Шаффера достоверно не менялось при добавлении блокаторов транспортёров.

Полученные результаты позволяют предполагать, что: (i) в соме нейронов  $[Cl]_{cp}$  выше, чем в зонах дендритов; (ii) ингибирование основных транспортёров хлора приводит лишь к незначительным изменениям  $[Cl]_{cp}$  и не влияет на кинетику восстановления базового уровня  $[Cl]_{cp}$  после синаптической стимуляции.

**THE ROLE OF KCC2 AND NKCC1 TRANSPORTERS IN MAINTAINING  
INTRACELLULAR CHLORIDE CONCENTRATION IN HIPPOCAMPAL SLICES OF  
TRANSGENIC MICE**

Petukhova E.O.<sup>1,2</sup>, Ponomareva D.N.<sup>1,3,\*</sup>, Bregestovski P.D.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Neurosciences, Kazan State Medical University, Kazan, Russia

<sup>2</sup> Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia

<sup>3</sup> Institut de Neurosciences des Systemes, Aix-Marseille University, INSERM, INS,  
Marseille, France

\*E-mail: idaria.ponomareva@gmail.com

Currently, the problem of intracellular chloride regulation in neurons remains relevant both in vivo and ex vivo. Difficulties with solving this problem have generated controversy and have raised doubts on the validity of experiments on brain slices. To solve these and many other issues, we use a line of transgenic mice expressing a genetically encoded biosensor for recording intracellular concentrations of chloride ( $[Cl]_i$ ) and hydrogen. The construct, called ClopHensor, is attached to the Thy 1 promoter, which provides specific expression of the biosensor in neurons.

The aim of the study is to determine the role of KCC2 and NKCC1 in maintaining  $[Cl]_i$  in the CA1 area of hippocampal slices. For this purpose, the effects of the blockers of KCC2 (VU0240551) and NKCC1 (Bumethanide) on the base level of  $[Cl]_i$  and on the kinetics of  $[Cl]_i$  recovery after a high-frequency electrical stimulation of Schaffer's collaterals were analyzed.

Fluorescent signals were recorded at 31.5 °C with constant perfusion of sections with oxygenated ACSF.  $[Cl]_i$  was evaluated from a population of neurons providing an estimate of the average values of  $[Cl]_i$ , hereinafter referred to as  $[Cl]_{av}$ .

In control,  $[Cl]_{av}$  in the pyramidal layer of different slices varied in the range from 10 to 19 mM and averaged  $12.6 \pm 0.7$  mM ( $n=13$ ). In *stratum radiatum* and *stratum oriens*  $[Cl]_{av}$  was significantly lower:  $4.6 \pm 0.4$  mM ( $n=13$ ) and  $4.7 \pm 0.3$  mM ( $n=13$ ), respectively. The addition of the KCC2 blocker (VU0240551, 10  $\mu$ M) significantly increased  $[Cl]_{av}$  in all three areas: in *s. pyramidale* – by  $0.2 \pm 0.02$  mM, in *s. radiatum* and *s. oriens* – by  $0.09 \pm 0.01$  mM and  $0.11 \pm 0.01$  mM, respectively ( $n=6$ ). The effect of the NKCC1 blocker (bumetanide, 10  $\mu$ M) was more pronounced:  $[Cl]_{av}$  decreased by  $0.48 \pm 0.05$  mM,  $0.44 \pm 0.04$  mM and  $0.52 \pm 0.02$  mM in *s. pyramidale*, *s. radiatum* and *s. oriens*, respectively ( $n=10$ ). The mean time constant of  $[Cl]_{av}$  recovery after a high-frequency electrical stimulation of Shaffer collaterals did not significantly change with the addition of transporter blockers.

The obtained results suggest that: (i)  $[Cl]_{av}$  is higher in the soma of neurons than in the dendrite zones; (ii) the inhibition of the main chloride transporters leads to only minor changes in  $[Cl]_{av}$  and does not affect the kinetics of recovery of  $[Cl]_{av}$  after synaptic stimulation.

## ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ АКТИВНОСТЬЮ НЕРВНЫХ СЕТЕЙ

Подгорный О.В.<sup>1,2,3,\*</sup>, Мухаметшина Л.Ф.<sup>1,3</sup>, Солотёнков М.А.<sup>4</sup>, Солюс Г.М.<sup>1</sup>, Джаппи Д.<sup>3</sup>, Мальцев Д.И.<sup>1,3</sup>, Ланин А.А.<sup>4,5</sup>, Федотов И.В.<sup>4,5</sup>, Федотов А.Б.<sup>4,5</sup>, Соколов Р.А.<sup>2</sup>, Моценко А.А.<sup>3</sup>, Розов А.В.<sup>3</sup>, Жёлтиков А.М.<sup>6</sup>, Белоусов В.В.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия; <sup>2</sup> Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия; <sup>3</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Россия; <sup>4</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; <sup>5</sup> Российский квантовый центр, Сколково, Россия; <sup>6</sup> Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station TX, USA  
\*E-mail: olegpodgorny@inbox.ru

Опто- и хемогенетические технологии, основанные на доставке генов светочувствительных ионных каналах и G-белок-зависимых рецепторов в нервные клетки, достаточно широко применяются в фундаментальных нейробиологических исследованиях, направленных на выяснение роли определенных нервных сетей в той или иной функции мозга. Кроме того, они успешно применяются для коррекции неврологических нарушений на моделях эпилепсии, болезни Паркинсона, хронической боли и др. Однако, они имеют ряд ограничений для трансляции в медицину. Наиболее перспективной альтернативой опто- и хемогенетике является термогенетика, основанная на использовании термочувствительных каналов суперсемейства TRP. Это неселективные катионные каналы, проводящие преимущественно ионы кальция и натрия. При экспрессии TRP каналов с пороговой температурой активации близкой к 40°C в целевых нервных клетках млекопитающих можно управлять их активностью путем небольших нагревов. В своей работе мы изучали возможности использования термогенетики для манипулирования активностью нервных сетей в мозге и управления локомоторной функцией у мышей.

На клетках линий HeLa и HEK293 с помощью прижизненного кальциевого имиджинга мы протестировали наиболее перспективные с точки зрения применимости к млекопитающим термочувствительные каналы разных семейств TRPV1 человека и TRPA1 курицы с пороговыми температурами активации 43 и 40°C, соответственно. С помощью метода электрофизиологии мы показали, что активация каналов при их экспрессии в культивируемых нейронах с помощью агонистов приводит к деполяризации клеточной мембраны и генерации потенциалов действия. Далее с помощью векторов на основе аденоассоциированных вирусов гены каналов, а также генетически кодируемого кальциевого сенсора GCaMP6s были доставлены в возбуждающие нейроны мезенцефального локомоторного региона взрослых мышей. Стимуляция нейронов путем их небольшого нагрева с помощью инфракрасного лазера вызвала увеличение интегрального сигнала флуоресценции кальциевого сенсора и возрастание скорости перемещения животных в открытом поле. Обнаруженные эффекты воспроизводятся на протяжении 3-х последовательных дней при стимуляции одних и тех же животных. Наши результаты демонстрируют применимость термогенетики для управления активностью нервных сетей *in vivo*.

*Проект поддержан Программой развития генетических технологий на 2019–2027 годы Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2019-1789.*

## **THERMOGENETIC TECHNOLOGIES FOR CONTROLLING THE ACTIVITY OF NEURONAL CIRCUITRY.**

Podgorny O.V.<sup>1,2,\*</sup>, Mukhametshina L.F.<sup>1,4</sup>, Solotnikov M.A.<sup>4</sup>, Solius G.M.<sup>1</sup>, Jappy D.<sup>3</sup>, Maltsev D.I.<sup>1,3</sup>, Lanin A.A.<sup>4,5</sup>, Fedotov I.V.<sup>4,5</sup>, Fedotov A.B.<sup>4,5</sup>, Sokolov R.A.<sup>2</sup>, Moschenko A.A.<sup>3</sup>, Rozov A.V.<sup>3</sup>, Zheltikov A.M.<sup>6</sup>, Belousov V.V.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia; <sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia; <sup>3</sup> Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Moscow, Russia; <sup>4</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; <sup>5</sup> Russian Quantum Center, Skolkovo, Russia; <sup>6</sup> Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station TX, USA

\*E-mail: olegpodgorny@inbox.ru

Opto- and chemogenetic technologies based on delivery of the genes encoding light sensitive ion channels and G-protein-coupled receptors in neurons are widely used in neurobiological research for elucidating the roles of defined neuronal networks in particular brain functions. In addition, they are successfully used ameliorate neurological impairments in animal models of epilepsy, Parkinson's disease, chronic pain, etc. However, they have a number of limitations for translation into medicine. The most promising approach alternative to opto- and chemogenetics is thermogenetics. Thermogenetics based on the use of thermosensitive ion channels belonging to the TRP superfamily. These are non-selective cation channels that conduct predominantly calcium and sodium ions. When thermosensitive TRP channels with a threshold temperature close to 40°C are expressed in target mammalian neurons, their activity can be controlled by slight, non-damaging heating.

Here, we examined the possibility of using thermogenetics to manipulate the function of neuronal networks in the brain and control locomotor activity in mice. Using real-time calcium imaging, we tested the most promising thermosensitive channels, human TRPV1 and chicken TRPA1, which have threshold temperatures of 43 and 40°C, respectively, on HeLa and HEK293 cell lines. By electrophysiological recordings, we have shown that the activation of the channels after their expression in cultured neurons by agonists led to depolarization of the cell membrane and the generation of action potentials. Then, using adeno-associated viral vectors, the genes encoding the thermosensitive channels and the calcium sensor GCaMP6s, were delivered to the excitatory neurons of the mesencephalic locomotor region of adult mice. Stimulation of neurons by slight heating with an infrared laser caused an elevation in the integral fluorescence signal of the calcium sensor and an increase in the speed of motion of animals in the open field. The observed effects are reproduced for three consecutive days with stimulation of the same animals. Our results demonstrate the utility of thermogenetics to control the activity of neural networks *in vivo*.

*Supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation grant no. 075-15-2019-1789 to the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine.*

## ОПТОСЕНСОРНЫЙ АНАЛИЗ ИНГИБИРОВАНИЯ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В СРЕЗАХ ГИППОКАМПА

Пономарева Д.Н.<sup>1,2,3,\*</sup>, Зильбертер Ю.И.<sup>3</sup>, Брежестовский П.Д.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Институт Нейронаук, Казанский Государственный Медицинский Университет, Казань, Россия

<sup>2</sup> Кафедра нормальной физиологии, Казанский Государственный Медицинский Университет, Казань, Россия

<sup>3</sup> Институт Системных Нейронаук, Университет Экс-Марсель, Марсель, Франция  
\*E-mail: idaria.ponomareva@gmail.com

Энергетические потребности головного мозга очень велики, и глюкоза является основным источником энергии для процессов его развития и функционирования. Под действием гексокиназы глюкоза превращается в глюкозо-6-фосфат, который направляется по трем основным метаболическим путям: гликолиз, пентозофосфатный путь и гликогеногенез. Под действием фермента глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (Г6ФД) глюкозо-6-фосфат направляется по пентозофосфатному пути, в котором синтезируется НАДФН, восстановленная форма НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат). НАДФН, глутатионредуктаза и тиоредоксинредуктаза поддерживают уровень восстановленной формы глутатиона и тиоредоксина, которые захватывают и нейтрализуют активные формы кислорода (АФК), что обеспечивает антиоксидантную защиту клетки. Патологические состояния, связанные с дефицитом активности Г6ФД или ее полным подавлением, хорошо известны. Ингибирование функции Г6ФД, приводящее к модуляции пентозофосфатного пути и внутриклеточного метаболизма глюкозы, недостаточно изучено и требует дополнительного анализа.

Одним из важных вопросов является выяснение: влияет ли ингибирование Г6ФД, т.е. пентозофосфатного пути на продукцию АФК. Для решения этой задачи мы использовали недавно открытый стероид G6PDi-1, который является мощным ингибитором Г6ФД и оценивали уровень внутриклеточного АФК с помощью флуоресцентной краски CellRox Orange. Была проведена серия экспериментов по регистрации изменений внутриклеточного уровня АФК, а также продукции АФК при стимуляции коллатералей Шаффера на сагиттальных срезах гиппокампа в контроли и при действии ингибитора Г6ФД (G6Pdi-1). Показано, что добавление G6Pdi-1 приводит к увеличению базового уровня флуоресценции на  $0,60 \pm 0,17\%$  ( $n=6$ ,  $p < 0,05$ ). В контрольных условиях и при действии G6Pdi-1 стимуляция коллатералей Шаффера (10 Гц, 30 с) приводит к увеличению флуоресценции, которая возвращается к исходному уровню после завершения стимуляции. Под действием G6Pdi-1 относительная амплитуда изменения флуоресценции составила  $104,8 \pm 6,2\%$  по сравнению с контролем (100%) ( $n=7$ ). Продукция АФК в результате стимуляции коллатералей Шаффера полностью блокировалась в присутствии ТТХ, 1 мкМ, что указывает на ее синаптическую природу.

Полученные результаты показывают, что ингибирование Г6ФД вызывает увеличение базового внутриклеточного уровня АФК, при этом продукция АФК значительно не изменялась при синаптической стимуляции. Таким образом, можно предполагать, что окислительная ветвь пентозофосфатного пути не является важным модулятором уровня АФК в нейронах мозга.



## OPTOSENSORIC ANALYSIS OF THE PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY INHIBITION ON INTRACELLULAR PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN HIPPOCAMPAL SLICES

Ponomareva D.N.<sup>1,2,3,\*</sup>, Zilberter Y.I.<sup>3</sup>, Bregestovski P.D.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Neurosciences, Kazan State Medical University, Kazan, Russia

<sup>2</sup> Department of Normal Physiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russia

<sup>3</sup> Aix-Marseille Université, INSERM, INS, Institut de Neurosciences des Systèmes, Marseille, France.

\*E-mail: idaria.ponomareva@gmail.com

The energy consumption of the brain is very high, and glucose is the main source of energy for the processes of its development and functioning. Hexokinase catalyzes the first step of glucose metabolism, phosphorylating glucose to glucose 6-phosphate, that can be metabolized through the following metabolic routes: glycolysis, pentose phosphate pathway and gluconeogenesis. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) catalyzes glucose-6-phosphate conversion and starts the pentose phosphate pathway, that produce NADPH, the reduced form of NADP (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate). The NADPH-dependent thioredoxin and glutathione systems quench the Reactive Oxygen Species (ROS) that providing antioxidant protection. Pathological conditions associated with a deficiency of G6PD activity or its complete suppression have been well studied. However, the inhibition of G6PD functions leading to the modulation of the pentose phosphate pathway and intracellular glucose metabolism has not been sufficiently studied and requires profound analysis.

One of the important questions is to find out whether the inhibition of the enzyme G6PD, which controls the pentose phosphate pathway, affects the production of ROS. To solve this problem, we used the recently discovered steroid G6PDi-1, which is a potent inhibitor of G6PD, and analyzed the level of intracellular ROS using the fluorescent dye CellRox Orange. The experiments were conducted to record changes in intracellular ROS levels, as well as ROS production during stimulation of Shaffer collaterals in sagittal slices of the hippocampus in controls and under the action of a G6PD inhibitor (G6PDi-1).

The addition of G6PDi-1 resulted in an increase in the baseline fluorescence level by  $0.60 \pm 0.17\%$  ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ). Under control conditions and in the presence of G6PDi-1, stimulation of Shaffer collaterals (10 Hz, 30 sec) led to an increase in fluorescence, which returned to the initial level after the completion of stimulation.

In control conditions and in the presence of G6PDi-1, stimulation of Shaffer collaterals (10 Hz, 30 sec) caused the increase of fluorescence, that returned to the baseline after the completion of stimulation. This indicated that stimulation causes an increase in intracellular ROS level. The relative amplitude of fluorescence changes under the action of the inhibitor G6PD was  $104.8 \pm 6.2\%$  compared with the control (100%) ( $n=7$ ). The fluorescence change evoked by stimulation was completely blocked in the presence of  $1 \mu\text{M}$  TTX which indicates the synaptic nature of the fluorescence changes.

The results obtained show that inhibition of G6PD caused small increase in the basic intracellular level of ROS, while ROS production did not significantly change during synaptic stimulation. In this way, it can be assumed that the oxidative branch of the pentose phosphate pathway is not an important modulator of the level of ROS in brain neurons.

## ХЕМОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Потехина Е.С.<sup>1,2,\*</sup>, Басс Д.Ю.<sup>1,2</sup>, Иваненко А.В.<sup>1,2</sup>, Мощенко А.А.<sup>3</sup>, Корженевский Д.А.<sup>3</sup>, Нестеренко А.М.<sup>3</sup>, Карнаева А.Е.<sup>4</sup>, Закирова Н.Ф.<sup>5</sup>, Иванов А.В.<sup>5</sup>, Шимолина Л.Е.<sup>6</sup>, Ширманова М.В.<sup>6</sup>, Лянг О.В.<sup>3</sup>, Пацап О.И.<sup>3</sup>, Богески И.<sup>7</sup>, Белоусов В.В.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; <sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия;

<sup>3</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Россия; <sup>4</sup> Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фrumкина РАН, Москва, Россия;

<sup>5</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

<sup>6</sup> Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия; <sup>7</sup> Molecular Physiology Division, Institute of Cardiovascular Physiology, University Medical Center, Georg-August University, Göttingen, Germany

\*E-mail: potekh@mail.ru

Для злокачественных опухолей характерен сдвиг метаболизма от окислительного фосфорилирования к аэробному гликолизу (эффeкт Варбурга). При канцерогенезе подавляются транспорт пирувата в митохондрии и его включение в цикл Кребса, одновременно в цитоплазме активируются гликолиз и восстановление пирувата с последующим экспортом лактата во внеклеточное пространство. Такой тип метаболизма позволяет пролиферирующим клеткам быстро получать энергию и интермедиаты для биосинтетических процессов, подавлять иммунный ответ, стимулирует эпителиально-мезенхимальный переход и развитие множественной лекарственной устойчивости.

Чтобы оценить влияние митохондриального метаболизма на раковые клетки, мы разработали генетически кодируемый инструмент для генерации пирувата в матриксе митохондрий на основе дегидрогеназы D-аминокислот (DadA) из *Pseudomonas aeruginosa*. Этот фермент окисляет D-аланин до пирувата и аммиака. Поскольку D-аланин практически отсутствует в клетках млекопитающих, активность DadA контролируется добавлением субстрата извне. DadA с митохондриальной локализацией мы назвали Grubraw (Warburg в обратном прочтении).

Активность Grubraw в опухолевых клетках увеличивала мембранный потенциал митохондрий, скорость потребления кислорода и внутриклеточные количества интермедиатов цикла Кребса по сравнению с исходным значением и с контролем (мутант Grubraw-mut, не обладающий ферментативной активностью). При этом активность Grubraw не влияла на pH и концентрацию пероксида водорода в матриксе митохондрий, а также на скорость гликолиза и концентрацию пирувата в цитоплазме и митохондриях. С другой стороны, в панели протестированных раковых клеток активность Grubraw увеличивала внеклеточную концентрацию пирувата, не влияя на внеклеточный лактат. С использованием <sup>13</sup>C-меченых субстратов было показано, что накапливаемый внеклеточный пируват образуется из D-аланина. При этом активность Grubraw снижала скорость деления раковых клеток в культуре.

У иммунодефицитных мышей линии Nude подкожные ксенотрансплантаты меланомы человека Lu451, стабильно экспрессирующие Grubraw, замедляли свой рост при выпаивании мышей водой с 100 мМ D-аланином.

Полученные данные указывают на то, что активность Grubraw ускоряет митохондриальный метаболизм и замедляет рост опухолевых клеток, несмотря на наличие компенсаторного механизма, направленного на выведение излишка пирувата из матрикса во внеклеточное пространство. Тем не менее, полученного изменения метаболизма достаточно, чтобы замедлить рост опухолей *in vivo*.

## CHEMOGENETIC ACTIVATION OF MITOCHONDRIAL METABOLISM IN TUMOR CELLS

Potekhina E.S.<sup>1,2,\*</sup>, Bass D.Y.<sup>1,2</sup>, Ivanenko A.V.<sup>1,2</sup>, Moshchenko A.A.<sup>3</sup>, Korzhenevskiy D.A.<sup>3</sup>, Nesterenko A.M.<sup>3</sup>, Karnaeva A.E.<sup>4</sup>, Zakirova N.F.<sup>5</sup>, Ivanov A.V.<sup>5</sup>, Shimolina L.E.<sup>6</sup>, Shirmanova M.V.<sup>6</sup>, Lyang O.V.<sup>3</sup>, Patsap O.I.<sup>3</sup>, Bogeski I.<sup>7</sup>, Belousov V.V.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, RAS; <sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University; <sup>3</sup> Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies; <sup>4</sup> Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, RAS; <sup>5</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS; <sup>6</sup> Privolzhsky Research Medical University; <sup>7</sup> Molecular Physiology Division, Institute of Cardiovascular Physiology, University Medical Center, Georg-August University, Göttingen, Germany

\*E-mail: potekh@mail.ru

Upregulation of glycolysis and downregulation of mitochondrial oxidative phosphorylation, termed as Warburg effect, are characteristic of tumor cells. During carcinogenesis, pyruvate transport to mitochondria and its entry into the Krebs cycle are suppressed, and glycolysis and pyruvate reduction are activated in the cytoplasm, followed by export of lactate to the extracellular space. Warburg-type metabolism is beneficial for rapidly proliferating cells, allows to quickly obtain energy and intermediates for biosynthetic processes, suppress the immune response, stimulate the epithelial-mesenchymal transition and the development of multidrug resistance.

It is unknown what would be the metabolic consequences of activation of mitochondrial respiration in Warburg-type cancer cells. Here, we created a Grubraw (reverse Warburg) chemogenetic tool based on the *Pseudomonas aeruginosa* FAD-dependent D-amino acid dehydrogenase (DadA), which oxidatively deaminates D-alanine and generates pyruvate directly in the mitochondrial matrix, bypassing the limited influx of pyruvate. Since D-alanine is almost completely absent in mammalian cells, Grubraw activity is controlled by the addition of an external substrate.

In cancer cells, Grubraw-driven pyruvate synthesis in the matrix increased mitochondrial membrane potential, oxygen consumption rate, and the amounts of TCA cycle intermediates. At the same time, Grubraw activity did not affect the pH and ROS generation in the mitochondrial matrix, as well as the rate of glycolysis and the concentration of pyruvate in the cytoplasm and mitochondria. Surprisingly, cancer cells actively exported mitochondrial pyruvate generated by Grubraw into the extracellular medium. In a panel of cancer cells tested, Grubraw activity increased extracellular pyruvate concentration without affecting extracellular lactate. Using <sup>13</sup>C-labeled substrates, it was shown that accumulated extracellular pyruvate was formed from D-alanine. At the same time, Grubraw activity reduced the rate of division of cancer cells in culture. In Nude mouse model of Lu451 human melanoma xenografts, the chemogenetic activation of mitochondria by Grubraw decreased tumor growth rate.

Our results demonstrate that Warburg effect reversal impacts tumor growth despite the observed counteraction mechanism cancer cells use to dispose of the excessive matrix pyruvate.

**НИЗКОЧАСТОТНАЯ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ГЛАВНЫХ НЕЙРОНОВ,  
НО НЕ ПАРВАЛЬБУМИН-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ,  
ПРЕДОТВРАЩАЕТ ИКТАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ В ЭНТОРИНАЛЬНОЙ КОРЕ  
ГРЫЗУНОВ В 4-АМИНОПИРИДИНОВОЙ МОДЕЛИ *IN VITRO***

Проскурина Е.Ю.<sup>1,2,\*</sup>, Чижов А.В.<sup>2,3,4</sup>, Зайцев А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Inria Centre at Universite Cote d'Azur, Sophia Antipolis, France

\*E-mail: elena.yu.proskurina@gmail.com

Височная эпилепсия часто не поддается медикаментозному лечению. Низкочастотная электрическая стимуляция может быть альтернативным методом лечения фармакорезистентных форм эпилепсии, однако есть риск возникновения побочных эффектов. Чтобы уменьшить риск развития побочных эффектов, необходимо осуществлять более таргетное воздействие на нервную ткань. На помощь в поиске мишени для противозепилептического воздействия пришел современный метод нейробиологии – оптогенетика. Оптогенетический подход позволяет воздействовать специфично на определенный тип нейронов, что может повысить эффективность и безопасность низкочастотной стимуляции. В данной работе мы проверили эффективность подавления иктальных разрядов в 4-аминопиридиновой модели эпилептиформной активности *in vitro* с помощью трех типов низкочастотной фотостимуляции (НЧФС): 1) активации возбуждающих и тормозных нейронов, экспрессирующих каналородопсин2 (на мышцах Thy1-ChR2-YFP); 2) активации тормозных интернейронов (на мышцах PV-cre после инъекции вируса с геном каналородопсина2); 3) гиперполяризации возбуждающих нейронов (на крысах Вистар после инъекции вируса с геном археродопсина). Только в первом случае НЧФС эффективно подавляла иктальную активность, при этом вызывая интериктальную. В том случае, когда силы светового воздействия было недостаточно для того, чтобы вызвать интериктальные разряды, иктальная активность сохранялась. Мы предполагаем, что НЧФС возбуждающих и тормозных нейронов приводит к изменению градиентов концентрации катионов натрия и калия через мембрану нейронов, это приводит к активации Na-K-помпы. Согласно математическому моделированию, увеличение активности Na-K-помпы, вызванное НЧФС, оказывает противозепилептический эффект. Таким образом, неспецифичное низкочастотное воздействие на энторинальную кору оказалось наиболее эффективным в подавлении иктальной активности в 4-аминопиридиновой модели.

*Работа поддержана грантом РФФИ 19-315-60016.*

**OPTOGENETIC LOW-FREQUENCY STIMULATION OF PRINCIPAL NEURONS, BUT NOT PARVALBUMIN-POSITIVE INTERNEURONS, PREVENTS GENERATION OF ICTAL DISCHARGES IN RODENT ENTORHINAL CORTEX IN AN IN VITRO 4-AMINOPYRIDINE MODEL**

Proskurina E.Yu.<sup>1,2,\*</sup>, Chizhov A.V.<sup>2,3,4</sup>, Zaitsev A.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup>Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of RAS, Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup>Ioffe Institute, Saint Petersburg, Russia

<sup>4</sup>Inria Centre at Universite Cote d'Azur, Sophia Antipolis, France

\*E-mail: [elena.yu.proskurina@gmail.com](mailto:elena.yu.proskurina@gmail.com)

The temporal lobe epilepsy is often not treated pharmacologically. Low-frequency electrical stimulation is used to treat some drug-resistant forms of epilepsy. Despite the effectiveness of the method in suppressing seizures, there is a considerable risk of side effects. To reduce the risk of side effects, it is necessary to carry out a more targeted effect on the nervous tissue. A modern method of neurophysiology, optogenetics, came to help in the search for a target for antiepileptic effects. An optogenetic approach allows the targeting of specific populations of neurons, which can increase the effectiveness and safety of low-frequency stimulation. In our study, we tested the efficacy of the suppression of ictal activity in entorhinal cortex slices in a 4-aminopyridine model with three variants of low-frequency light stimulation (LFLS): (1) activation of excitatory and inhibitory neurons expressing Channelrhodopsin2 (on Thy1-ChR2-YFP mice), (2) activation of inhibitory interneurons only (on PV-Cre mice after virus injection with channelrhodopsin2 gene), and (3) hyperpolarization of excitatory neurons (on Wistar rats after virus injection with archaerhodopsin gene). Only in the first variant was effective and replaced ictal activity with interictal activity. In the case when the intensity of light was not enough to induce interictal discharges, ictal activity was preserved. We suggest that LFLS caused changes in the concentration gradients of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> cations across the neuron membrane, which activated Na-K pumping. According to the mathematical modeling, the increase in Na-K pump activity in neurons induced by LFLS led to an antiepileptic effect. Thus, a less specific and generalized optogenetic effect on entorhinal cortex neurons was more effective in suppressing ictal activity in the 4-aminopyridine model.

*Supported by the Russian Foundation for Basic Research (project number 19-315-60016).*

**ФОТОСТИМУЛЯЦИЯ АКТИВИРУЕТ КАК БЫСТРОРАЗРЯЖАЮЩИЕСЯ  
ИНТЕРНЕЙРОНЫ, ТАК И ПИРАМИДНЫЕ КЛЕТКИ В ЭНТОРИНАЛЬНОЙ КОРЕ  
Thy1-ChR2-YFP 18 ЛИНИИ МЫШЕЙ**

Проскурина Е.Ю.<sup>1,2,\*</sup>, Зайцев А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: [elena.yu.proskurina@gmail.com](mailto:elena.yu.proskurina@gmail.com)

Применение оптогенетики для исследований на животных открыло новые возможности в фундаментальной нейронауке и в лечении заболеваний нервной системы. Основным преимуществом оптогенетического подхода является то, что можно оказывать воздействие на определенный тип клеток, причем как стимулирующее, так и тормозящее. Одной из первых линий, полученных для оптогенетики, была линия Thy1-ChR2-YFP. Thy1 относится к семейству иммуноглобулинов, экспрессирующихся в проектирующих нейронах. Однако специфичность экспрессии каналородопсинов под промотером Thy1 в различных линиях еще должна быть уточнена. Нашей целью было определить специфичность к типу клеток экспрессии каналородопсинов в энторинальной коре мышей линии 18 Thy1-ChR2-YFP. Мы обнаружили, что как пирамидные клетки, так и быстроразряжающиеся интернейроны в глубоких слоях энторинальной коры деполяризуются и генерируют потенциалы действия при воздействии светом 470 нм. Чтобы исключить эффект синаптической активации интернейронов пирамидными клетками, мы воспользовались селективным антагонистом AMPA-рецепторов. В этих условиях тормозные постсинаптические токи уменьшались по амплитуде, но не исчезали. Они пропадали под действием габазина, антагониста ГАМК-рецепторов. Это доказывает прямую активацию интернейронов светом. Полученные данные указывают на то, что каналородопсины экспрессируются как в пирамидных клетках, так и в быстроразряжающихся интернейронах энторинальной коры Thy1-ChR2-YFP мыши.

*Работа поддержана грантом РФФИ 19-315-60016.*

**PHOTOSTIMULATION ACTIVATES FAST-SPIKING INTERNEURONS AND PYRAMIDAL CELLS IN THE ENTORHINAL CORTEX OF THY1-CHR2-YFP LINE 18 MICE**

Proskurina E.Yu.<sup>1,2</sup>, Zaitsev A.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of RAS, Saint Petersburg, Russia

\*E-mail: elena.yu.proskurina@gmail.com

The application of optogenetics in animals has provided new insights into both fundamental neuroscience and diseases of the nervous system. This is primarily due to the fact that optogenetics allows selectively activating or inhibiting particular types of neurons. One of the first transgenic mouse lines developed for the optogenetic experiment was Thy1-ChR2-YFP. Thy1 is an immunoglobulin superfamily member expressing in projection neurons, so it was assumed that channelrhodopsin-2 (ChR2) would be primarily expressed in projection neurons. However, the specificity of ChR2 expression under promoter Thy1 in different lines has to be clarified yet. Therefore, we aimed to determine the cell specificity of ChR2 expression in the entorhinal cortex of Thy1-ChR2-YFP line 18 mice. We have found that both pyramidal cells and fast-spiking interneurons in deep layers of the entorhinal cortex depolarized and fired in response to 470-nm photostimulation. To exclude the effect of synaptic activation of interneurons by pyramidal cells, we used a selective antagonist of AMPA receptors. Under these conditions, inhibitory postsynaptic currents decreased but did not disappear completely. Furthermore, gabazine inhibited these postsynaptic currents entirely, thus confirming the direct activation of interneurons by light. These data demonstrate that ChR2 is expressed in both pyramidal neurons and fast-spiking interneurons of the entorhinal cortex in Thy1-ChR2-YFP mice.

*Supported by the Russian Foundation for Basic Research (project number 19-315-60016).*

**ТРАНСДУКЦИЯ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА МОЛОДИ КЕТЫ  
*ONCORHYNCHUS KETA* РЕКОМБИНАНТНЫМ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫМ  
ВИРУСОМ ГИППОКАМПА ПРИ ИНЪЕКЦИИ В МОЗЖЕЧОК: РЕЗУЛЬТАТЫ  
ДОЛГОВРЕМЕННОГО МОНИТОРИНГА.**

Пущина Е.В.\* , Стуканева М.Е., Шамшурина Е.В., Вараксин А.А.  
Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского  
Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, Россия  
\*E-mail: [puschina@mail.ru](mailto:puschina@mail.ru)

Тело мозжечка молоди кеты, является мультипроекционной областью мозга, связанной афферентными и эфферентными связями с вышерасположенными областями ствола мозга и синэнцефалона, а также мультипроекционными областями продолговатого и спинного мозга. Учитывая процесс постэмбрионального развития мозжечка кеты, во время которого латеральная часть мозжечка молоди дает начало каудомедиальной части дефинитивного мозжечка, что соответствует данным на мозжечке данио и мыши, топографическая организация мозжечка и его эфферентов имеют сходство у рыб (кеты и данио), мышей и человека. Распределения рекомбинантных адено-ассоциированных вирусов гиппокампа млекопитающих (gAAV) после инъекции базового вектора в мозжечок выявили высоко специфичные паттерны экспрессии трансгенов в биполярных нейронах в латеро-каудальной доли *tectum opticum* молоди кеты. Распространение gAAV в области дорсального таламуса, эпителиума, круглого ядра и претектального комплекса свидетельствует о таргетном распространении трансгена в составе таламо-церебеллярных проекций. Обнаружение экспрессии GFP в клетках эпифиза и заднего бугорка молоди кеты мы связываем с распространением трансгена с ликвором, омывающим желудочки мозга и его внешнюю поверхность. Прямая доставка gAAV в ликворное пространство путем интрацеребровентрикулярного введения, дает возможность для его широкого распространения в ЦНС. Таким образом, наличие установленных проекционных областей в мозжечке молоди кеты, а также за его пределами и идентификация в них экспрессии трансгенов доказывает потенциальную способность к распространению gAAV в составе интрацеребеллярных, а также афферентных и эфферентных экстрацеребеллярных проекций мозжечка. Полученные данные позволяют использовать gAAV в качестве эффективного инструмента для исследования внутримозговых связей у рыб и других позвоночных, что может найти применения в различных эволюционно-морфологических, ходологических и сравнительных исследованиях. Выявление нейронального фенотипа NuCD-экспрессирующих трансгенных клеток указывает на особенности и направления внутриклеточного и транснейронального транспорта трансгенов в мозге рыб. В результате проведенных исследований было подтверждено, что генетический таргетинг в ЦНС может обеспечиваться путем расщепления генов за счет длинноаксонных антеро- и ретроградных проекций из ограниченного участка мозга. Однако, на сегодняшний день вопросы, связанные с потенциальной доставкой генетических векторов в удаленные участки мозга, требуют дополнительного изучения.



**TRANSDUCTION OF BRAIN NEURONS IN JUVENILE CHUM SALMON  
*ONCORHYNCHUS KETA* WITH RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED  
HIPPOCAMPAL VIRUS INJECTED INTO THE CEREBELLUM: RESULTS OF LONG-  
TERM MONITORING**

Pushchina E.V.\*, Stukaneva M.E., Shamshurina E.V., Varaksin A.A.  
Zhirmunsky National Scientific Center for Marine Biology of the Far Eastern Branch of  
RAS, Vladivostok, Russia  
*\*E-mail: pushchina@mail.ru*

The corpus cerebelli in juvenile chum salmon is a multiprojective region of the brain connected by afferent and efferent connections with the higher regions of the brainstem and synencephalon, as well as multiprojection regions of the medulla oblongata and spinal cord. Taking into account the possible process of postembryonic development of the cerebellum of the chum salmon, during which the lateral part of the cerebellum of juveniles can give rise to the caudomedial part of the adult cerebellum, which corresponds to the data on the cerebellum of zebrafish and mice, the topographic organization of the cerebellum and its efferents are similar in fish: chum salmon and zebrafish, mice and humans. The distributions of rAAV after injection of the base vector into the cerebellum revealed highly specific patterns of transgene expression in bipolar neurons in the latero-caudal lobe of the tectum opticum of juvenile chum salmon. The distribution of rAAV in the region of the dorsal thalamus, epithalamus, nucleus rotundus, and pretectal complex indicates the targeted distribution of the transgene in the thalamo-cerebellar projections of the chum salmon. The detection of GFP expression in the cells of the epiphysis and posterior tubercle of juvenile chum salmon is probably associated with the spread of the transgene with the cerebrospinal fluid washing the outer surface and ventricles of the brain. Direct delivery of rAAV into the CSF space by intracerebroventricular administration makes it possible for wide distribution in the CNS. Thus, the presence of established projection areas in the cerebellum of juvenile chum salmon, as well as outside it, and the identification of transgene expression in them present the potential ability of rAAV to distribute in intracerebellar, as well as afferent and efferent extracerebellar projections of the cerebellum. The obtained data make it possible to use rAAVs as an effective tool for studying intracerebral connections in fish and other vertebrates, which can be used in various evolutionary-morphological, hodological, optogenetic and comparative studies. The detection of the neuronal phenotype of HuCD-expressing transgenic cells indicates the features and directions of intracellular and transneuronal transport of transgenes in the fish brain as a result of the studies, it was confirmed that genetic targeting in the CNS can be provided by gene dispersion due to long-axon antero- and retrograde projections from a limited area of the brain. However, to date, the issues related to the potential delivery of genetic vectors remote from the injection site require further study.

## ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДЛЯ АНАЛИЗА ФОРМЫ ДЕНДРИТНЫХ ШИПИКОВ НА КОНФОКАЛЬНЫХ ИЗОБРАЖЕНИЯХ НЕЙРОНОВ

Пчицкая Е.И. <sup>1,\*</sup>, Васильев П.И. <sup>1</sup>, Чуканов В.С. <sup>1</sup>, Безпрозванный И.Б. <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Юго-Западный медицинский центр Техасского университета, Даллас, Техас, США

\*E-mail: katrincreative@yandex.ru

Дендритные шипики представляют собой вырост на поверхности дендритной мембраны, образующие подавляющее большинство возбуждающих синаптических контактов в нейронах. Дендритные шипики обладают разнообразной формой, которая постоянно меняется. Считается, что данный процесс обеспечивает синаптическую пластичность, тем не менее требуются дальнейшие исследования для установления связи между формой и функцией шипиков. Морфология дендритных шипиков изменяется при нейроонтогенетических и нейродегенеративных заболеваниях, и в ответ на действие внешних стимулов. Классификация по предопределенным морфологическим группам является широко используемым подходом к анализу морфологии дендритных шипиков. В данном подходе шипики делятся на фиксированные категории, такие как тонкие, грибовидные и пеньковые. Классификация, обычно, выполняется экспериментатором полуавтоматическим способом, что ведет к значительной ошибке. Последние исследования, в том числе с использованием прижизненной микроскопии *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют в пользу того, что формы дендритных шипиков представляют собой континуум, а не четко разделенные классы (Pchitskaya E., Bezprozvanny I., 2020). В связи с этим существует необходимость в разработке надежного метода оценки и изучения морфологии дендритных шипиков. Нами разработано программное обеспечение с открытым исходным кодом, написанное на Python, для сегментации дендритных шипиков из трехмерных дендритных изображений, вычисления 11 наиболее широко используемых морфологических признаков и выполнения классификации и кластеризации. Мы разработали основанный на алгоритме машинного обучения инструмент классификации, который классифицирует шипики по указанным выше категориям на основе консенсуса, достигнутого путем ручной разметки обучающего датасета 8 различными экспертами. Точность такого метода сопоставима с экспертной разметкой (>80%). Такой подход позволяет снизить необъективность и трудоемкость классификации. Инструмент кластеризации, где количество групп и их содержания определяется данными, а не экспериментатором, представлен алгоритмами k-средних и DBSCAN с двумя различными метриками для определения количества кластеров. Разработана качественно новая нечисловая метрика для описания формы дендритных шипов – хордовая гистограмма, которая состоит из случайно построенных хорд (линий, соединяющих две точки поверхности любого объекта) в объеме дендритных шипиков.

*Работа выполнена при поддержке программы академического лидерства «Приоритет 2030» №. 75-15-2021-1333.*

## SOFTWARE FOR DENDRITIC SPINE SHAPE ANALYSIS ON THE CONFOCAL NEURONAL IMAGES

Pchitskaya E.I.<sup>1</sup>, Vasiliev P.I.<sup>1</sup>, Chukanov V.S.<sup>1</sup>, Bezprozvanny I.B.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA

\*E-mail: [katrincreative@yandex.ru](mailto:katrincreative@yandex.ru)

Dendritic spines are outgrowths on the dendritic membrane surface forming the vast majority of excitatory synaptic contacts in neurons. Dendritic spines have a variety of shapes that are constantly changing. This process is believed to mediate synaptic plasticity, but further research is required to establish a relationship between spine shape and function. The morphology of dendritic spines changes in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases and in response to external stimuli. Classification according to predefined morphological groups is a widely used approach to the analysis of the morphology of dendritic spines. In this approach, spines are divided into fixed categories such as thin, mushroom and stubby. Classification is usually performed by the experimenter in a semi-automated manner, leading to significant error. Recent studies, including those using life microscopy in vitro and in vivo, suggest that dendritic spine shapes represent a continuum rather than clearly separated classes (Pchitskaya E., Bezprozvanny I., 2020). In this regard, there is a need to develop a reliable method for assessing and studying the morphology of dendritic spines. We have developed open-source software in Python to segment dendritic spines from 3D dendritic images, compute the 11 most commonly used morphological features, and perform classification and clustering. We have developed a classification tool based on a machine learning algorithm that classifies spines into the mentioned above categories based on a consensus reached by manual labeling of the training dataset by 8 different experts. The accuracy of this method is comparable to expert markup (>80%). This approach reduces the bias and complexity of classification. The clustering tool, where the number of groups and their content is determined by the data and not by the experimenter, is represented by k-means and DBSCAN algorithms with two different metrics to determine the number of clusters. A qualitatively new non-numeric metric has been developed to describe the shape of dendritic spines - a chord length histogram, which consists of randomly constructed chords (lines connecting two points on the surface of any object) in the volume of dendritic spines.

*Supported by the program of academic leadership "Priority 2030" No. 75-15-2021-1333.*

**ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БИОСЕНСОР ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫХ ТИОЭФИРОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ацил-КоА В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ**

Рапота Д.Д.<sup>1,2</sup>, Судоплатов М.А.<sup>3</sup>, Билан Д.С.<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

<sup>3</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, Москва  
\*E-mail: dianarapota7@gmail.com

Тиозфиры длинноцепочечных жирных кислот и кофермента А (ацил-КоА) – ключевые участники метаболизма липидов и сигнальных путей клеток. Однако на сегодняшний день изучение данных соединений *in vivo* затруднено из-за ограниченного набора методов их визуализации. Цель данной работы – создать генетически кодируемый биосенсор на основе кругового пермутанта желтого флуоресцентного белка (сrYFP) и ацил-КоА-связывающего транскрипционного фактора FadR из *V.cholerae*, которой позволит исследовать пространственно-временную динамику длинноцепочечных ацил-КоА в живых клетках.

Первичная версия биосенсора была получена интеграцией сrYFP в линкерный участок FadR с помощью overlap-extension PCR. Методом error-prone PCR была создана библиотека версии биосенсора со случайными заменами. Отбор вариантов биосенсора был осуществлен на основании интенсивности флуоресценции бактериальных клонов *E. coli* XL1-Blue, экспрессирующих биосенсор, и амплитуды ответа на лиганд. Спектральные характеристики флуоресценции очищенных препаратов биосенсора были исследованы с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse. Для изучения работоспособности биосенсора в линии клеток HEK 293T, была проведена трансфекция реагентом FuGENE HD с последующей широкопольной флуоресцентной микроскопией на Nikon ECLIPSE Ti2.

В результате, была отобрана конструкция, отличающаяся повышенной яркостью и амплитудой ответа на олеил-КоА и пальмитоил-КоА. Её свойства были исследованы на очищенном препарате белка и при экспрессии в культуре клеток HEK 293T. Данный инструмент демонстрирует ратиометрический, обратимый и селективный флуоресцентный ответ на очищенном препарате белка и в культуре клеток HEK 293T после пермеабилзации дигитонином, отвечая на ацил-КоА с длиной цепи более 12 атомов углерода. Биосенсор обладает высокой амплитудой ответа, превосходящей в 8-10 раз таковую у первичной версии, имеет низкую Kd (сотни нМ к различным лигандам), и низкую pH-чувствительностью в физиологическом диапазоне pH. Таким образом, разработанный биосенсор позволит изучать динамику длинноцепочечных ацил-КоА в режиме реального времени *in vivo*.

## GENETICALLY ENCODED FLUORESCENT BIOSENSOR FOR THE LONG-CHAIN FATTY acyl-CoA ESTERS DETECTION IN LIVING CELLS

Rapota D.D.<sup>1,2</sup>, Sudoplatov M.A.<sup>3</sup>, Bilan D.S.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, Russia, Moscow

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Russia, Moscow

<sup>3</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Russia, Moscow

\*E-mail: dianarapota7@gmail.com

Long-chain fatty acyl-CoA esters are key molecules in lipid metabolism and cell signalling. However, to date, *in vivo* studies of these molecules are limited due to the lack of tools for their visualization. The aim of this work was to develop a genetically encoded fluorescent biosensor to monitor the spatiotemporal dynamics of long-chain acyl-CoA in live cells. The created biosensor consists of a circularly permuted yellow fluorescent protein (cpYFP) and the acyl-CoA-binding transcription factor FadR from *V. cholerae*.

The primary version of the biosensor was obtained by integration of cpYFP into the flexible loop of FadR using overlap-extension PCR. A library of biosensor versions with random mutations was generated using the error-prone PCR method. The biosensor versions were selected based on the fluorescence intensity of the *E. coli* XL1-Blue bacterial clones expressing the biosensor and the ligand response amplitude. The fluorescence properties of purified proteins were examined using a Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter. To test the biosensor functionality in HEK 293T cells transfection with FuGENE HD reagent followed by wide-field fluorescence microscopy on Nikon ECLIPSE Ti2 was performed.

As a result, a variant with increased brightness and response amplitude to oleoyl-CoA and palmitoyl-CoA was selected. Its properties were characterized using a purified protein and HEK 293T cell culture. The instrument exhibits a ratiometric, reversible and selective fluorescence response on the purified protein and in HEK 293T cell culture after permeabilization with digitonin. The biosensor responds to acyl-CoA with a chain length greater than 12 carbon atoms. It has a high response amplitude, 8-10-fold greater than that of the primary version, low  $K_d$  (hundreds of nM to various ligands), and low pH sensitivity in the physiological pH range. Thus, the developed biosensor will make it possible to study the dynamics of long-chain acyl-CoA in real-time *in vivo*.

**КАЛЬЦИЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ОБЛАСТИ CA1 ГИППОКАМПА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ И ИЗВЛЕЧЕНИИ ПАМЯТИ ОБ ОБСТАНОВКЕ**

Рогожникова О.С.<sup>1,2,\*</sup>, Ивашкина О.И.<sup>1,2</sup>, Торопова К.А.<sup>1,2</sup>, Сотсков В.П.<sup>1,2</sup>,  
Плюснин В.В.<sup>1,2</sup>, Анохин К.В.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория нейронного интеллекта, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт перспективных исследований мозга, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт нормальной физиологии им. П. К. Анохина, Москва, Россия

\*E-mail: osrogozhnikova@gmail.com

Известно, что при формировании памяти о новом опыте у животного активируются нейроны во многих областях мозга. В частности, активируются нейроны области CA1 гиппокампа при формировании памяти о новой обстановке (Santarelli A.J., et al., 2018). При этом не вполне ясно как изменяется активность нейронов области CA1 при формировании и извлечении памяти. В нашей работе мы исследовали изменения кальциевой активности нейронов области CA1 гиппокампа при формировании и извлечении ассоциативной памяти об обстановке в модели усиления памяти предобучением.

Для этого мышам была проведена стереотаксическая операция по введению кальциевого флуоресцентного сенсора NCaMP7 в область CA1 гиппокампа (Subach O.M., et al., 2020). Затем в исследуемую область была вживлена GRIN-линза для регистрации кальциевой активности нейронов с помощью миниатюрного флуоресцентного микроскопа (минископа), закреплённого на голове мыши. Через неделю после этого была проведена процедура предобучения: мышей помещали в новую обстановку для знакомства с ней в течение 5 мин, в результате чего у мышей было сформировано пространственное представление об обстановке. Через три дня мышей кратковременно помещали в ту же обстановку и немедленно наносили электрокожное раздражение (ЭКР) в течение 2 с (1.5мА). Таким образом сформированное ранее представление об обстановке было ассоциировано с состоянием страха животного. Тестирование ассоциативной памяти мы проводили через три дня после нанесения ЭКР: мышей помещали в ту же обстановку на 5 мин. Мерой сформированной ассоциативной памяти у мышей являлся уровень их замирания в обстановке. Кальциевая активность отдельных нейронов области CA1 была зарегистрирована при первом посещении обстановки и при извлечении памяти. Мы оценивали изменение уровня нейронной активности каждой клетки в отдельный период замирания животного.

Нами было показано изменение кальциевой активности нейронов области CA1 гиппокампа в моменты замирания животного при первом посещении обстановки, а также при извлечении сформированной ассоциативной памяти об обстановке. Таким образом можно предположить, что нейроны области CA1 гиппокампа специфично вовлечены в процессы формирования и извлечения ассоциативной памяти.

*Работа была поддержана Междисциплинарной научно-образовательной школой МГУ им. М.В. Ломоносова «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект» и некоммерческим фондом поддержки науки и образования «ИНТЕЛЛЕКТ».*

**CALCIUM ACTIVITY OF THE CA1 AREA NEURONS DURING CONTEXTUAL FEAR MEMORY FORMATION AND RETRIEVAL**

Rogozhnikova O.S.<sup>1,2,\*</sup>, Ivashkina O.I.<sup>1,2</sup>, Toropova K.A.<sup>1,2</sup>, Sotskov V.P.<sup>1,2</sup>, Plusnin V.V.<sup>1,2</sup>, Anokhin K.V.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Neural Intelligence, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute for Advanced Brain Studies, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> P.K.Anokhin Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia

\*E-mail: osrogozhnikova@gmail.com

The memory formation of a new animal experience leads to activation of a distributed network of neurons across the brain. Specifically, the neurons in the CA1 area of the hippocampus activated during context memory formation (Santarelli A.J., et al., 2018). At the same time, it remains unclear what changes occur in activity of neurons in the CA1 area during context memory formation. In our work, we investigated changes in the calcium activity of neurons in the CA1 area during the contextual fear memory formation and retrieval.

To study activity of CA1 area neurons, mice were injected with the calcium fluorescent sensor NCaMP7 into CA1 area of the hippocampus (Subach O.M., et al., 2020). Next, we have implanted a 1 mm diameter GRIN-lens to make calcium imaging with miniature fluorescent microscopes (miniscopes). A week after that, mice were allowed for 5 min free exploration of a new context. As a result, the mice formed a spatial representation of the context. Three days later, mice were briefly placed in the same context and received immediate footshock (1.5 mA, 2 s). Thus, the previously formed representation about context was associated with the state of fear. We conducted contextual fear memory testing three days after applying the immediate footshock. As a measure of the context memory, we evaluated the freezing level of freezing. At the same time calcium activity of individual neurons of the CA1 area was recorded in mice during the first visit to the context and during memory retrieval. Therefore, we carried out an analysis of calcium activity specifically during freezing behavior in memory formation and retrieval.

Our research demonstrated that the calcium activity of neurons in the CA1 area was changed during freezing behavior at the first context exploration and during context memory retrieval. Thus, it can be assumed that the neurons of the CA1 area of the hippocampus are specifically involved in the processes of contextual fear memory formation and retrieval.

*Supported by the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University «Brain, Cognitive Systems, Artificial Intelligence» and by the Non-commercial Foundation for Support of Science and Education "INTELLECT".*

## ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В КАЧЕСТВЕ ОПТИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ И ИНСТРУМЕНТА ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КЛЕТОЧНУЮ СИГНАЛИЗАЦИЮ

Самигуллин Д.В.<sup>1,2,\*</sup>, Сибгатуллина Г.В.<sup>1</sup>, Жияяков Н.В.<sup>1</sup>, Сальников В.В.<sup>1</sup>,  
Мустафина А.Р.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

<sup>2</sup> Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева, Россия

<sup>3</sup> Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

\*E-mail: samid75@mail.ru

В последние годы магнитные наночастицы (МНЧ) являются одним из перспективных инструментов дистанционного неинвазивного воздействия на клетки и клеточную сигнализацию. Наличие флуоресцентных меток в МНЧ позволяет при помощи оптических методов контролировать поведение МНЧ в клетках, а адресное наложение магнитного поля позволяет дозированно управлять клеточной активностью и даже вызывать генерацию потенциалов действия в отдельных клетках. В настоящем исследовании мы оценили возможность изменения уровня кальция в клетках культуры моторных нейронов за счет наложения градиента магнитного поля на МНЧ, интернализированные в клетки. Для локальной манипуляции МНЧ использовали электромагнитную иглу (ЭИ), которая позволяет адресно воздействовать на отдельные клетки, загруженные МНЧ. В исследовании использовались МНЧ SPION с флуоресцентным комплексом  $[\text{Ru}(\text{dipy})_3]^{2+}$ . МНЧ были синтезированы в институте ИОФХ им. Арбузова. Исследования проводили на первичной культуре мотонейронов. Мотонейроны, инкубированные с МНЧ в течение 24 ч, загружались  $\text{Ca}^{2+}$  красителем Fluo3 AM в течение 30 мин. ЭИ подводили к клеткам на расстояние около 100 мкм с помощью микроманипулятора. Оценивали относительную флуоресценцию ( $\Delta F/F_0$ ) кальциевого красителя до и после включения ЭИ. Увеличение значения  $\Delta F/F_0$  на  $37,57 \pm 7,42$  ( $n=19$ ) после включения ЭИ четко указывают на увеличение внутриклеточного уровня  $\text{Ca}^{2+}$  во время магнитной стимуляции, которое имеет тенденцию возвращаться к исходному уровню в течение пятнадцати минут после снятия магнитного воздействия. Важно отметить, что без МНЧ магнитное поле не вызывало изменений флуоресценции кальциевого красителя в мотонейронах. Можно заключить, что повышение внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  является результатом приложения магнитного поля в присутствии МНЧ.

Таким образом, мы показали, что при помощи локального воздействия на МНЧ, интернализированные в мотонейроны, с помощью ЭИ возможно увеличивать уровень внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в отдельных клетках. Это в свою очередь, может использоваться для запуска различных внутриклеточных сигнальных цепочек и позволяет неинвазивно управлять клеточной активностью.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00731, <https://rscf.ru/project/22-25-00731/>.*



**APPLICATION OF FLUORESCENT MAGNETIC NANOPARTICLES AS OPTICAL SENSORS AND A TOOL TO AFFECT CELL SIGNALING**

Samigullin D.V.<sup>1,2,\*</sup>, Sibgatullina G.V.<sup>1</sup>, Zhilyakov N.V.<sup>1</sup>, Salnikov V.V.<sup>1</sup>, Mustafina A.R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

<sup>2</sup> Kazan National Research Technical University named after A.N. Tupolev–KAI, Kazan, Russia

<sup>3</sup> Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

\*E-mail: [samid75@mail.ru](mailto:samid75@mail.ru)

In recent years, magnetic nanoparticles (MNPs) are one of the promising tools for remote noninvasive action on cells and cell signaling. The presence of fluorophore in the MNPs makes it possible to monitor the behavior of the MNPs in cells using optical methods, and the targeted application of a magnetic field allows dosed control of cell activity and even induce the generation of action potentials in individual cells. In the present study, we evaluated the possibility of altering calcium levels in motor neuron culture cells by applying a magnetic field gradient to MNPs internalized in the cells. An electromagnetic needle (EN) was used for local manipulation of MNPs, which allows targeting individual cells loaded with MNPs. SPION MNPs with the fluorescent complex [Ru(dipy)3]2+ were used in the study. The MNPs were synthesized at the Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry. Studies were performed on primary culture of motoneurons. Motoneurons incubated with MNPs for 24 hours were loaded with Ca<sup>2+</sup> dye Fluo3 AM for 30 minutes. The EN was moved to the cells at a distance of about 100 μm using a micromanipulator. The relative fluorescence ( $\Delta F/F_0$ ) of the calcium dye was assessed before and after switching on the EN. The  $\Delta F/F_0$  increase of  $37.57 \pm 7.42$  (n=19) after EN activation clearly indicated an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> levels during magnetic stimulation, which tended to return to baseline levels within fifteen minutes after withdrawal of magnetic exposure. It is important to note that without MNPs, the magnetic field did not cause changes in calcium dye fluorescence in motoneurons. We can conclude that the increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> is the result of magnetic field application in the presence of MNPs.

Thus, we have shown that it is possible to increase the level of intracellular Ca<sup>2+</sup> in individual cells by local influence on MNPs internalized in motoneurons using EN. This, in turn, can be used to trigger various intracellular signaling chains and allows noninvasive control of cellular activity.

*Supported by grant No. 22-25-00731 from the Russian Science Foundation, <https://rscf.ru/project/22-25-00731/>.*

**РОЛЬ РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТ-ЦИКЛАЗЫ В ПРО-НОЦИЦЕПТИВНОМ ДЕЙСТВИИ  
ОКСИДА АЗОТА И МОНООКСИДА УГЛЕРОДА**Свитко С.О.<sup>1,\*</sup>, Ананьев А.С.<sup>1</sup>, Королёва К.С.<sup>1</sup>, Ситдикова Г.Ф.<sup>1</sup><sup>1</sup> Казанский (Приволжский) Федеральный Университет Институт Фундаментальной Медицины и Биологии, кафедра физиологии человека и животных, Казань, Россия*\*E-mail: palm-tree-web@yandex.ru*

Оксид азота (NO) и монооксид углерода (CO) представляют собой небольшие газообразные сигнальные молекулы, участвующие в различных биологических процессах, где одна из основных их функций заключается в регуляции тонуса сосудов. Известно, что нитроглицерин, донор NO, является триггером мигрени и широко используются для моделирования мигрени, как у человека, так и у животных, что предполагает участие компонентов сигнального каскада NO в патогенезе мигрени. Имеются литературные данные и об участии CO в механизмах патогенеза мигрени. Однако, нейрональные механизмы участия NO и CO в развитии мигрени практически не изучены. Согласно литературным, данным механизмы действия CO и NO могут быть связаны с активацией растворимой гуанилатциклазы (рГЦ). Циклические нуклеотиды, такие как рГЦ, цГМФ и цАМФ, участвуют в модуляции ноцицептивного сигнала за счет активации протеинкиназ, которые, в свою очередь, фосфорилируют мембранные каналы и рецепторы. В связи с этим, целью данной работы было выявление роли растворимой гуанилат-циклазы (рГЦ) в про-ноцицептивном действии NO и CO в афферентах тройничного нерва крысы. Эксперименты проводились на самцах (4–8 нед.) крыс линии Wistar. В работе использовали электрофизиологический метод регистрации потенциалов действия (ПД) тройничного нерва, иннервирующего твердую мозговую оболочку в препарате полочерепа крысы.

Для выявления роли растворимой гуанилат-циклазы в эффектах NO использовали ингибитор рГЦ ODQ в концентрации 10 мкМ. Инкубация препарата полочерепа крысы в ODQ в течение 20 мин не приводила к изменениям частоты ПД ( $n=4$ ;  $p = 0.87$ ). Базовая частота ПД в тройничном нерве составила  $187.5 \pm 86.2$  ПД за 5 мин и  $172.5 \pm 30.1$  ПД за 5 мин после 20 минутной инкубации в ODQ (10 мкМ) ( $n=4$ ;  $p = 0.87$ ). Последующее добавление НПН – нитропруссид натрия, донора NO в концентрации 200 мкМ, не вызывало достоверного изменения частоты ПД и к 10 мин аппликации частота ПД составила  $145.2 \pm 47.3$  ПД за 5 мин и к 15 мин  $129.7 \pm 50.8$  ПД за 5 мин ( $p = 0.62$ ); 20 мин  $127.1 \pm 40.3$  ПД за 5 мин ( $n=4$ ;  $p = 0.12$ ). Таким образом, нам удалось продемонстрировать, что ингибирование рГЦ путем использования ингибитора ODQ в концентрации 10 мкМ приводит к снижению про-ноцицептивного эффекта NO.

Для выявления роли растворимой гуанилат-циклазы в эффектах CO, в отдельной серии экспериментов, также использовали ODQ в концентрации 10 мкМ. Инкубация препарата полочерепа крысы в ODQ в течение 20 мин не приводила к изменениям частоты ПД ( $n=4$ ;  $p = 0.87$ ). Базовая частота ПД в тройничном нерве составила  $187.5 \pm 86.2$  ПД за 5 мин и  $172.5 \pm 30.1$  ПД за 5 мин после 20 минутной инкубации в ODQ (10 мкМ) ( $n=4$ ;  $p = 0.87$ ). Последующее добавление донора CO, CORM-2 (30 мкМ) не вызывало достоверного изменения частоты ПД и к 10 мин аппликации частота ПД составила  $145.2 \pm 47.3$  ПД за 5 мин и к 15 мин  $129.7 \pm 50.8$  ПД за 5 мин ( $p = 0.62$ ); 20 мин  $127.1 \pm 40.3$  ПД за 5 мин ( $n=4$ ;  $p = 0.12$ ). Нам удалось продемонстрировать, что использование ингибитора ODQ в концентрации 10 мкМ приводит к снижению про-ноцицептивного эффекта CO.

Полученные нами данные свидетельствуют о ведущей роли растворимой гуанилат-циклазы в эффектах экзогенных CO и NO в афферентах тройничного нерва крысы. Активация гуанилатциклазы приводит к синтезу цГМФ и активации протеинкиназы G, которая через процессы фосфорилирования может влиять на активность ионных каналов, рецепторов, играет важную роль в гомеостазе  $Ca^{2+}$ . Кроме того, стимуляция растворимой гуанилатциклазы с помощью VL-102 непосредственно может повышать экспрессию и высвобождение CGRP из нейронов тройничного ганглия. Участие гуанилатциклазы в про-ноцицептивных эффектах подтверждается также исследованиями, в которых ODQ оказывал антиноцицептивные эффекты после интратекальной инъекции в моделих воспалительной и нейропатической боли. Полученные нами данные вносят вклад в понимание нейрональных механизмов участия NO и CO в патогенезе мигрени, что в дальнейшем может играть роль для разработки специфических лекарственных средств, направленных на терапию мигрени.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 21-75-00042.*

## THE ROLE OF SOLUBLE GUANYLATE CYCLASE IN THE PRO-NOICEPTIVE EFFECTS OF NITRIC OXIDE AND CARBON MONOXIDE

Svitko S.O.<sup>1,\*</sup>, Ananiev A.S.<sup>1</sup>, Koroleva K.S.<sup>1</sup>, Sitdikova G.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kazan (Volga Region) Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology (IFMaB), Department of Human and Animal Physiology, Kazan, Russia

\*E-mail: [palmtree-web@yandex.ru](mailto:palmtree-web@yandex.ru)

Nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) are small gaseous signaling molecules involved in various biological processes, where one of their main functions is to regulate vascular tone. It is known that nitroglycerin, an NO donor, is a migraine trigger and is widely used to model migraine in both humans and animals, suggesting the involvement of components of the NO signaling cascade in the pathogenesis of migraine. There is also literature data on the involvement of CO in the mechanisms of migraine pathogenesis. However, the neuronal mechanisms of NO and CO involvement in the development of migraine are limitedly studied. According to the literature, the mechanisms of CO and NO action may be related to the activation of soluble guanylate cyclase (sGC). Cyclic nucleotides such as sGC, cGMP and cAMP are involved in the modulation of the nociceptive signal through the activation of protein kinases, which, in turn, can phosphorylate membrane channels and receptors. Therefore, the aim of this work was to reveal the role of soluble guanylate cyclase (sGC) in the pro-nociceptive action of NO and CO in rat trigeminal afferents.

Experiments were performed on male (4-8 weeks old) Wistar rats. We used the electrophysiological method of recording action potentials (AP) of the trigeminal nerve innervating the dura mater in a rat half-cranial preparation.

The sGC inhibitor ODQ at a concentration of 10  $\mu$ M was used to reveal the role of soluble guanylate cyclase in the effects of NO. Incubation of a rat half-cranial preparation in ODQ for 20 min resulted in no change in AP frequency ( $n=4$ ;  $p=0.87$ ). The baseline AP frequency in the trigeminal nerve was  $187.5 \pm 86.2$  APs per 5 min and  $172.5 \pm 30.1$  APs per 5 min after 20 min incubation in ODQ (10  $\mu$ M) ( $n=4$ ;  $p = 0.87$ ). Subsequent addition of sodium nitroprusside (SNP), an NO donor at a concentration of 200  $\mu$ M, did not cause a significant change in AP frequency and by 10 min of application the AP frequency was  $145.2 \pm 47.3$  APs per 5 min and by 15 min  $129.7 \pm 50.8$  APs per 5 min ( $p = 0.62$ ); by 20 min  $127.1 \pm 40.3$  APs per 5 min ( $n=4$ ;  $p = 0.12$ ). Thus, we were able to demonstrate that inhibiting sGC by using an ODQ at a concentration of 10  $\mu$ M leads to a decrease in the pro-nociceptive effect of NO.

To reveal the role of soluble guanylate cyclase in the effects of CO, ODQ at a concentration of 10  $\mu$ M was also used in a separate series of experiments. Incubation of a rat half-cranial preparation in ODQ for 20 min did not result in changes in the AP frequency ( $n=4$ ;  $p = 0.87$ ). The baseline AP frequency in the trigeminal nerve was  $187.5 \pm 86.2$  APs per 5 min and  $172.5 \pm 30.1$  APs per 5 min after 20 min incubation in ODQ (10  $\mu$ M) ( $n=4$ ;  $p = 0.87$ ). Subsequent addition of the CO donor, CORM-2 (30  $\mu$ M) did not cause a significant change in AP frequency and by 10 min of application the AP frequency was  $145.2 \pm 47.3$  APs per 5 min and by 15 min  $129.7 \pm 50.8$  APs per 5 min ( $p = 0.62$ ); by 20 min  $127.1 \pm 40.3$  APs per 5 min ( $n=4$ ;  $p = 0.12$ ). We were able to demonstrate that the use of an sGC inhibitor, ODQ at a concentration of 10  $\mu$ M leads to a decrease in the pro-nociceptive effect of CO.

Our data indicate a leading role of soluble guanylate cyclase in the effects of exogenous CO and NO in rat trigeminal afferents. Activation of guanylate cyclase leads to the synthesis of cGMP and activation of protein kinase G, which through phosphorylation processes can influence the activity of ion channels, receptors, and plays an important role in Ca<sup>2+</sup> homeostasis. In addition, stimulation of soluble guanylate cyclase with VL-102 can directly increase the expression and release of CGRP from trigeminal ganglion neurons. The involvement of guanyl cyclase in pro-nociceptive effects is also supported by studies in which ODQ exerted antinociceptive effects after intrathecal injection in models of inflammatory and neuropathic pain. Our findings contribute to the understanding of the neuronal mechanisms of NO and CO involvement in the pathogenesis of migraine, which may play a role for the development of specific drugs aimed at migraine therapy in the future.

Supported by the Russian Science Foundation No. 21-75-00042.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ДИНАМИКИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПАРАМЕТРОВ ТКАНЕЙ *Danio rerio*

Сергеева А.Д.<sup>1,3,\*</sup>, Панова А.С.<sup>1,2</sup>, Кельмансон И. В.<sup>1,2</sup>, Иванова А.Д.<sup>1</sup>,  
Чеботарев А.С.<sup>4,5</sup>, Храмова Ю. В.<sup>3,1</sup>, Трифонова А.П.<sup>1</sup>, Васильев А.В.<sup>1</sup>,  
Белоусов В.В.<sup>1,2,6</sup>, Ланин А.А.<sup>4,5</sup>, Билан Д.С.<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии. им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

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

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва;

<sup>4</sup> Физический факультет МГУ, Москва, Россия

<sup>5</sup> Российский квантовый центр, Сколково, Россия

<sup>6</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Россия

\*E-mail: d.s.bilan@gmail.com, nnastasiia@gmail.com

*Danio rerio* - популярный объект для исследования различных параметров *in vivo* и моделирования патологий, в том числе социально значимых заболеваний человека. Геном зебрафиш обладает высокой степенью гомологии с геномом человека, а прозрачность тканей на личиночной стадии является преимуществом для исследований методом флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентных генетически кодируемых биосенсоров. При помощи сенсоров *SupHer3s* (индикатор pH), *HyPer7* (индикатор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и *Nurocrates* (индикатор гипогалогенных кислот) мы регистрировали динамику внутриклеточных параметров тканей зебрафиш в условиях гипоксии-реоксигенации и на типичной модели воспаления - ампутации хвостового плавника.

Экспрессии биосенсора в тканях зебрафиш достигали путём инъекции раствора мРНК сенсора в желточный мешок на стадии зиготы, либо получением трансгенных линий по системе *Tol2*-транспозона. На стадии 2dpf мальков анестезировали MS-222, помещали в условия гипоксии-реоксигенации (~0,1 и ~18% O<sub>2</sub>), смоделированные с использованием проточной установки. Ампутацию хвостового плавника проводили микрохирургическим скальпелем. При этом флуоресцентный сигнал биосенсоров фиксировали в режиме реального времени на инвертированном флуоресцентном микроскопе.

pH цитоплазмы клеток сердца и головного мозга за 1ч гипоксии закислялся на 0,6 ед. Сигнал *HyPer7* в цитоплазме клеток данных областей снижался на 10% от базового уровня во время гипоксии, что соответствует снижению уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. При этом в цитоплазме скелетной мускулатуры за то же время pH снизился на 0,4 ед., а сигнал *HyPer7* оставался стабильным, но в ответ на реоксигенацию наблюдали его рост на 10%. Содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в матриксе митохондрий в период гипоксии во всех трёх случаях возрастало. Амплитуда ответа сенсора в сердечной ткани составила 10%, а в остальных случаях - 30%.

На модели ампутации хвостового плавника продемонстрировано проникновение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, синтезируемой поврежденными клетками, в матрикс митохондрий: сигнал *HyPer7* возрастал в 3 раза в течение 10 минут после ранения. Также при помощи сенсора *Nurocrates* мы показали отсутствие воздействия гипохлорит-аниона на привлекаемые к ране нейтрофилы, что предполагает наличие у этих клеток защиты от повреждения данным веществом.

**THE APPLICATION OF GENETICALLY ENCODED BIOSENSORS IN THE REGISTRATION OF THE DYNAMICS OF INTRACELLULAR TISSUE PARAMETERS OF *DANIO RERIO***

Sergeeva A.D.<sup>1,3,\*</sup>, Panova A.S.<sup>1,2</sup>, Kelmanson. I.V.<sup>1,2</sup>, Ivanova A.D.<sup>1</sup>, Chebotarev A.S.<sup>4,5</sup>, Khranova Y.V.<sup>3,1</sup>, Trifonova A.P.<sup>1</sup>, Vasiliev A.V.<sup>1</sup>, Belousov V.V.<sup>1,2,6</sup>, Lanin A.A.<sup>4,5</sup>, Bilan D.S.<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Medical Research University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Faculty of Physics, Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>5</sup> Russian Quantum Centre, Skolkovo, Russia

<sup>6</sup> Federal Centre of Brain and Neurotechnologies, Moscow, Russia

\*E-mail: d.s.bilan@gmail.com, nnastasia@gmail.com

*Danio rerio* is a popular object for studying various *in vivo* parameters and modeling pathologies, including socially significant human diseases. The zebrafish genome has a high degree of homology with the human genome, while the transparency of tissues at the larval stage is of advantage for fluorescent microscopy using fluorescent genetically encoded biosensors. We recorded the dynamics of intracellular tissue parameters of zebrafish under hypoxia-reoxygenation conditions and in a typical inflammation model of tail fin amputation using SypHer3s (pH indicator), HyPer7 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicator) and Hypocrates (hypogalous acid indicator) sensors.

The expression of the biosensor in zebrafish tissues was achieved by injecting the sensor mRNA solution into the yolk sac at the zygotic stage or by obtaining transgenic lines via the Tol2-transposon system. At the 2dpf stage, larvae were anesthetized with MS-222 and placed under hypoxia-reoxygenation conditions (~0.1 and ~18% O<sub>2</sub>) which were modeled with a flow-through setup. Amputation of the caudal fin was performed with a microsurgical scalpel. The fluorescent signal of the biosensors was recorded real-time on an inverted fluorescent microscope.

The cytoplasmic pH of heart and brain cells was acidified by 0.6 units during 1h of hypoxia. The HyPer7 signal in the cytoplasm of cells in these areas decreased by 10% from its baseline level during hypoxia, which corresponds to a decrease in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level. However, in the cytoplasm of skeletal muscle the pH decreased by 0.4 units during the same time and the HyPer7 signal remained stable, but an increase of 10% was observed in response to reoxygenation. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in the mitochondrial matrix increased during hypoxia in all three cases. The amplitude of the sensor response in cardiac tissue reached 10%, and in the other cases the increase was 30%.

In a model of caudal fin amputation, the permeation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesized by damaged cells into the mitochondrial matrix was demonstrated: the HyPer7 signal increased 3-fold within 10 minutes after the injury. We also showed no effect of hypochlorite anion on neutrophils attracted to the wound using the Hypocrates sensor, which suggests that these cells have a defense against being damaged by this substance.

## **ВЛИЯНИЕ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕТАНИЗАЦИИ НЕЙРОНОВ НЕОКОРТЕКСА НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ИХ ЗРИТЕЛЬНЫХ ОТВЕТА**

Смирнов И.В.\*, Осипова А.А., Бородинова А.А., Смирнова М.П., Малышев А.Ю.  
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия  
\*E-mail: [ivan.vas.smirnov@gmail.com](mailto:ivan.vas.smirnov@gmail.com)

Известно, что хеббовская ассоциативная пластичность может лежать в основе долговременных изменений характеристик зрительных рецептивных полей единичных нейронов во взрослом мозге. Другим видом синаптической пластичности является гетеросинаптическая пластичность, которая, согласно ряду исследований, выполняет гомеостатическую функцию и участвует в некоторых видах обучения. Тем не менее, участие данного вида пластичности в динамической модификации рецептивных полей остаётся неизученным. В ходе нашей работы мы исследовали роль гетеросинаптической пластичности в модификации сенсорных ответов единичных нейронов первичной зрительной коры мыши.

Основным протоколом индукции гетеросинаптической пластичности в наших экспериментах является внутриклеточная тетанизация нейрона пачками потенциалов действия. Поскольку долговременная внутриклеточная регистрация *in vivo* затруднительна и является инвазивной для исследуемого нейрона, в ходе нашей работы мы применили юкстраклеточную регистрацию активности нейронов и их оптогенетическую стимуляцию с помощью оптического волокна, заведенного внутрь регистрирующего микроэлектрода. Данный подход позволял нам достаточно селективно стимулировать только регистрируемые нейроны. Поскольку кинетические характеристики классического ChR2 не обеспечивают достаточной для индукции гетеросинаптической пластичности частоты генерации потенциалов действия в ходе нашей работы мы использовали быстрый светочувствительный канал oChIEF. Ген данного белка доставлялся в нейроны 2/3 слоя первичной зрительной коры мышей линии C57B6 с помощью аденоассоциированных вирусов 2го серотипа (pAAV-CamKII-oChIEF-Venus). В ходе эксперимента на наркотизированных животных в течении 30-40 минут производилась регистрация зрительных ответов, после чего производилась оптогенетическая тетанизация, вызывающая в исследуемом нейроне пачки потенциалов действия с частотой от 75 до 100 Гц, после чего мы продолжали регистрировать зрительные ответы исследуемых нейронов по крайней мере в течении 40 минут.

В ходе анализа данных мы обнаружили достоверные изменения постстимульных гистограмм ответов на зрительные стимулы после тетанизации по сравнению с контролем. Таким образом, мы показали, что, используя неинвазивный метод регистрации и стимуляции нейронов и не подавляя спонтанную активность, путем применения высокочастотной тетанизации возможно вызвать в структуре зрительных ответов долговременные изменения, которые развиваются, по всей видимости, по механизмам гетеросинаптической пластичности.

**OPTOGENETIC TETANIZATION OF NEOCORTEX NEURONS CAN CHANGE THE CHARACTERISTICS OF THEIR VISUAL RESPONSE**

Smirnov I.V. \*, Osipova A.A., Borodinova A.A., Smirnova M.P., Malyshev A.Y.  
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia  
*\*E-mail: ivan.vas.smirnov@gmail.com*

It is known that Hebbian associative plasticity may underlie long-term changes in the characteristics of the visual receptive fields of single neurons in the adult brain. Another type of synaptic plasticity is heterosynaptic plasticity, which, according to a number of studies, performs a homeostatic function and is involved in some types of learning. However, the involvement of this type of plasticity in the dynamic modification of receptive fields remains unexplored. In the course of our work, we investigated the role of heterosynaptic plasticity in the modification of sensory responses of single neurons in the mouse primary visual cortex.

The main protocol for the induction of heterosynaptic plasticity in our experiments is the intracellular tetanization of a neuron by bursts of action potentials. Since long-term intracellular recording *in vivo* is difficult and invasive for the recorded neuron in the course of our work, we used the juxtacellular recording of neuronal activity and their optogenetic stimulation using an optical fiber inserted inside the recording microelectrode. This approach allowed us to selectively stimulate only registered neurons. Since the kinetic characteristics of classical ChR2 do not provide sufficient for the induction of heterosynaptic plasticity, the frequency of generation of action potentials, we used the fast light-sensitive ion channel oChIEF. The gene of this protein was delivered to the neurons of layer 2/3 of the primary visual cortex of C57B6 mice using adeno-associated viruses of the 2nd serotype (pAAV-CamKII-oChIEF-Venus). During the experiment on anesthetized animals, visual responses were recorded for 30–40 minutes, after which optogenetics tetanization was performed, causing bursts of action potentials with a frequency of 75 to 100 Hz in the studied neuron, after which we continued to record visual responses of the studied neurons at least within 40 minutes.

In the course of data analysis, we found significant changes in post-stimulus histograms of responses to visual stimuli after tetanization compared with the control. Thus, we have shown that, using a non-invasive method of recording and stimulating neurons and not suppressing spontaneous activity, it is possible to induce long-term changes in the structure of visual responses by using high-frequency tetanization, which develop, apparently, through the mechanisms of heterosynaptic plasticity.

## **АНАЛИЗ АФФЕРЕНТНЫХ ВХОДОВ К БАЗОЛАТЕРАЛЬНОМУ ЯДРУ МИНДАЛИНЫ КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕТРОГРАДНОГО АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСНОГО ВЕКТОРА**

Смирнова М.П.

Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва, Россия  
*\*E-mail: rymarik@gmail.com*

Одной из ключевых структур, участвующих в регуляции тревоги и страха является базолатеральное ядро миндалины. Для понимания роли миндалины в регуляции поведения важно знать ее анатомические связи с другими структурами мозга. Несмотря на большое количество работ (в основном на мышах), посвященных изучению анатомических связей миндалины, понимание архитектуры этих связей остается не полным и не систематизированным, без детальной карты афферентных и эфферентных проекций на уровне целого мозга. Кроме того, подавляющая часть работ проведена с использованием традиционных химических трейсеров, имеющих ряд недостатков, которые могут приводить к ошибочной интерпретации данных. Вместе с тем, применение оптогенетического метода для исследования роли миндалины требует детальной картины связей миндалины с другими структурами.

В настоящее время для исследования анатомических связей структур мозга широко используют нейрональные вирусные трейсеры, которые имеют ряд преимуществ перед химическими трейсерами. В частности, вирусные векторы имеют более высокую специфичность направленности аксонального транспорта, обеспечивают более высокий и стабильный уровень экспрессии флуоресцентного белка, а также имеют меньшую цитотоксичность. Более широкое распространение получили векторы на основе рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (rAAVs). Одним из таких векторов является rAAV2-retro, который позволяет получить доступ к проекционным нейронам ретроградным способом и характеризуется высокой селективностью ретроградного транспорта [Tervo DG et al., 2016]. Кроме того, данный вектор позволяет делать локальные инъекции, получая при этом высокий уровень экспрессии, что особо актуально для изучения связей ядер миндалины.

В настоящей работе с помощью унилатерального введения вектора rAAV2-retro, в базолатеральное ядро миндалины крыс, была установлена локализация клеток, дающих афферентные проекции к нейронам миндалины. Наиболее крупные источники ипсилатеральных афферентных проекций к базолатеральной миндалине обнаружены в ядрах таламуса (паравентрикулярном, центрo-медиальном, ретикулярном, вентральном постеролатеральном и постеромедиальном), скорлупе, наружном сегменте бледного шара, латеральной части черной субстанции и пириформной коре. Как ипси-, так и контрлатеральные проекции обнаружены из вентромедиального гипоталамуса, оградаы, субталамического ядра, медиальной префронтальной, инсулярной, энторинальной, периринальной и энторинальной коры. Клетки, дающие проекции в контрлатеральное полушарие находятся в небольшом количестве в передней и вентральной части базолатерального ядра миндалины.

Полученные данные важны для понимания роли миндалины в регуляции разных форм поведения, а также помогают определить мишени для дальнейших исследований механизмов тревожности и страха с привлечением оптогенетических методов. В исследовании были использованы вирусные векторы, созданные в Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, VA, USA.

*Работа поддержана грантом РФФ № 22-15-00327.*



**RETROGRADE NEUROANATOMICAL LABELLING OF INPUTS TO THE RAT  
BASOLATERAL AMYGDALA WITH ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR**

Smirnova M.P.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of  
Sciences, Moscow, Russia

*\*E-mail: rymarik@gmail.com*

The amygdala, mainly the basolateral nucleus, is a key component in the regulation of fear and anxiety. To fully understand how amygdala nuclei regulate anxiety and fear, it is necessary to identify how amygdalar input-output neuronal circuits are organized. Although the afferent and efferent projections of the amygdala have been previously characterized in several rodent species, mainly in mice, a detailed whole-brain map of inputs to the basolateral amygdala in rats is still lacking. Moreover, the vast majority of the tracing studies have been done using conventional chemical tracers that have some limitations resulting in misinterpretation of data. But detailed map of afferent and efferent projections of the amygdala is necessary for optogenetic dissection of amygdala functioning.

In recent years recombinant viral vectors have been widely adopted as alternatives to conventional chemical tracers because of their directional specificity, high-level transgene expression and low toxicity. Now recombinant adeno-associated viruses (rAAVs) constitute some of the most widespread vectors in neuroscience research. It is particularly noteworthy the recent development of a synthetic AAV capsid (rAAV2-retro) that drives retrograde transduction with particularly high efficiency and selectivity (Tervo et al., 2016). This vector is compatible with small injection volumes which is especially important when investigating anatomical connections of small structures such as amygdalar nuclei.

In the present work rAAV2-retro carrying fluorescent protein was injected into the rat basolateral amygdala unilaterally to reveal inputs to the amygdala from other brain regions. It was shown that the amygdala receives massive ipsilateral projections from the thalamic nuclei (paraventricular, central medial, reticular, ventral posterolateral and posteromedial), putamen, globus pallidus, lateral part of substantia nigra and piriform cortex. The projections from ventromedial hypothalamus, claustrum, subthalamic nucleus, medial prefrontal, insular, entorhinal, perirhinal and entorhinal cortices are bilateral. Scarce labelling was observed in basolateral amygdala in the contralateral hemisphere, mainly in anterior and ventral part of the nucleus.

The results presented in this work describe the pattern of afferent projections to the basolateral amygdala in rats that is important to understand functions of the amygdala. Moreover, these findings provide information about new target for the future optogenetic manipulations with neural circuits underlying fear and anxiety.

Viral vectors were provided by Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, VA, USA.

*Supported by RSF № 22-15-00327.*

## ЭНГРАММА СЛОЖНЫХ СИГНАЛОВ В МОЗГЕ МЫШИ: РАЗЛИЧНЫЕ НЕЙРОНАЛЬНЫЕ СЕТИ ДЛЯ КОМПЛЕКСНОГО УСЛОВНОГО СТИМУЛА И ЕГО ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Торопова К.А.<sup>1,2,\*</sup>, Ивашкина О.И.<sup>1,2</sup>, Рощина М.А.<sup>3</sup>, Анохин К.В.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Институт перспективных исследований мозга МГУ, Россия, Москва

<sup>2</sup> Лаборатория нейронного интеллекта, МГУ, Россия, Москва

<sup>3</sup> Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Россия, Москва

<sup>4</sup> Институт нормальной физиологии им. П. К. Анохина, Москва, Россия

\*E-mail: [xen.alexander@gmail.com](mailto:xen.alexander@gmail.com)

Естественные ситуации обучения обычно включают комплексные стимулы, состоящие из нескольких сенсорных модальностей. Элементарные теории обучения предполагают, что каждый компонент комплексного сигнала кодируется в мозге и ассоциируется с подкреплением независимо от других компонентов. Конфигуральные же теории предсказывают, что формируется репрезентация полного комплексного сигнала, которая затем может быть ассоциирована с подкреплением. Нами была разработана модель условно-рефлекторного замирания на комплексный условный сигнал или его отдельные световой и звуковой компоненты у мышей. Данная модель была использована, чтобы проверить рассмотренные выше альтернативные теории. Во-первых, нами была исследована динамика памяти о комплексном условном сигнале и его компонентах. Мы обнаружили, что память о данных компонентах созревает в течение различных промежутков времени после обучения. Сходная диссоциация этих форм памяти была обнаружена в экспериментах по угашению. Во-вторых, нами был проведен c-Fos имиджинг активности клеток в фронтальной, прелимбической, цингулярной, ретроспленальной, париетальной, первичной и вторичной зрительных, первичной и вторичной слуховых областях неокортекса после обучения на полный комплексный сигнал или его компоненты. Было обнаружено, что обучение на комплексный сигнал и дискретные сигналы вызывают различные паттерны активации неокортекса – прелимбическая и фронтальная ассоциативная области коры активировались при обучении на комплексный, но не на дискретные сигналы. В-третьих, мы показали, что только извлечение памяти о полном комплексном сигнале, но не о его компонентах, активировало прелимбическую, париетальную, первичную зрительную области неокортекса, а также медиолатеральную область вторичной зрительной коры. В-четвертых, нами был проведен *in vivo* двухфотонный имиджинг вызванной реактивацией памяти экспрессии c-Fos в париетальной коре трансгенных мышей линии fos-EGFP. Мы обнаружили, что существуют по крайней мере три популяции нейронов с различной специфичностью ответов на комплексный сигнал и его компоненты. Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что комплексные сигналы могут иметь как интегральные, так и элементарные репрезентации. Эти репрезентации могут использоваться в поведении независимо, а также иметь различную динамику в долговременной памяти.

*Поддержано грантом РФФ № 23-78-00010.*

**ENGRAM FOR THE COMPLEX WORLD SIGNALS IN THE MOUSE BRAIN:  
DIFFERENT NEURONAL CIRCUITS FOR COMPOUND CONDITIONING STIMULUS  
AND ITS INDIVIDUAL COMPONENTS**

Toropova K.A.<sup>1,2,\*</sup>, Ivashkina O.I.<sup>1,2</sup>, Roshchina M.A.<sup>3</sup>, Anokhin K.V.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Institute for advanced brain studies MSU, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Laboratory of Neuronal Intelligence, MSU, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Anokhin Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia

\*E-mail: [xen.alexander@gmail.com](mailto:xen.alexander@gmail.com)

Natural learning generally involves complex stimuli consisting of several sensory modalities. Elemental learning theories suggest that each component of compound signal is encoded and associated separately. Configural theories predict that representation of the entire complex signal is formed and is associated with the second event. We developed a mouse model of fear conditioning to a compound tone-light cue or its separate components and used it to test these alternative theories. First, we studied the dynamics of memories for compound cue and its separate components and found that they mature over different time after conditioning. The same dissociation of these memories was observed in the extinction experiments. Second, we performed c-Fos imaging of cellular activity in frontal, prelimbic, cingular, retrosplenial, parietal, primary and secondary visual, primary and secondary auditory cortices after conditioning to the entire compound cue or to its components. We found that compound-cue and single-cue conditioning produced distinct patterns of cortical activation - prelimbic and frontal associative cortices were activated by conditioning to compound cue but not to single cues. Third, we showed that only retrieval of memory by the entire compound cue but not by single cues activated prelimbic, parietal, primary visual and mediolateral secondary visual cortices. Fourth, we performed *in vivo* two-photon imaging of retrieval-induced c-Fos expression in the parietal cortex of fos-EGFP transgenic mice and found that there are at least three neuronal populations with different response specificity to the compound signal and its components. Taken together, our data suggests that complex signals can establish both integral and elemental neuronal representations, these representations can be used separately in behavior and can have different dynamics in the long-term memory.

*Supported by RSF 23-78-00010.*

## ФОТОСТИМУЛЯЦИИ ПАРВАЛЬБУМИНОВЫХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ КАК МЕТОД КОНТРОЛЯ ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ АКТИВНОСТИ

Трофимова А.М.\*, Постникова Т.Ю., Проскурина Е.Ю., Зайцев А.В.  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия  
*\*E-mail: alina.trofimova1132@mail.ru*

Низкочастотная электрическая стимуляция мозга используется для подавления судорожной активности у людей с эпилепсией. Низкочастотная стимуляция определенных типов клеток, например, оптогенетическая активация тормозных парвальбуминовых (PV) интернейронов, может рассматриваться как перспективный метод лечения резистентных форм эпилепсии. В данной работе мы исследовали влияние фотостимуляции PV-интернейронов на эпилептиформную активность в гиппокампе и энторинальной коре мозга мыши.

Работа была выполнена на 4-месячных мышах B6.129P2-*Pvalb<sup>tm1(cre)Arbr/J</sup>* (JacksonLab), экспрессирующих Cre-рекомбиназу в PV-интернейронах. Мышам по стереотаксическим координатам (AP: -4 мм, ML: 3,5 мм, DV: -3,5 мм) вводили аденоассоциированный вирусный конструктор (AAV9-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-mCherry), несущий ген каналородопсина 2-го типа (ChR2), в поле CA1 гиппокампа на границе с энторинальной корой. Эксперименты проводили через 4–5 недель на переживающих срезах головного мозга. Активацию интернейронов, экспрессирующих ChR2, проводили светом с длиной волны 470 нм с использованием лазерного диод-волоконного источника света. Эпилептиформную активность вызывали в срезе аппликацией проэпилептического раствора с 4-аминопиридином (100 мкМ). Регистрацию полевых потенциалов производили в поле CA1 гиппокампа и/или энторинальной коре в зависимости от локализации экспрессии ChR2.

Мы определили оптимальную частоту и длительность фотостимуляции, воздействующую на иктальную активность в гиппокампе и энторинальной коре мозга мышей. В поле CA1 гиппокампа фотостимуляция с частотой 1 Гц и длительностью световой вспышки не менее 15 мс вызывала регулярную интериктальную активность. Эта индуцированная интериктальная активность полностью подавляла возникновение иктальных разрядов в срезе мозга. В энторинальной коре оптимальная частота фотостимуляции PV-интернейронов, задающая ритмическую интериктальную активность, равнялась 0,33 Гц; при этом фотостимуляция с более высокой частотой (от 1 Гц и выше) не влияла на протекание эпилептической активности в срезе.

Низкочастотная фотостимуляция PV-интернейронов приводит к переходу иктальной активности в интериктальную. Использование низкочастотной оптогенетической стимуляции PV-интернейронов представляется перспективным подходом в контроле и подавлении судорожной активности.

*Работа поддержана грантом РНФ №23-25-00427.*

## PHOTOSTIMULATION OF PARVALBUMIN INTERNEURONS AS A METHOD TO CONTROL EPILEPTIFORM ACTIVITY

Trofimova A.M.\*, Postnikova T.Y., Proskurina E.Y., Zaitsev A.V.

The Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg, Russia

\*E-mail: [alina.trofimova1132@mail.ru](mailto:alina.trofimova1132@mail.ru)

Low-frequency electrical stimulation of the brain is used to suppress seizure activity in people with epilepsy. Low-frequency stimulation of certain cell types, such as optogenetic activation of inhibitory parvalbumin (PV) interneurons, can be considered as a promising method for the treatment of resistant forms of epilepsy. In this study, we investigated the effects of PV interneuron photostimulation on epileptiform activity in the mouse hippocampus and entorhinal cortex.

The work was performed on 4-month-old B6.129P2-Pvalbtm1(cre)Arbr/J (JacksonLab) mice expressing Cre recombinase in PV interneurons. Adeno-associated viral construct (AAV9-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-mCherry) carrying the canalorhodopsin type 2 gene (ChR2) was injected into the CA1 field of the hippocampus at the border with the entorhinal cortex by stereotactic coordinates (AP: -4 mm, ML: 3.5 mm, DV: -3.5 mm). Experiments were performed after 4-5 weeks on surviving brain slices. Activation of interneurons expressing ChR2 was performed with 470 nm wavelength light using a laser diode-fiber light source. Epileptiform activity was induced in the slice by application of pro-epileptic solution with 4-aminopyridine (100  $\mu$ M). Field potentials were recorded in the CA1 field of the hippocampus and/or entorhinal cortex, depending on the localization of ChR2 expression.

We determined the optimal frequency and duration of photostimulation affecting ictal activity in mouse hippocampus and entorhinal cortex. In the CA1 field of the hippocampus, photostimulation with a frequency of 1 Hz and a light flash duration of at least 15 ms induced regular interictal activity. This induced interictal activity completely suppressed the occurrence of ictal discharges in the brain slice. In the entorhinal cortex, the optimal photostimulation frequency of PV interneurons, which set the rhythmic interictal activity, was 0.33 Hz, while photostimulation with higher frequency (1 Hz and higher) had no effect on the course of epileptic activity in the slice.

Low-frequency photostimulation of PV interneurons leads to a transition from ictal to interictal activity. The use of low-frequency optogenetic stimulation of PV-interneurons seems to be a promising approach to control and suppression of seizure activity.

*This work was supported by grant RSF №23-25-00427.*

**СВЯЗЬ КАЛЬЦИЕВОЙ АКТИВНОСТИ В АСТРОЦИТАХ ГИППОКАМПА С ПОВЕДЕНИЕМ МЫШЕЙ**

Федотова А.А.<sup>1,2,\*</sup>, Тяглик А.Б.<sup>1,2</sup>, Солотенков М.А.<sup>3</sup>, Федотов И.В.<sup>3,4</sup>, Браже А.Р.<sup>1,2</sup>, Федотов А.Б.<sup>3,4</sup>, Желтиков А.М.<sup>3,4,5</sup>, Семьянов А.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии РАН, отдел молекулярной нейробиологии, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет, биологический факультет, Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет, физический факультет, Москва, Россия

<sup>4</sup> Российский квантовый центр, Сколково, Московская область, Россия

<sup>5</sup> Техасский университет A&M, факультет физики и астрономии, Колледж-Стейшен, Техас, США

\*E-mail: fedotova.brain@gmail.com

Многочисленные работы связывают астроцитарную кальциевую активность с различными состояниями мозга (сон, бодрствование и т.д.). Однако исследования активности кальция в астроцитах в глубоких структурах мозга у свободно подвижных животных практически отсутствуют. Чтобы исследовать связь астроцитарной кальциевой активности в области CA1 гиппокампа со специфическим поведением мышей, мы использовали метод фотометрической регистрации сигнала генетически кодируемого индикатора кальция GCaMP6f, экспрессированного в астроцитах под специфическим промотором. Кальциевая визуализация и регистрация поведения мышей проводились одновременно. Мы исследовали астроцитарную кальциевую активность в гиппокампе мышей, перемещающихся в открытом поле и выполняющих тесты на социальность и социальную новизну. Локомоция была связана с увеличением кальциевого сигнала в астроцитах гиппокампа. В тесте на социальную новизну наблюдалось повышение уровня кальция, не коррелирующее с бегом, что указывает на вовлечение астроцитов в социальное поведение. Кроме того, мы обнаружили синхронизацию кальциевого сигнала между полушариями, что может указывать на системную активацию астроцитов под действием нейромодуляторных проекций (например, норадренергических из *locus coeruleus*). Таким образом, мы заключаем, что, как и в случае нейронной активности, изменения кальциевой активности в астроцитах являются специфичными для различных типов поведения животных.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 22-14-00033).*

**CALCIUM ACTIVITY IN HIPPOCAMPAL ASTROCYTES IS LINKED TO SPECIFIC  
MOUSE BEHAVIOR**

Fedotova A.A.<sup>1,2</sup>, Tiaglik A.B.<sup>1,2</sup>, Solotnikov M.A.<sup>3</sup>, Fedotov I.V.<sup>3,4</sup>, Brazhe A.R.<sup>1,2</sup>,  
Fedotov A.B.<sup>3,4</sup>, Zheltikov A.M.<sup>3,4,5</sup>, Semyanov A.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Department of Molecular Neurobiology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Moscow State University, Physics Department, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Russian Quantum Center, Skolkovo, Moscow Region, Russia

<sup>5</sup> Texas A&M University, Department of Physics and Astronomy, College Station, TX, USA

*\*E-mail: fedotova.brain@gmail.com*

Numerous reports link astrocytic calcium dynamics to a range of brain states (sleep, wakefulness, brain perfusion etc.). However, studies of calcium activity in astrocytes in deep brain structures in freely moving animals are limited. To link astrocytic calcium activity in stereotaxically targeted CA1 area of the hippocampus to specific behaviors, we used fiber photometry of GCaMP6f expressed in astrocytes. Calcium imaging and mouse behavior tracking were performed simultaneously. We examined astrocytic calcium activity of mice navigating in an open field and performing sociability and social novelty tests. Locomotion was associated with an increased calcium signal with a distinct spatial pattern. In the social novelty test, we also detected calcium elevations uncorrelated with running, indicating the involvement of astrocytes in social behavior. Besides, we found synchronization of the calcium signal between hemispheres, which may indicate systemic activation of astrocytes by neuromodulatory projections (e.g., noradrenergic). Thus, we conclude that similar to neuronal firing, changes in astrocytic calcium activity are specific to animal behavior.

*Supported by the Russian Science Foundation (grant 22-14-00033).*

**ОКСИДАЗА D-АМИНОКИСЛОТ *R. GRACILIS* КАК ХЕМОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ГЕНЕРАЦИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ГЕПАТОЦИТАХ**

Шохина А.Г.<sup>1,2,3,\*</sup>, Стародубова В.Д.<sup>1</sup>, Ланин А.А.<sup>4,5</sup>, Чеботарев А. С.<sup>4,5</sup>, Мартынов Г.Н.<sup>4,5</sup>, Ледяева В.С.<sup>1</sup>, Мощенко А.А.<sup>2</sup>, Федотов А.Б.<sup>4,5</sup>, Белоусов В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ трансляционной медицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

<sup>4</sup> Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>5</sup> Российский Квантовый Центр, Сколково, Россия

\*E-mail: a.g.shokhina@yandex.ru

Окислительный стресс представляет собой комплексное явление, сопровождающее патогенез различных заболеваний печени. Участие активных форм кислорода (АФК) показано в ходе развития фиброза печеночной ткани, при формировании неалкогольной жировой болезни данного органа, гепатоцеллюлярной карциномы и других. Однако причинно-следственные связи между повышенным содержанием АФК в клетках печени и развитием патологического процесса по тому или иному пути в настоящий момент достоверно не установлены. До недавнего времени не существовало инструментов, которые позволили бы оценить индивидуальный вклад отдельных окислителей, в том числе, пероксида водорода, в патогенез заболеваний, для которых показана связь с окислительным стрессом. Мы использовали хемогенетическую систему на основе оксидазы D-аминокислот (DAAO), чтобы контролируемо генерировать пероксид водорода в гепатоцитах мышей, получающих D-аминокислоты. Вместе с генетически кодируемым флуоресцентным индикатором HyPer7, чувствительным к пероксиду водорода, подобная система представляет собой удобный инструмент для изучения роли H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в патогенезе заболеваний печени.

Для таргетной доставки кДНК DAAO-HyPer7 в гепатоциты мышей использовали частицы аденоассоциированных вирусов серотипа 8, содержащие интересующий трансген под контролем гепатоспецифического промотора TBG. На первичной культуре мышинных гепатоцитов, выделенной из животных, инъецированных данными вирусными частицами, было зарегистрировано изменение флуоресцентного сигнала HyPer7 после внесения в среду субстратов DAAO – D-норвалина и D-аланина, что свидетельствует о функциональной активности DAAO в рамках изучаемой системы. При этом внесение L-аланина отклика HyPer7 не вызывало. Чтобы визуализировать работу хемогенетической системы *in vivo*, самцам мышей имплантировали абдоминальное окно, представляющее собой титановое кольцо с закрепленным покровным стеклом на поверхности. Стимуляция генерации пероксида водорода путем внутрибрюшинного введения субстратов DAAO приводила к изменениям флуоресцентного сигнала HyPer7 в режиме реального времени. Хроническое пероксид-индуцированное воспаление, вызванное добавлением 150 мМ D-аланина в питьевую воду животных на протяжении 4 недель, приводило к возникновению признаков гранулематозного гепатита и фиброза печени на гистологическом уровне.



**R. GRACILIS D-AMINO ACID OXIDASE AS A CHEMOGENETIC TOOL FOR HYDROGEN PEROXIDE GENERATION IN HEPATOCYTES**

Shokhina A.G.<sup>1,2,3\*</sup>, Starodubova V.D.<sup>1</sup>, Lanin A.A.<sup>4,5</sup>, Chebotarev A.S.<sup>4,5</sup>, Martynov G.N.<sup>4,5</sup>, Ledyayeva V.S.<sup>1</sup>, Moschenko A.A.<sup>2</sup>, Fedotov A.B.<sup>4,5</sup>, Belousov V.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>5</sup> Russian quantum center, Skolkovo, Russia

\*E-mail: a.g.shokhina@yandex.ru

Oxidative stress is a complex phenomenon accompanying the pathogenesis of various liver diseases. Reactive oxygen species (ROS) contribution is shown during development of liver tissue fibrosis, non-alcoholic fatty liver disease, hepatocellular carcinoma and others. However, cause-and-effect relations between increased ROS content in liver cells and development of pathological process have not been reliably established up to date. Until recently, there were no tools to assess the individual contribution of individual oxidants, including hydrogen peroxide, to the pathogenesis of diseases for which an association with oxidative stress has been shown. We used a D-amino acid oxidase (DAAO)-based chemogenetic system to controllably generate hydrogen peroxide in hepatocytes of D-amino acid receiving mice. Together with the genetically encoded hydrogen peroxide-sensitive fluorescent indicator HyPer7, such a system represents a convenient tool to study the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the pathogenesis of liver disease.

For DAAO-HyPer7 cDNA target delivery into mouse hepatocytes adeno-associated viruses (serotype 8) containing the transgene of interest under the control of the hepatospecific TBG promoter were used. On a primary culture of murine hepatocytes, isolated from animals injected with these viral particles, a change in the fluorescent signal of HyPer7 was registered after addition of D-norvaline and D-alanine to the medium, indicating the functional activity of DAAO under study. Also, the addition of L-alanine did not induce a HyPer7 response. To visualize the operation of the chemogenetic system *in vivo*, abdominal windows, which are titanium rings with a coverslip fixed to the surface, were implanted into male mice. Stimulation of hydrogen peroxide generation by intraperitoneal injection of DAAO substrates led to real-time changes in the fluorescent signal of HyPer7. Chronic peroxide-induced inflammation induced by the addition of 150 mM D-alanine to the drinking water for 4 weeks resulted in evidence of granulomatous hepatitis and liver fibrosis at the histological level.

**ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К МОДЕЛИРОВАНИЮ И КОРРЕКЦИИ ОБЩИХ ЗВЕНЬЕВ ПАТОГЕНЕЗА НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЗГЕЧКА**

Шуваев А.Н.<sup>1,\*</sup>, Белозор О.С.<sup>1</sup>, Шуваев А.Н.<sup>2</sup>, Васильев А.А.<sup>3</sup>, Касларов С.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Красноярский Государственный Медицинский Университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

<sup>2</sup> Сибирский Федеральный Университет, Красноярск, Россия

<sup>3</sup> Балтийский Федеральный Университет, Калининград, Россия

<sup>4</sup> Университет г. Бристоль, Великобритания

\*E-mail: shuvaevanton@hotmail.com

Спиноцеребеллярная атаксия 1 типа (СЦА1) – неизлечимое нейродегенеративное заболевание, высоко распространенное в якутской популяции (Осаковский В.Л. с соавт., 2004). СЦА1 вызывается динамической мутацией в гене АТХN1, кодирующем белок атаксин 1, который выполняет функцию коактиватора фактора транскрипции RoR $\alpha$  и участвует в транскрипции ряда важных генов. Среди них гены, кодирующие белки цитоскелета (Calbindin), транспортёров возбуждающих аминокислот (EAAT) и метаболитных рецепторов (mGluR) (Serra H.G., et al., 2006). Однако схожесть патогенетических механизмов с другими СЦА ставит под сомнение моногенный механизм нарушения синтеза и функции данных белков. Классическим общим звеном патогенеза представляется развитие реактивного астроглиоза и эксайтотоксичности с последующей гибелью нейронов. Мы создали модель неспецифического астроглиоза посредством введения AVV GFAP-ChR2-mKate в кору мозжечка с последующей хронической 4-дневной фотостимуляцией. Этого приводило к развитию астроглиоза с усилением сигнала анти-GFAP и расширением отростков глии Бергмана (ГБ) с  $1.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$  до  $1.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$  ( $n=389$  от 3 животных в группе,  $p = 0,003$ ). В мозжечках этих мышей было обнаружено снижение площади сигнала при окраске на EAAT1 с  $65.2 \pm 11.4\%$  до  $22.1 \pm 5.4\%$ . Количество клеток Пуркинье (КП), выявленное при окраске срезов их маркером анти-Calbindin, уменьшилось с  $4.2 \pm 0.2$  до  $3.2 \pm 0.2$  на  $100 \mu\text{m}$  длины слоя КП ( $n=20$  и  $32$  от 3 животных в группе,  $p = 0.011$ ). По имеющимся на данный момент данным (по 2 записи в каждой группе) наблюдалось нарушение mGluR пути передачи сигналов в КП, в частности, долговременной синаптической депрессии (LTD). Относительная амплитуда ПВ ВПСТ спустя 30 мин после индукции LTD увеличилась с  $63.5 \pm 6.2\%$  до  $88.3 \pm 4.4\%$ . Полученные нами нарушения повторяют таковые в СЦА1 моделях и могут свидетельствовать о выраженном негативном влиянии астроглиоза и эксайтотоксичности при нейродегенеративном процессе. Схожесть патогенетических процессов может помочь разработать терапевтические подходы к лечению СЦА1, такие как уменьшение эксайтотоксичности, например с помощью блокаторов NMDA рецепторов.

*При поддержке гранта РФФ № 23-25-00047.*

**OPTOGENETIC APPROACH TO MODELING AND CORRECTION OF COMMON COMPONENTS IN THE PATHOGENESIS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES OF THE CEREBELLUM**

Shuvaev A.N.<sup>1,\*</sup>, Belozor O.S.<sup>1</sup>, Shuvaev A.N.<sup>2</sup>, Vasilev A.A.<sup>3</sup>, Kasparov S.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Krasnoyarsk State Medical University named after. Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

<sup>2</sup>Siberian Federal University

<sup>3</sup>Krasnoyarsk, Russia, Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

<sup>4</sup>Bristol University, United Kingdom

\*E-mail: [shuvaevanton@hotmail.com](mailto:shuvaevanton@hotmail.com)

Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) is an incurable neurodegenerative disease that is highly prevalent in the Yakut population (Osakovsky V.L., et al., 2004). SCA1 is caused by a dynamic mutation in the ATXN1 gene encoding the ataxin 1 protein. This protein is involved in the transcription of a number of important genes, that encode proteins of the cytoskeleton (Calbindin), excitatory amino acid transporters (EAAT), and metabotropic receptors (mGluR) (Serra H.G., et al., 2006). However, the similarity of pathogenetic mechanisms with other SCAs shows that the monogenic mechanism of impaired synthesis and function of these proteins is not dominant. The common pathogenetic abnormality is the development of reactive astrogliosis and excitotoxicity, followed by neuronal death. We created a model of nonspecific astrogliosis by introducing the AVV GFAP-ChR2-mKate into the cerebellar cortex followed by chronic 4-day photostimulation. This led to the development of astrogliosis with an increase in the anti-GFAP signal and thickness of the Bergman glia (GB) processes from  $1.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$  to  $1.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$  ( $n=389$  from 3 animals in each group,  $p = 0.003$ ). In the cerebellums of these mice, the area of anti-EAAT1 signal decreased from  $65.2 \pm 11.4\%$  to  $22.1 \pm 5.4\%$ . The number of Purkinje cells (PC), detected by anti-Calbindin staining, decreased from  $4.2 \pm 0.2$  to  $3.2 \pm 0.2$  per  $100 \mu\text{m}$  of the PC layer length ( $n=20$  and  $32$  from 3 animals in each group,  $p = 0.011$ ). According to the currently available data (2 records in each group), there was a disturbance of the mGluR signaling pathway in the PCs, that manage the long-term synaptic depression (LTD). The relative amplitude of PF EPSC increased 30 min after LTD induction from  $63.5 \pm 6.2\%$  to  $88.3 \pm 4.4\%$ .

The disturbances that we observed in the optogenetic model repeat those in SCA1 models and may indicate to prominent negative effect of astrogliosis and excitotoxicity in the neurodegenerative process. The similarity of pathogenetic mechanisms may further help to develop therapeutic approaches to SCA1 treatment, such as reducing excitotoxicity, for example, using NMDA receptor blockers.

*Supported by a grant from the Russian Science Foundation № 23-25-00047.*

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ ИНСТРУМЕНТОВ**

Шувалова М.Л.<sup>1,2,\*</sup>, Носов Г.А.<sup>1</sup>, Белоусов В.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва, Россия

\*E-mail: margarita22zelenslaya@gmail.com

В данной работе исследовалось влияние пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) на целостность гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) с применением *in vitro* модели. Модель состоит из эндотелиоцитов линии bEnd.3, растущих на верхней стороне пористой мембраны культуральной вставки "Transwell", астроцитов, растущих на нижней стороне мембраны, и нейронов, растущих на дне культуральной лунки. Для внутриклеточной генерации  $H_2O_2$  использовалась хемогенетическая система, представляющая собой оксидазу D-аминокислот (DAAO), которая окисляет D-аминокислоты с образованием  $H_2O_2$ . Для детекции  $H_2O_2$  использовали генетически кодируемый флуоресцентный сенсор HyPer7. В качестве генетических векторов использовали аденоассоциированные вирусы серотипа Dj, несущие ген DAAO в одной рамке считывания с HyPer7 или RFP под эндотелиальным промотором Flt1 или под астроцитарным промотором GfaABC1D. Индукция образования  $H_2O_2$  осуществлялась путем добавления 5 мМ D-аланина. Для оценки барьерных свойств модели измеряли проницаемость для красителя Lucifer yellow.

При генерации  $H_2O_2$  в астроцитах коэффициент проницаемости через 24 ч составил  $11.6 \pm 1.1$  мкм/мин, а через 48 ч –  $10.2 \pm 1.1$  мкм/мин, что больше по сравнению с исходным ( $8.5 \pm 1.8$  мкм/мин) на 36% и 20%. При генерации  $H_2O_2$  в эндотелиоцитах коэффициент проницаемости через 24 ч составил  $10.1 \pm 1.2$  мкм/мин, а через 48 ч –  $10.2 \pm 1.6$  мкм/мин, что больше по сравнению с исходным на 18% и 20%. Таким образом, генерация  $H_2O_2$  в эндотелиоцитах и в астроцитах вела к значительному увеличению проницаемости ГЭБ.

Также была исследована генерация  $H_2O_2$  в ответ на вещества, которые увеличивают проницаемость ГЭБ *in vivo* - IL17A, VEGF, глутамат. Добавление всех этих веществ к эндотелиоцитам, экспрессирующим HyPer7, вызывало флуоресцентный ответ, что свидетельствует о генерации  $H_2O_2$ . IL17A (100 нг/мл) вызывал ответ через 20 мин после добавления, в то время как эффект от глутамата (5 мМ) и VEGF (100 нг/мл) появлялся в течение минуты. Разный характер генерации  $H_2O_2$  может отражать особенности редокс-сигналинга с участием этих веществ.

Таким образом,  $H_2O_2$  влияет на функционирование ГЭБ, и редокс-сигналинг с ее участием может служить мишенью для модуляции его барьерных свойств.

**STUDY OF THE EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE ON THE FUNCTIONING OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER USING GENETICALLY ENCODED TOOLS**

Shuvalova M.L.<sup>1,2</sup>, Nosov G.A.<sup>1</sup>, Belousov V.V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia

\*E-mail: margarita22zelenslaya@gmail.com

In this work, the effect of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) on the integrity of the blood-brain barrier (BBB) was studied using an *in vitro* model. The model consists of bEnd.3 endotheliocytes growing on the upper side of the porous membrane of the culture insert "Transwell", astrocytes growing on the lower side of the membrane, and neurons growing at the bottom of the culture well. For intracellular generation of  $H_2O_2$ , a chemogenetic system was used, which is a D-amino acid oxidase (DAAO), which oxidizes D-amino acids to form  $H_2O_2$ . A genetically encoded fluorescent sensor HyPer7 was used to detect  $H_2O_2$ . Adeno-associated viruses (Dj serotype) carrying the DAAO gene in the same transcription frame with HyPer7 or RFP under the endothelial promoter Flt1 or under the astrocytic promoter GfaABC1D were used as genetic vectors. The induction of  $H_2O_2$  generation was carried out by adding 5 mM D-alanine. To evaluate the barrier properties of the model, the permeability for the Lucifer yellow dye was measured.

When generating  $H_2O_2$  in astrocytes, the permeability coefficient after 24 hours was  $11.6 \pm 1.1$  mkm/min, and after 48 hours -  $10.2 \pm 1.1$  mkm/min, which is 36% and 20% more than the initial ( $8.5 \pm 1.8$  mkm/min). When generating  $H_2O_2$  in endotheliocytes, the permeability coefficient after 24 hours was  $10.1 \pm 1.2$  microns/min, and after 48 hours -  $10.2 \pm 1.6$  mkm/min, which is 18% and 20% more than the initial one. Thus, the generation of  $H_2O_2$  in endotheliocytes and astrocytes led to a significant increase in BBB permeability.

The generation of  $H_2O_2$  in response to substances that increase the permeability of the BBB *in vivo* - IL17A, VEGF, glutamate - was also investigated. The addition of all these substances to endotheliocytes expressing HyPer 7 caused a fluorescent response, indicating the generation of  $H_2O_2$ . IL17A (100 ng/ml) caused a response 20 minutes after addition, while the effect of glutamate (5 mM) and VEGF (100 ng/ml) appeared within a minute. The different nature of  $H_2O_2$  generation may reflect the features of redox signaling involving these substances.

Thus,  $H_2O_2$  affects the functioning of the BBB, and redox signaling with its participation can serve as a target for modulating its barrier properties.

**АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ**

Абакумов М.А.	6	Винокуров Е.К.	38
Абонакур А.	8	Власова А.Д.	12
Авдеева А.Ю.	72	Власова О.Л.	28, 30, 38
Амахин Д.В.	10, 40	Габашвили А.Н.	6
Ананьев А.С.	106	Герасимов Е.И.	28, 30
Анохин К.В.	42, 102, 114	Горбачева Л.Р.	66
Арутюнян А.В.	26	Горделий В.И.	12
Багаева Д.Ф.	12	Горленко Е.С.	32
Байнаев-Мангилев Н.П.	14	Грин М.А.	78
Бакаева З.В.	52, 66	Гузеев М.А.	64
Балабан П.М.	18, 54	Джаппи Д.	34, 86
Баранов М.С.	58	Докукин Н.В.	42
Басс Д.Ю.	90	Дрозд У.С.	36
Безпрозванный И.Б.	28, 30, 38, 98	Дубровская Н.М.	26
Белозор О.С.	122	Дыгало Н.Н.	36
Белоусов В.В. 34, 58, 60, 62, 86, 90, 108, 120, 124		Екимова И.В.	64, 82
Белялов К.И.	54	Ергина Т.Ю.	40
Билан Д.С.	20, 50, 58, 60, 62, 100, 108	Ерофеев А.И.	28, 30, 38
Богданов А.М.	54	Ефремова М.В.	6
Богданова Е.А.	16	Жёлтиков А.М.	86, 118
Богданова Ю.А.	34	Жиляков Н.В.	104
Богески И.	90	Зайцев А.В.	10, 40, 92, 94, 116
Бородинова А.А.	18, 110	Закирова Н.Ф.	90
Браже А.Р.	22, 118	Залыгин А.В.	20
Браже Н.А.	20	Зильбертер Ю.И.	88
Брежестовский П.Д.	88	Иваненко А.В.	90
Булыгина В.В.	36	Иванов А.В.	90
Бухалович С.М.	12	Иванова А.Д.	50, 60, 108
Вараксин А.А.	46, 96	Иванова В.О.	54
Васильев А.А.	122	Ивашкина О.И.	42, 102, 114
Васильев А.В.	108	Иджилова О.С.	8, 44, 56
Васильев Д.С.	26	Ильинский Н.С.	12
Васильев П.И.	98	Кайсманова М.П.	64
Васильев Ю.Л.	78	Калинина А.П.	54
Вечкапова С.О.	14	Калинина Т.С.	36

**April 6–8, 2023 OPTOGENETICS+ 2023**

Калиниченко А.Л.	34	Морозова Н.Б.	78
Капустянов И.А.	46	Мощенко А.А.	34, 86, 90, 120
Карнаева А.Е.	90	Мустафина А.Р.	104
Карогодина Т.Ю.	14	Мухаметшина Л.Ф.	34, 86
Карпушев А.В.	48	Нестеренко А.М.	90
Каспаров С.	122	Ни В.И.	70
Катруха В.А.	50, 60	Никитин Е.С.	54
Кельмансон И.В.	60, 108	Николаев Д.М.	74
Кислухина Е.Н.	52, 66	Николаев М.В.	76
Колесов Д.В.	54	Новопашина Д.С.	32
Колотова Д.Е.	56	Новоселецкий В.Н.	16
Комышева Н.П.	36	Ноев А.Н.	78
Корженевский Д.А.	90	Носов Г.А.	12, 124
Королёва К.С.	106	Олейников В.А.	20
Костюк А.И.	58, 60	Осипова А.А.	110
Котова Д.А.	60	Островский М.А.	56, 80
Кузнецов Н.Д.	78	Пази М.Б.	82
Ланин А.А.	50, 60, 62, 86, 108, 120	Панкратов А.А.	78
Ланшаков Д.А.	36	Панов М.С.	74
Лапшина К.В.	64	Панова А.С.	58, 60, 108
Ледяева В.С.	120	Пацап О.И.	90
Лизунова Н.В.	52, 66	Петухова Е.О.	24
Лихобабина Д.А.	78	Петухова Е.О.	84
Лукьянов К.А.	54	Пинелис В.Г.	52, 66
Лянг О.В.	90	Плюснин В.В.	102
Максимов Е.Г.	68	Подгорный О.В.	34, 86
Малышев А.Ю.	8, 44, 56, 110	Пономарева Д.Н.	24, 84, 88
Мальцев Д.И.	34, 86	Постникова Т.Ю.	40, 116
Мартынов Г.Н.	50, 62, 120	Потехина Е.С.	90
Мессенс Й.	58	Почечуев М.С.	60
Мешалкина Д.А.	70	Проскурина Е.Ю.	40, 92, 94, 116
Мионов В.Н.	74	Пущина Е.В.	46, 96
Митенев А.В.	30	Пчицкая Е.И.	30, 98
Михайлов И.Г.	72	Раевский Р.И.	58, 60
Михель А.В.	26	Рапота Д.Д.	100
Морозова К.С.	20	Рогожникова О.С.	42, 102

**April 6–8, 2023 OPTOGENETICS+ 2023**

Розов А.В.	34, 86	Трофимова А.М.	10, 40, 116
Рощина М.А.	114	Туманова Н.Л.	26
Рязанцев М.Н.	74	Тяглик А.Б.	20, 118
Саковина Л.В.	32	Федотов А.Б.	50, 60, 62, 86, 118, 120
Сальников В.В.	104	Федотов И.В.	60, 86, 118
Самигуллин Д.В.	104	Федотова А.А.	20, 22, 118
Свитко С.О.	106	Фирсов М.Л.	70
Семкина А.С.	6	Ханина М.В.	64
Семьянов А.В.	20, 22, 118	Храмова Ю.В.	50, 60, 108
Сергеева А.Д.	58, 60, 108	Чебаненко В.В.	60
Сибгатуллина Г.В.	104	Чеботарев А.С.	50, 60, 62, 108, 120
Ситдикова Г.Ф.	106	Чижев А.В.	40, 92
Смирнов И.В.	110	Чилигина Ю.А.	48
Смирнова Г.Р.	8, 44, 56	Чуканов В.С.	30, 98
Смирнова М.П.	110, 112	Шайтан К.В.	16
Соколинская Е.Л.	54	Шамшурина Е.В.	46, 96
Соколов Р.А.	34, 86	Шарипов Р.Р.	52, 66
Солотенков М.А.	86, 118	Шестопалова М.С.	20
Солюс Г.М.	34, 86	Шимолина Л.Е.	90
Сотсков В.П.	102	Ширманова М.В.	90
Стародубова В.Д.	120	Шишкина Г.Т.	36
Стуканева М.Е.	96	Шохина А.Г.	62, 120
Суворов Н.В.	78	Шуваев Ант.Н.	72, 122
Судоплатов М.А.	60, 100	Шуваев Анд.Н.	122
Сурин А.М.	52, 66	Шувалова М.Л.	124
Сутемьева Ж.А.	78	Щербицкая А.Д.	26
Тиселько В.С.	40	Янушкевич С.В.	58
Торопова К.А.	42, 102, 114		
Тосунян М.-А.	58		
Трифонов А.П.	60, 108		



**Рабочая группа организации Конференции и Школы**

Руководитель Рабочей группы подготовки конференции	Ким К.Х.
Члены Рабочей группы	
Группа информационной поддержки Конференции	Сухов И.Б. Жуликов М.В. Зарипов К.А. Ни В.И. Горская А.В. Трофимова А.М. Беляев И.В.
Технический секретариат	Андогская Н.П. Белова М.Н. Криворука Л.В. Чижова И.Д.
Группа подготовки материалов Конференции	Гальперина Е.И. Кручинина О.В. Алексеева О.С. Бочина Ю.М. Алексеева О.С. Карелина Т.В. Фок Е.М.
Группа обеспечения мероприятий Конференции	Шипилов В.Н. Чистякова О.В.
Группа IT-обеспечения	Беляев И.В. Заварзин К.А. Хасанов Р.Г.
Группа материального-технического обеспечения	Паскаренко Г.Ю.
Техническая группа	Карелин Ю.А. Зарипов К.А. Кириллов С.Е.
Группа транспортного обеспечения	Киреев В.В.
Группа финансового обеспечения	Коршунова И.С. Панфилова Е.С.
Группа обеспечения международных связей	Нестерова Т.Е.
Хозяйственная группа	Николаева М.В. Багрова Т.В.
Группа обеспечения безопасности	Орлов М.Б. Жуков А.Ю.

**April 6–8, 2023 OPTOGENETICS+ 2023**

---

---

Утверждено Федеральным государственным бюджетным учреждением науки  
Институтом эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
Российской академии наук

194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44.

Сборник научных трудов. ГОСТ 7.60–003 СИБИБ

Оригинал-макет **О.В. Кручинина**

Корректурa **Ю.М. Бочина**

Дизайн обложки **В.Д. Каюмова**

Подписано к печати 24.03.2023. Формат 60×84 1/8.

Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать цифровая.

Усл. печ. л. 111. Тираж 1 экз. Заказ № FJ1 €

---

Отпечатано в Издательстве ВВМ.

198095, Санкт-Петербург, ул. Швецова, 41.