

# OPTOGENETICS + 2020

ABSTRACTS

APRIL 22-26, 2020, ST. PETERSBURG, RUSSIA



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Отделение физиологических наук РАН  
Отделение биологических наук РАН  
Физиологическое общество им. И. П. Павлова  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
Российской академии наук  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт Высшей нервной деятельности и Нейрофизиологии  
Российской академии наук

II ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С  
МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

**«ОПТОГЕНЕТИКА+ 2020»**

И ШКОЛА ПО СОВРЕМЕННЫМ МЕТОДАМ НЕИНВАЗИВНОГО  
КОНТРОЛЯ НЕЙРОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

22-26 апреля 2020 года

Санкт-Петербург  
2020

**Вторая Всероссийская научная конференция с международным участием «Оптогенетика+ 2020» и Школа по современным методам неинвазивного контроля нейрональной активности, Санкт-Петербург, 22–26 апреля 2020 г.:** Сборник научных трудов / Под общ. ред. д.б.н. М. Л. Фирсова. — СПб.: ВВМ, 2020. —115 с.

ISBN 978-5-9651-0984-5

В сборнике научных трудов публикуются результаты исследований участников Второй Всероссийской конференции с международным участием «Оптогенетика+ 2020» и Школы по современным методам неинвазивного контроля нейрональной активности, представивших свои научные результаты в форме докладов и лекций. Данный сборник представляет интерес для специалистов различных областей знаний, аспирантов, студентов ВУЗов.

Материалы публикуются в авторской редакции

Редакционная коллегия:

д.б.н. М.Л. Фирсов, д.б.н. С.М. Антонов, д.б.н. И.В. Романова,  
к.б.н. Е.И. Гальперина, О.В. Кручинина, к.б.н. О.С. Алексеева.

Конференция и Школа проводятся при финансовой поддержке: Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 20-015-20012) и информационной поддержке СПб ГБУ "Конгрессно-выставочное бюро".

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН), 2020 г.

***APRIL 22-26, 2020***

***OPTOGENETICS+ 2020***

---

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

INTERNATIONAL CONFERENCE

**OPTOGENETICS+ 2020**

AND THE WORKSHOP ON ADVANCED METHODS OF NON-  
INVASIVE CONTROL OF NEURONAL ACTIVITY

ABSTRACTS

April 22-26, 2020

St. Petersburg  
2020

ОРГКОМИТЕТ ВТОРОЙ ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ С  
МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «ОПТОГЕНЕТИКА+ 2020» И ШКОЛЫ ПО  
СОВРЕМЕННЫМ МЕТОДАМ НЕИНВАЗИВНОГО КОНТРОЛЯ  
НЕЙРОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

**Председатель оргкомитета:** д.б.н. **Фирсов М.Л.**, директор ИЭФБ РАН

**Заместитель председателя оргкомитета:** к.б.н. **Ким К.Х.**, заместитель  
директора ИЭФБ РАН

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

**Сопредседатель оргкомитета:** к.б.н. **Сухов И.Б.**, председатель Совета  
молодых ученых ИЭФБ РАН

**Члены оргкомитета:**

Криворука Л.В., Андогская Н.П., Белова М.Н., Чиждова И.Д., Кручинина О.В.,  
Алексеева О.С., Карелина Т.В., Фок Е.М., Васильев Д.С., Малкин С.Л.,  
Шемякина Н.В., Нагорнова Ж.В., Чистякова О.В., Ротов А.Ю., Ситникова В.С.,  
Паскаренко Г.Ю., Карелин Ю.А., Минаев В.Д., Орлов А.М., Заварзин К.А.,  
Шипилов В.Н., Зарипов К.А., Тихонравов Д.Л., Гузеев М.А., Киреев В.В.,  
Коршунова И.С., Панфилова Е.С., Нестерова Т.Е., Сарема Н.Ф., Багрова Т.В.,  
Балашова Т.И., Николаева М.В.

**ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ:**

**Сопредседатель программного комитета:** д.б.н. **Фирсов М.Л.**, ИЭФБ РАН

**Сопредседатель программного комитета:** член-корр. РАН **Балабан П.М.**,  
ИВНДиНФ РАН

**Заместитель председателя программного комитета:**  
к.б.н. **Гальперина Е.И.**, ИЭФБ РАН.

**Заместитель председателя программного комитета:**  
д.б.н. **Зайцев А.В.**, ИЭФБ РАН

**Члены программного комитета**

академик РАН **Анохин К.В.**, МГУ, д.б.н. **Безпрозванный И.Б.**, СПбПУ / UTSW,  
д.б.н. **Брежестовский П.Д.**, КГМУ / INSERM, д.ф.-м.н. **Власова О.Л.**, СПбПУ,  
M.D., Ph.D. **Гайнетдинов Р.Р.**, СПбГУ, член-корр. РАН **Дыгало Н.Н.**, ИЦиГ СО  
РАН, академик РАН **Кирпичников М.П.**, МГУ, д.б.н. **Малышев А.Ю.**,  
ИВНДиНФ РАН, академик РАН **Островский М.А.**, ИБХФ РАН / МГУ, член-  
корр. РАН **Семьянов А.В.**, ИБХ РАН, член-корр. РАН **Тихонов Д.Б.**, ИЭФБ  
РАН, к.ф.-м.н. **Горделий В.И.**, МФТИ, д.б.н. **Антонов С.М.**, ИЭФБ РАН, д.б.н.  
**Романова И.В.**, ИЭФБ РАН.

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

**Co-chairman: Galperina E.I.**, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS

**Co-chairman: Sukhov I.B.**, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS

**Members of the organizing committee:**

Krivoruka L.V., Andogskaya N.P., Belova M.N., Chizhova I.D., Kruchinina O.V., Alekseeva O.S., Karelina T.V., Fok E.M., Vasil'ev D.S., Malkin S.L., Shemyakina N.V., Nagornova Zh.V., Chistyakova O.V., Rotov A.Yu., Sitnikova V.S., Paskarenko G.Yu., Karelin Yu.A., Minaev V.D., Orlov A.M., Zavarzin K.A., Shipilov V.N., Zaripov K.A., Tikhonravov D.L., Guzeev M.A., Kireev V.V., Korshunova I.S., Panfilova E.S., Nesterova T.E., Sarema N.F., Bagrova T.V., Balashova T.I., Nikolaeva M.V.

PROGRAM COMMITTEE:

**Co-Chair: Firsov M.L.**, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS

**Co-Chair: Balaban P.M.**, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS

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

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

**Program committee members:**

**Anokhin K.V.**, academician of the Russian Academy of Sciences, Moscow State University, **Bezprozvanny I.B.**, St. Petersburg Polytechnic University / University of Texas Southwestern Medical Center, **Bregestovski P.D.**, Kazan State Medical University / INSERM Institute of System Neuroscience, **Vlasova O.L.**, St. Petersburg Polytechnic University, **Gainetdinov R.R.**, St. Petersburg State University, **Dygalo N.N.**, Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of RAS, **Kirpichnikov M.P.**, academician of the Russian Academy of Sciences, Moscow State University, **Malyshev A.Yu.**, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, **Ostrovsky M.A.**, academician of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemical Physics RAS / Moscow State University, **Semenov A.V.**, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Institute of Bioorganic Chemistry RAS, **Tikhonov D.B.**, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, **Gordeliy V.I.**, Moscow Institute of Physics and Technology, **Antonov S.M.**, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, **Romanova I.V.** Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS

В апреле 2018 года в Санкт-Петербурге прошла первая конференция «Оптогенетика и Оптофармакология». На ней мы обсуждали вопросы развития и эффективного внедрения двух современных направлений неинвазивного контроля функционирования нервной системы. Обе методика, вынесенные в название конференции, направлены на придание чувствительности к свету отдельным клеткам или клеточным структурам.

Оптогенетика реализуется за счет введения в клетки дополнительного генетического материала, а оптофармакология – малых фотохромных молекул. В результате исследователь получает возможность манипулировать внутриклеточными процессами с помощью света, действуя избирательно на те клеточные структуры, которые интересуют его в данный момент. В конце конференции мы, ее участники, договорились собраться вновь через два года для продолжения общения и обмена мнениями о реализации и применения этих подходов для фундаментальных и прикладных исследований.

Проводимая в этом году конференция получила название «Оптогенетика+ 2020». Мы назвали ее так, потому что даже за прошедшее с 2018 время получили существенное развитие новые подходы к изучению внутриклеточных процессов, которые также было бы крайне важно сделать предметом обсуждения на нашей конференции, в дополнение к оптогенетике и оптофармакологии. К их числу относится применение светоактивируемых биосенсоров (оптосенсорика), управление состоянием клетки с помощью иных, нежели свет, специфических стимулов, таких как химические соединения или температура (хемогенетика и термогенетика) и другие новейшие методики. Также научная программа Конференции будет включать в себя обсуждение проблем адресной доставки генов и белков-эффекторов, токсичности и стабильности молекулярных инструментов, перспектив применения современных методов управления состоянием клеток в медицинских целях, в том числе для протезирования сенсорных систем, и другие вопросы.

**Председатель оргкомитета:** директор ИЭФБ РАН  
д.б.н. **Фирсов М.Л.**

The first conference on “Optogenetics and Optopharmacology” was held in St. Petersburg in April 2018. Both techniques in the title of the conference expect to impart light sensitivity to individual cells or cell structures. The focus of the conference was on the development and effective implementation of non-invasive control on nervous system functioning.

Optogenetics is realized by introducing additional genetic material into cells, and optopharmacology – small photochromic molecules. As a result, the researcher is able to manipulate intracellular processes with light, acting selectively on those cellular structures that are in the interest focus at the moment. At the end of the conference the participants agreed to meet again in two years and continue to communicate and exchange views on the implementation and application of Optogenetics and optopharmacology for basic and applied research.

The conference that will be held this year is called Optogenetics 2020+. We called it so as even since 2018 new approaches in the studies of the intracellular processes have been significantly developed. And it would also be extremely important to discuss them at the present conference, in addition to optogenetics and optopharmacology. Present discussion will cover use of light-activated biosensors (optosensory), the management of the cell state by means of specific stimuli other than light, such as chemical compounds or temperature (chemogenetics and thermogenetics), and other advanced techniques. The scientific programme of the Conference will also include discussion on the problems of targeted delivery of genes and effector proteins, toxicity and stability of molecular instruments, prospects for the application of modern cell management methods for medical purposes, including prosthetics of sensory systems, and other issues.

***Chairman of the organizing committee***

Director, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS

**Firsov M.L.**



**ОГЛАВЛЕНИЕ:**

OPTOGENETICS+ 2020

ОПТОГЕНЕТИКА+ 2020 ..... 9

THE WORKSHOP ON ADVANCED METHODS  
OF NON-INVASIVE CONTROL  
OF NEURONAL ACTIVITY

ШКОЛА ПО СОВРЕМЕННЫМ МЕТОДАМ  
НЕИНВАЗИВНОГО КОНТРОЛЯ  
НЕЙРОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ .....63

SATELLITE SYMPOSIUM  
"IMAGING OF BIOLOGICAL OBJECTS"

САТЕЛЛИТНЫЙ СИМПОЗИУМ  
«ИМИДЖИНГ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ» ..... 70

---

**ROLE OF THE NO AND H<sub>2</sub>S ON ENDO- AND EXOCYTOSIS OF SYNAPTIC VESICLES IN THE DIABETES MELLITUS MODEL MICE**Al'bova P.E.<sup>1</sup>, Yarmiev I.Z.<sup>2</sup>, Yakovleva O.V.<sup>2</sup><sup>1</sup> Kazan Federal University, Kazan, Russia, <sup>2</sup> Kazan Federal University, Kazan, Russia

e-mail: albova.polina96@gmail.com

Diabetes mellitus (DM) is a group of diseases that occur due to disorders in insulin secretion and/or insulin action. The development of pathologies in DM is associated too with gas mediator systems dysfunction. The aim of this work to study the role of nitric oxide and hydrogen sulfide in the complications development of alloxan DM.

To create a model of DM, after starvated laboratorial mice were injected intraperitoneally with alloxan. The study of endo- and exocytosis of synaptic vesicles was carried out on the 45th day of the experiment. Fluorescent microscopy assay applicated using a fluorescent probe FM1-43. FM1-43 reversibly binds to the presynaptic membrane and remains inside the nerve terminal (NT) during endocytosis ("loading"). It leaves the presynaptic terminal ("unloading") during exocytosis. The neuromuscular preparations of the diaphragma muscle were treated in solutions which contain blockers of gases synthesis enzymes - L-NAME and AOAA, synthesis substrates - L-arginine and L-cysteine, and exogenous donors - SNAP and NaHS. The glow of NT was recorded using AxioScope A1 microscope. We used classical spectrophotometric methods to analyze the content of nitrites and H<sub>2</sub>S in the neuronal tissue.

In animals with DM, adding SNAP to the solution reduced the illumination across all three "loading" protocols, and accelerated discoloration of NT during "unloading" in contradistinction to the control values observed. The addition of L-arginine and L-NAME didn't make a change in the illumination and rate of the NT discoloration. The content of nitrites in the brain was reduced comparing to their content in control animals.

The adding NaHS and L-cysteine reduced the illumination of the NT in the first two load protocols, and increased it in the third, while there was a decrease in discoloration of the NT during unloading. The adding AOAA didn't lead to significant changes in the level of illumination and the rate of the nerve endings discoloration. The amount of H<sub>2</sub>S didn't differ from the control.

We observed that the influence of exogenous NO and H<sub>2</sub>S donors on endo- and exocytosis of synaptic vesicles persists in mice with alloxan DM. But the absence of influence on the recycling of synaptic vesicles of the synthesis substrate and the NO-synthase blocker indicates a violation of the functioning of NO-synthase in DM. The substrate of H<sub>2</sub>S synthesis preserved its effects, which indicates that the activity of H<sub>2</sub>S synthesis enzymes is preserved in the DM model.

**РОЛЬ NO И H<sub>2</sub>S В ЭНДО- И ЭКЗОЦИТОЗЕ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ У МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА**Альбова П.Е.<sup>1</sup>, Ярмиев И.З.<sup>2</sup>, Яковлева О.В.<sup>3</sup><sup>1</sup> Казанский федеральный университет, Казань, Россия, <sup>2</sup> Казанский Федеральный Университет, Казань, Россия, <sup>3</sup> Казанский Федеральный Университет, Казань

e-mail: albova.polina96@gmail.com

Сахарный диабет (СД) – это группа эндокринных заболеваний, возникающих из-за нарушения секреции и/или действия инсулина. Развитие различных патологических состояний при СД, связывают, в том числе и с нарушением работы систем газомедиаторов. Целью работы явилось исследование роли оксида азота и сероводорода в развитии осложнений при моделировании СД.

Для создания модели СД лабораторным мышам внутрибрюшинно вводился аллоксан после голода. Исследование процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул проводили на 45 сутки эксперимента. Флуоресцентный маркер FM1-43 во время эндоцитоза оказывается внутри нервной терминали («загрузка»), а во время экзоцитоза освобождаются из пресинаптического окончания («разгрузка»). Нервно-мышечные препараты диафрагмальной мышцы выдерживались в растворах, содержащих блокаторы ферментов синтеза NO и H<sub>2</sub>S - L-NAME и АОАА, субстраты синтеза - L-аргинин и L-цистеин и экзогенные доноры – SNAP и NaHS. Регистрацию свечения нервных окончаний проводили с помощью микроскопа AxioScope A1.

С помощью классических спектрофотометрических методов проводился анализ содержания нитритов, сероводорода в мозге.

У животных с СД добавление в раствор SNAP приводило к снижению свечения нервных терминалей по всем трем протоколам загрузки и ускорению обесцвечивания нервных терминалей при разгрузке относительно контрольных значений. При обработке препарата растворами L-аргинина и L-NAME свечение и значения скорости обесцвечивания нервных терминалей достоверно не отличались от контрольных значений. Содержание нитритов в мозге животных с СД снижено по сравнению с их содержанием у контрольных животных.

Добавление NaHS и L-цистеина приводило к снижению свечения нервных терминалей по первым двум протоколам загрузки, усилению по третьему, при этом наблюдалось замедление обесцвечивания нервных терминалей при разгрузке. Добавление АОАА не приводило к достоверным изменениям уровня свечения и скорости обесцвечивания нервных терминалей. Количество H<sub>2</sub>S в мозге животных с СД не изменялось, относительно контрольных значений.

Таким образом, мы наблюдали, что у мышей с аллоксановым СД сохраняются эффекты экзогенных доноров NO и H<sub>2</sub>S на эндо- и экзоцитоз синаптических везикул. Но отсутствие эффектов на рециклизацию синаптических везикул субстрата синтеза и блокатора NO-синтаз свидетельствует о нарушении работы ферментов синтеза NO при СД. При этом субстрат синтеза H<sub>2</sub>S сохранял свои эффекты, что говорит о сохранении работы ферментов синтеза H<sub>2</sub>S при моделировании СД.

**ANION CHANNEL RHODOPSIN FROM CHROMERA VELIA**

Arzhevikina P.A.<sup>1</sup>, Alekseev A.A.<sup>2</sup>, Maliar N.L.<sup>1</sup>, Podolyak E.Y.<sup>1</sup>,  
Tsybrov F.M.<sup>1</sup>, Shevchenko V.A.<sup>1</sup>, Gordeliy V.I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),  
Moscow, Russia, <sup>2</sup> Julich Research Center, Institute of Complex Systems: Structural  
Biochemistry (ICS-6), Julich, Germany, <sup>3</sup> Grenoble Alpes-CEA-CNRS, Institute of  
structural biology, Grenoble, France

e-mail: arzhevikina.pa@gmail.com

Electrochemical potential generation on neuronal plasma membrane is the fundamental process for excitability of nervous tissue. The advent of optogenetics method allowed to affect this process using light and control the activity of neurons with high spatial and temporal accuracy, which has many applications from fundamental research of the nervous system to prosthetics of the retina. Considering the diversity of applications, modern optogenetics tools have to be ion-selective, have good conductivity and high level of expression in cells of a certain type, and also localise in determined organelles. During the bioinformatics search in open genome databases, the rhodopsin from algae *Chromera velia* was founded and chosen for our research. We expressed this rhodopsin in the mixed rat-mouse glioma NG108-15 cells and performed its functional characterization by the patch-clamp method in the voltage clamp whole-cell mode. The pipette solution contained 110 mM NaCl in all experiments, and ionic composition of the extracellular solution varied (Fig. 1). The obtained current-voltage characteristics indicate that the rhodopsin has the properties of an anion channel. The reversal potentials were determined:  $0.3 \pm 3.5$  mV in case of Cl<sup>-</sup> presence in the extracellular solution (symmetric composition of the intra- and extracellular solutions),  $-15.4 \pm 6.4$  mV in case of Br<sup>-</sup> outside the cell,  $69.3 \pm 9.1$  mV for SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> outside the cell. Using the Nernst equation, the relative permeability coefficients were calculated for the Br<sup>-</sup> and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> anions, and were  $1.8 \pm 0.4$  and  $0.11 \pm 0.04$ , respectively (the permeability coefficient for Cl<sup>-</sup> was taken equal to 1). To estimate the duration of the photocycle, photocurrents were recorded after two consecutive flashes of the LED with maximum intensity at the wavelength of 565 nm, gradually reducing the time between flashes. The characteristic recovery of the maximum photocurrent time was  $36 \pm 2$  seconds. The experiments were performed on 6-7 cells. In conclusion, rhodopsin from *Chromera velia* is an anion channel, with maximum conductivity for bromine anions. Selectivity and a good level of expression in the plasma membrane make it a promising optogenetic tool.

RSF 19-44-06302

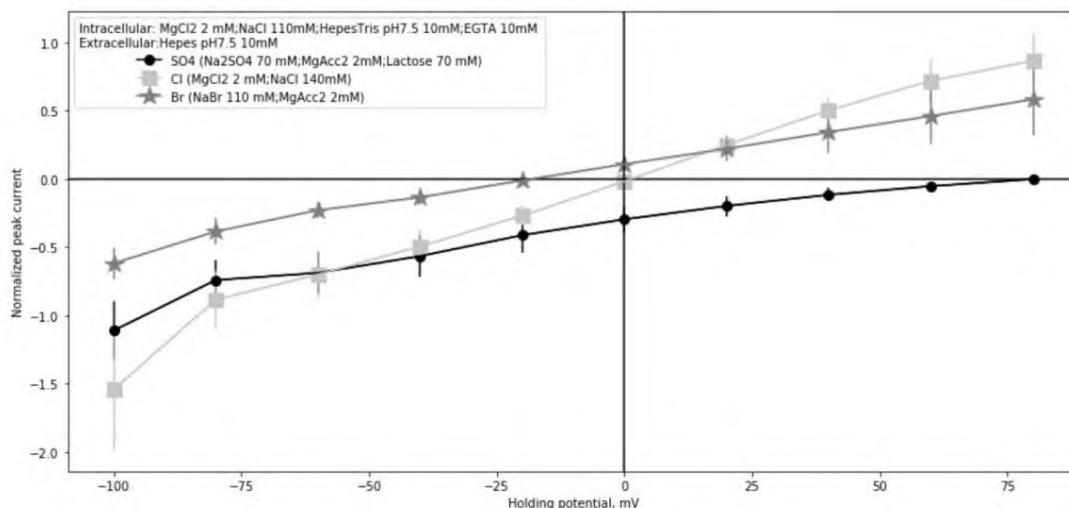


Fig. 1. Current-voltage diagrams of new anion channel in different conditions.

Рис.1. Вольтамперные характеристики нового анионного канала в различных условиях.

### АНИОННЫЙ КАНАЛЬНЫЙ РОДОПСИН ИЗ *CHROMERA VELIA*

Аржевикина П. А.<sup>1</sup>, Алексеев А. А.<sup>2</sup>, Маляр Н. Л.<sup>1</sup>, Подоляк Е. Я.<sup>1</sup>,  
Цыбров Ф. М.<sup>1</sup>, Шевченко В. А.<sup>1</sup>, Горделий В. И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет)», Москва, Россия, <sup>2</sup> Институт сложных систем ICS-6: Структурная биохимия, Исследовательский центр Юлиха, Юлих, Германия, <sup>3</sup> Институт структурной биологии, Гренобльский Университет, Гренобль, Франция

e-mail: arzhevikina.pa@gmail.com

Генерация электрохимического потенциала на плазматической мембране нервной клетки является основополагающим процессом для возбудимости нервной ткани. Появление оптогенетического метода позволило влиять на этот процесс с помощью света и управлять активностью нейронов с высокой пространственной и временной точностью, что имеет множество применений от фундаментальных исследований нервной системы до протезирования сетчатки глаза. Учитывая разнообразие возможных применений, современные оптогенетические инструменты должны обладать определённой ионной селективностью, высокой проводимостью и уровнем экспрессии в клетках определённого типа, а также должны локализоваться в необходимых клеточных органеллах. В ходе биоинформатического поиска по открытым базам геномов был найден родопсин из водоросли *Chromera velia*, который был выбран нами в качестве объекта исследования. Мы экспрессировали данный родопсин в клетках смешанной крысино-мышинной линии глиомы NG108-15 и провели его функциональную характеристику методом patch-clamp в режиме voltage clamp whole-cell. Внутрипипеточный раствор содержал 110 мМ NaCl во всех опытах, а внеклеточный варьировали по ионному составу (Рис.1). Полученные вольтамперные характеристики свидетельствуют о том, что родопсин обладает свойствами анионного канала. Определены потенциалы реверсии:  $0.3 \pm 3.5$  мВ в случае Cl<sup>-</sup> во внеклеточной среде (симметричного состава внутри- и внеклеточного растворов).

Грант РФФ 19-44-06302

THE ROLE OF NMDA RECEPTORS IN CEREBELLAR  
NEURODEGENERATION CAUSED BY CHRONIC PHOTOSTIMULATION OF  
CHR2 IN BERGMANN GLIA

Belozor O.S., Shuvaev A.N.

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F.Voino-Yasenetsky,  
Krasnoyarsk, Russia

e-mail: olsbelor@gmail.com

The aim of the work was to create a model of selective cerebellar astrogliosis (using nonspecific (chronic photoactivation of Bergmann glia, expressing Chr2–BGChr2) and specific (expression of mutant Ataxin 1) cerebellar astrocyte stimuli), to study the effect of astroglia on transsynaptic transmission of Purkinje cells (PC) in the early stages of disease, and estimate the effect of memantine to this process.

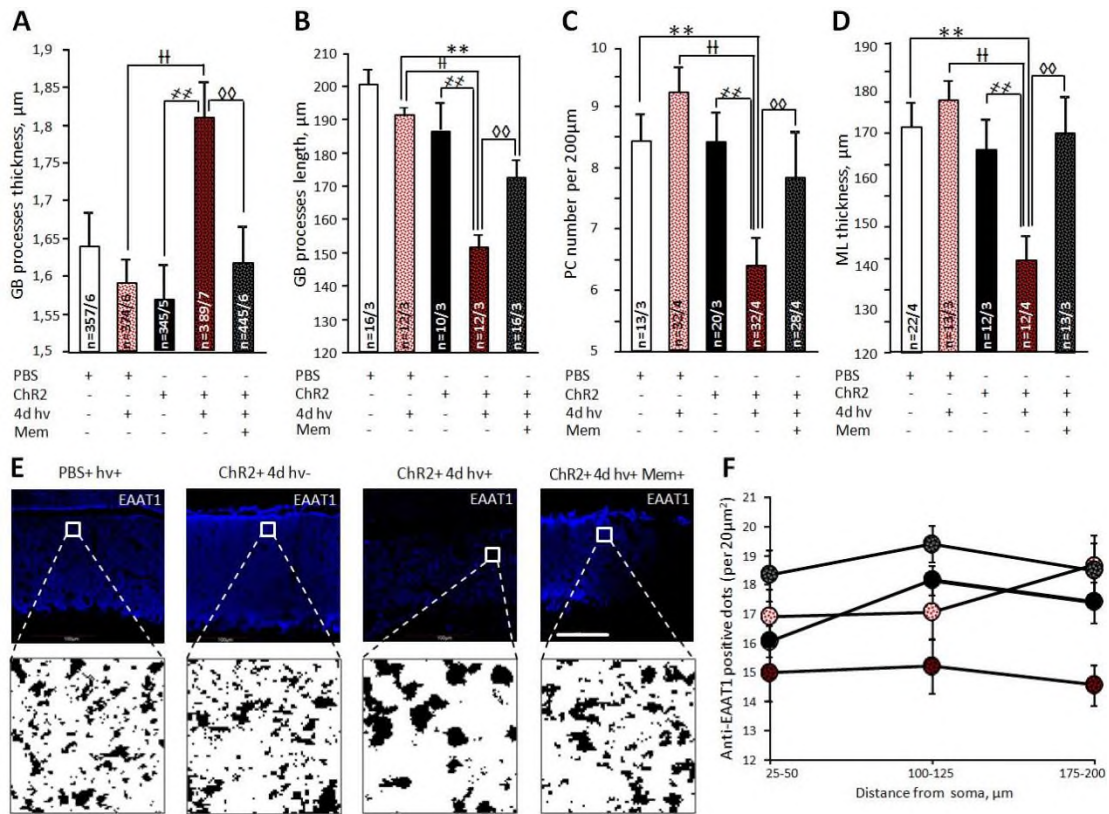
To simulate astrocyte-induced cerebellar neurodegeneration, 10 $\mu$ l AVV GFAP-Chr2-mKate2 ( $3,4 \times 10^7$  units/ml) was injected into the cerebral cortex of ICR (CD1) mice and photostimulated with repeated light pulses ( $\lambda=480$  nm, 20ms at 0,1 Hz, series of 1 min with 1 min rest for 4 days) by LED fixed above the injection area to the bones of the skull. Mice of the second experimental group were injected with 3  $\mu$ l of LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag ( $6,8 \times 10^9$  units/ml). Control mice were injected with 10  $\mu$ l PBS.

Material was collected from the affected brain regions. According to the results of IHC, in the model with chronic photoactivation of BGChr2 the number of PCs and the ML thickness decreased. Using the patch clamp we found that capacitance of PCs was also decreased in these animals.

To assess the neuroprotective effect in animals with reactive BGChr2 we used memantine solution (90 mg/kg body weight) within 4 days of photoactivation. Memantine decreased excitotoxicity through increase number of glutamate reuptake molecules, such as EAAT1. It leads to partial restoration of normal BGChr2 morphology. Also it positively affects PC dendritic tree and the total number of PCs. Thus, a decrease in excitotoxicity may be due to the direct effect of NMDA receptor blockers on astrocytes and indirectly on PC through increased glutamate reuptake, which protects against neurodegeneration.

We found similar pathomorphological changes and the positive effect of oral administration of memantine in an astrogliosis model with selective expression of mutant Ataxin 1 in BG.

RFBR Grant № 19-315-9004419



**Fig. 1.** Compare of the characteristics of Bergman glia (BG) and Purkinje cells (PC) in mice of the control group, in the models of selective cerebellar astrogliosis with acute and chronic photoactivation of BG, expressing ChR2, and mice treated with memantine. **A.** Histogram shows a comparison of the thickness of GB processes. **B.** Histogram shows a comparison of the BG processes length. **C.** Histogram shows a comparison of the PC number per 200 micron. **D.** Histogram shows a comparison of the molecular layer thickness. **E.** IHC analysis of cerebellar slices. The upper row shows the slices labeled with antibodies to EAAT1. The decrease in the number of EAAT1 in the cerebellum of the selective astrogliosis model with chronic photoactivation of GB and the restoration of their number after treatment with memantine are clearly visible. The bottom row shows zooming on the boxed area (25 micron<sup>2</sup>) on which anti-EAAT1 positive spots were counted. **F.** Graph shows a comparison of the number of anti-EAAT1 positive spots in micrographs. The number of cells/mice is indicated in columns. Signs ##,\*\*, indicate statistically significant differences. Differences were found using Student's t-test and one-way analysis of variance.

**Рис. 1.** Сравнение характеристик глии Бергмана (ГБ) и клеток Пуркинью (КП) у мышей контрольной группы, в модели селективного астроглиоза мозжечка с острой и хронической фотоактивацией ГБ, экспрессирующей ChR2, и мышей, пролеченных мемантином. **A.** Гистограмма, показывающая сравнение толщины отростков ГБ. **B.** Гистограмма, показывающая сравнение длины отростков ГБ. **C.** Гистограмма, показывающая сравнение количества КП на 200 мкм. **D.** Гистограмма, показывающая сравнение толщины молекулярного слоя. **E.** ИГХ анализ срезов мозжечка. Верхний ряд - окраска срезов антителами к EAAT1. Хорошо видно уменьшение числа EAAT1 в мозжечке модели селективного астроглиоза с хронической фотоактивацией ГБ и восстановление их количества после лечения мемантином. Нижний ряд – увеличенный фрагмент (25mm<sup>2</sup>) на котором производился подсчет анти-EAAT1 положительных пятен. **F.** График, показывающий сравнение количества анти-EAAT1 положительных пятен в микрофотографиях. Количество клеток/мышей указано в столбцах. Знаками ##, \*\* отмечены статистически значимые отличия. Различия найдены с помощью t-критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа.

**РОЛЬ NMDA РЕЦЕПТОРОВ В РАЗВИТИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ  
МОЗЖЕЧКА, ВЫЗВАННОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ФОТОСТИМУЛЯЦИЕЙ  
CHR2 В ГЛИИ БЕРГМАНА**

Белозор О.С., Шуваев А.Н.

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, Россия

e-mail: [olsbelor@gmail.com](mailto:olsbelor@gmail.com)

Цель работы – создать модель селективного астроглиоза мозжечка (с использованием неспецифического (хроническая фотоактивация глии Бергмана, экспрессирующей ChR2– ГBChR2) и специфического (экспрессия мутантного Атаксина 1) раздражителей астроцитов коры мозжечка), определить влияние астроглии на трансинаптическую передачу клеток Пуркинье (КП) на ранних стадиях патогенеза и оценить влияние мемантина на этот процесс.

Для моделирования астроцитарно-индуцированной нейродегенерации мозжечка в кору мозжечка мышей линии ICR (CD1) вводили 10µl AVV GFAP-ChR2-mKate2 ( $3,4 \times 10^7$  частиц/мл) и 4 дня фотостимулировали повторными световыми импульсами ( $\lambda=480$ нм, 20 мсек с частотой 0,1 Гц в течение 1 мин с последующим 1 мин перерывом) светодиодом, прикреплённым над зоной инъекции к костям черепа. Мышам второй опытной группы вводили 3µl LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag ( $6,8 \times 10^9$  частиц/мл). Мышам контрольной группы вводили 10µl PBS.

Материал собирали из пораженных участков мозга. По результатам ИГХ в модели с хронической фотоактивацией ГBChR2 по сравнению с контролем выявлено уменьшение количества КП и ширины МС.

В живых срезах регистрировались ПВ-ВПСТ, УПИ, ёмкость и сопротивление мембраны. Используя патч-кламп, мы обнаружили, что ёмкость КП также была снижена у этих животных.

Для оценки нейропротекторного эффекта у животных с реактивной ГBChR2 мы использовали раствор мемантина (90 мг/кг массы тела) в течение 4 дней после фотоактивации. Мемантин снижает эксайтотоксичность за счёт увеличения количества молекул обратного захвата глутамата, таких как EAAT1. Это приводит к частичному восстановлению нормальной морфологии ГBChR2. Также это положительно влияет на дендритное дерево КП и на общее количество КП. Таким образом, уменьшение эксайтотоксичности может быть связано с прямым воздействием блокаторов NMDA рецепторов на астроциты и опосредованным на КП через усиление обратного захвата нейромедиаторов, что защищает от нейродегенерации.

Подобные патоморфологические изменения и положительный эффект от перорального введения мемантина мы нашли в модели астроглиоза с селективной экспрессией мутантного Атаксина 1 в ГБ.

Грант РФФИ № 19-315-90044\19



**ICTAL DISCHARGE SPREADS THROUGH A CORTICAL REGION WITH NEURONS BEING IN THE DEPOLARIZATION BLOCK IN 4-AMINOPYRIDINE MODEL OF EPILEPSY IN VITRO**

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

<sup>1</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia, <sup>2</sup> Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

e-mail: anton.chizhov@mail.ioffe.ru

Prevention of ictal activity spread within the cortex is a promising way to control seizures; however, mechanisms of the spread are still unclear. Three possible mechanisms involve: (i) potassium diffusion in the extracellular space, (ii) synaptic interactions, or (iii) neuronal interactions through extracellular electric field. To distinguish between the mechanisms, we blocked local synaptic interactions in a limited domain of a cortical slice and observed ictal discharge propagation through this barrier. The blockade was done with a photostimulation of neurons expressing channelrhodopsin in horizontal slices of the entorhinal cortex of adult Thy1-ChR2-YFP mice within a region with 200—300  $\mu$ m diameter. A low-intensity photostimulation (10%) leads to the continuous action potential generation whereas a high-intensity photostimulation (>20%) resulted in the depolarization block in those neurons, so they could not generate action potentials and contribute to synaptic signaling. Epileptic activity in deep layers of the entorhinal cortex was monitored with the whole-cell patch-clamp in voltage- or current-clamp recordings. Focal ictal activity induced by local application of NMDA (1 mM) [1] was recorded in an excitatory neuron at a distance of 400-500  $\mu$ m from the focus. The low-intensity optogenetic stimulation between the recorded neuron and the epileptic focus did not prevent the spread of the ictal activity (n = 12, 5 mice). In contrast, high-intensity stimulation itself provoked ictal discharges (n = 11, 5 mice). The observations are arguments against the hypotheses based on the local synaptic interactions and the electric field. We conclude that the ictal activity can pass through zones of blocked neuronal activity because of long-range connections.

*References:*

[1] Sessolo M, Marcon I, Bovetti S, Losi G, Cammarota M, Ratto GM, Fellin T, Carmignoto G. Parvalbumin-positive inhibitory interneurons oppose propagation but favor generation of focal epileptiform activity. *J Neurosci.* 2015;35(26):9544-57. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5117-14.2015

This work was supported by the Russian Science Foundation № 16-15-10201.

**ИКТАЛЬНЫЙ РАЗРЯД РАСПРОСТРАНЯЕТСЯ ЧЕРЕЗ ОБЛАСТЬ ЭНТОРИНАЛЬНОЙ КОРЫ, В КОТОРОЙ НЕЙРОНЫ НАХОДЯТСЯ В СОСТОЯНИИ ДЕПОЛЯРИЗАЦИОННОГО БЛОКА, В 4-АМИНОПИРИДИНОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ IN VITRO**

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

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия, <sup>2</sup> «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: anton.chizhov@mail.ioffe.ru

Предотвращение распространения иктальной активности по корковой нервной ткани является многообещающим способом контроля судорог, однако механизмы распространения пока неясны. Три возможных механизма включают: (i) диффузию калия во внеклеточном пространстве, (ii) синаптические взаимодействия или (iii) нейрональные взаимодействия через внеклеточное электрическое поле. Чтобы различить эти механизмы, мы блокировали локальные синаптические взаимодействия в ограниченной области кортикального среза и наблюдали распространение иктального разряда через эту преграду. Блокада была сделана с помощью фотостимуляции нейронов, экспрессирующих каналородопсин, в горизонтальных срезах энторинальной коры взрослых мышей Thy1-ChR2-YFP в пределах области диаметром 200-300-мкм. В случае малой интенсивности (10%) фотостимуляция нейронов вызывала непрерывную генерацию потенциалов действия, тогда как при интенсивности выше 20% фотостимуляция приводила к деполяризационному блоку в этих нейронах, поэтому они не могли генерировать потенциалы действия и вносить вклад в синаптическую передачу сигналов. Эпилептическую активность в глубоких слоях энторинальной коры контролировали с помощью патч-кламп регистраций в режимах фиксации тока или потенциала. Иктальная активность вызывалась локализованной аппликацией NMDA (1 мМ) [1] и регистрировалась в возбуждающем нейроне на расстоянии 400-500 мкм от фокуса активности. Оптогенетическая стимуляция между зарегистрированным нейроном и эпилептическим очагом не препятствовала распространению иктальной активности. Вместо этого, при малой интенсивности фотостимуляции иктальные разряды проходили через освещенную область (n = 12, 5 мышей); при достаточно высокой интенсивности сама световая стимуляция вызывала иктальные разряды (n = 11, 5 мышей). Эти наблюдения являются аргументами против гипотез, основанных на локальных синаптических взаимодействиях и электрическом поле. Мы пришли к выводу, что иктальная активность способна проходить через зоны блокированной активности нейронов посредством дальних связей.

*Литература*

[1] Sessolo M, Marcon I, Bovetti S, Losi G, Cammarota M, Ratto GM, Fellin T, Carmignoto G. Parvalbumin-positive inhibitory interneurons oppose propagation but favor generation of focal epileptiform activity. J Neurosci. 2015;35(26):9544-57. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5117-14.2015

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда № 16-15-10201.

***OPTOGENETIC ACTIVATION OF GLUTAMATERGIC NEURONS OF THE MEDIAL SEPTUM MODULATES THE THETA-GAMMA INTERACTIONS IN THE HIPPOCAMPUS***

Dmitrieva E.A., Malkov A.E.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Russia

e-mail: a.elena.dmitrieva@gmail.com

Oscillatory activity of the hippocampus and parahippocampal structures encodes information during cognition. Multiple researchers emphasize the hippocampal cross-frequency theta-gamma coupling (TGC) as a basic mechanism for information processing, retrieval and consolidation of long-term and working memory. While the role of entorhinal afferents in modulation of hippocampal TGC widely accepted, the influence of other main input from medial septal area (MSA) poorly understood. This pacemaker of the hippocampal theta rhythm, innervates multiple targets in hippocampus, so information about the participation of MSA in cross-frequency interactions might be critical for understanding of neural coding. Optogenetics allows us to explore how different neuronal populations of septohippocampal circuit control neuronal oscillations in vivo. Recently it was shown that optogenetic activation of glutamatergic projections to hippocampus with theta-frequency stimuli paces the hippocampal theta rhythm, while high frequency (40Hz) modulation of septohippocampal GABAergic loop modulates memory performance in transgenic mice.

Here we have investigated the influence of phasic activation of medial septal glutamatergic neurons expressing channelrhodopsin II on theta-gamma coupling in hippocampus. Transgenic mice (B6.Cg-Tg(Thy1-COP4/EYFP)18Gfng/J) were used in this experiment. After verification of ChR2 expression in MSA the optic fiber just above MSA and the recording electrodes in CA1 and CA3 hippocampal fields were implanted. During the experiment local field potentials of MSA and hippocampus of freely behaved mice were modulated by 470nm light flashes (5-10ms) with frequency 2-12 Hz.

It was shown that both the power and preferred phase of gamma rhythm nested on hippocampal theta depend on frequency of stimulation. The modulation of the power of slow gamma rhythm (30-50 Hz) prevailed during flash train and augmented with increase of stimulation frequency. We discuss the possibility that phasic depolarization of septal excitatory neurons controls theta-gamma coupling in hippocampus and plays a role in memory retrieval and consolidation.

RFBR 118-015-00157-a

***DORSAL RAPHE NUCLEUS SEROTONERGIC NEURONS TAKE PART IN THE MECHANISM OF KETAMINES ANTIDEPRESSANT EFFECTS***

Drozd U.S., Lanshakov D.A., Shaburova E.V., Dygalo N.N.  
The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of  
the Russian Academy of Sciences (ICG SB RAS), Novosibirsk, Russia

e-mail: drozdnsu@gmail.com

**Introduction:** The interaction of glutamate and serotonergic neurotransmissions is involved in the mechanism of ketamine action, however, the role of activation of serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus (DRN) in the antidepressant effect of ketamine remains unclear. In this work, we studied the effect of optogenetic inhibition of the activity of these neurons on the antidepressant action of ketamine.

**Methods:** Lentiviral vector containing the archaerhodopsin-3 (eArchT3.0) and a yellow fluorescent protein (eYFP) under the control of TPH2 promoter specific for serotonergic neurons or control vector (TPH2-Venus) were injected stereotaxically into the DRN of adult Wistar rats. One week later part of rats was deeply anesthetized and green light (560 nm, 1.2 mW, 20 pulses/sec) was applied to the DRN for 3 min. Expression of c-Fos and eArchT3.0-eYFP in the TPH-positive neurons was investigated immunohistochemically using confocal microscopy. Another part of rats was stereotaxically implanted with an optical fiber into DRN. One week later ketamine (15mg/kg) or saline were injected i.p. 1 hour before TST. During the 1, 3 and 5 minutes of the test, each animal received optogenetic stimulation with the same light parameters as described above. The tests were videotaped and immobility was quantified during each min of the test.

**Results:** One week after LVV injection, the specific expression of eArchT3.0-eYFP in serotonergic neurons was confirmed by immunohistochemistry. Green light illumination for 3 min via optic fiber placed above the DRN decreased c-Fos expression in eYFP- or Venus-positive cells in TPH2-eArchT3.0 injected rats, compared with the TPH2-Venus injected rats. Optogenetic inhibition of DRN serotonergic neurons leads to the abolition of the antidepressant effect of ketamine in TST and even turns the effect of this drug into a sedative. Moreover, the inhibition of the activity of serotonergic neurons of DRN in animals that were injected with saline did not alter the duration of immobility.

**Conclusion:** The key role of the activity of DRN serotonergic neurons in the manifestation of the antidepressant effect of ketamine in the TST was shown for the first time. This result complements the available data on the mechanism of action of ketamine necessary for the development of the next generation of fast-acting and more effective antidepressants.

We thank Kazuki Nagayasu (Kyoto University, Japan) for providing plasmids TPH2-eArchT3.0-eYFP-WPRE and TPH2-Venus-WPRE.

RFBR Grant No 18-315-00114.

**СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ ДОРСАЛЬНОГО ЯДРА ШВА ПРИНИМАЮТ УЧАСТИЕ В МЕХАНИЗМЕ АНТИДЕПРЕССАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ КЕТАМИНА**

Дрозд У.С., Ланшаков Д.А., Шабурова Е.В., Дыгало Н.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), Новосибирск, Россия

e-mail: drozdnsu@gmail.com

**Введение:** Взаимодействие глутамата и серотонинергических нейротрансмиссий участвует в механизме действия кетамина, однако роль активации серотонинергических нейронов ядра дорсального шва (DRN) в антидепрессантном действии кетамина остается неясной. В данной работе изучено влияние оптогенетического ингибирования активности этих нейронов на проявление антидепрессивного действия кетамина.

**Методы:** Lentивирусный вектор, кодирующий археародопсин (eArchT3.0) и желтый флуоресцентный белок (eYFP) под контролем промотора TRH2, специфичного для серотонинергических нейронов, или контрольный вектор (TRH2-Venus) в стереотаксисе вводили в область DRN взрослых крыс линии Вистар. Через неделю часть животных были подвергнуты оптостимуляции зеленым светом (560 нм, 1,2 мВ/мм<sup>2</sup>, 20 имп./с) под наркозом в течение 3 минут. Далее экспрессия c-Fos и eArchT3.0-eYFP в TRH2-позитивных нейронах исследовалась иммуногистохимически при помощи конфокального микроскопа. Другой части животных имплантировали оптоволоконную канюлю в область DRN и через неделю после этого вводили кетамин (15 мг/кг) или физ. раствор в качестве контроля за 1 час до теста “подвешивание за хвост”. В течение 1, 3 и 5 минуты теста проводилась оптостимуляция с теми же параметрами, что описаны выше. В течение теста велась видеозапись поведения, при анализе которого определялось время неподвижности животного в течение каждой минуты теста.

**Результаты:** Через неделю после инъекции вектора наблюдалась специфичная экспрессия eArchT3.0-eYFP в серотонинергических нейронах, выявленных иммуногистохимически. Стимуляция зеленым светом DRN приводила к снижению количества экспрессирующих одновременно оптогенетический вектор и c-Fos нейронов по сравнению с контрольным вектором. Оптогенетическое подавление активности серотонинергических нейронов DRN приводило к отмене антидепрессантного эффекта кетамина в тесте “подвешивание за хвост” и даже обращало его действие в седативное. Однако, само по себе ингибирование активности этих нейронов у контрольной группы не приводило к изменению неподвижности.

**Заключение:** В работе впервые показана ключевая роль активности серотонинергических нейронов DRN в проявлении антидепрессантного действия кетамина. Этот результат дополняет существующие данные о механизме действия кетамина необходимые для разработки следующего поколения более эффективных антидепрессантов.

Авторы выражают благодарность Казуки Нагаюсу (Kyoto University, Japan) за любезное предоставление плазмид TRH2-eArchT3.0-eYFP-WPRE и TRH2-Venus-WPRE.

Финансирование работы - грант РФФИ №18-315-00114 мол\_a

***OPTOGENETIC AND CHEMOGENETIC INVESTIGATION OF THE NEURAL MECHANISMS UNDERLYING ANXIETY AND DEPRESSION***

Dygalo N.N.<sup>1</sup>, Lanshakov D.A.<sup>1</sup>, Komysheva N.P.<sup>1</sup>, Drozd U.S.<sup>2</sup>, Kalinina T.S.<sup>2</sup>,  
Bannova A.V.<sup>1</sup>, Sukhareva E.V.<sup>2</sup>, Shishkina G.T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia, <sup>2</sup> Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

e-mail: dygalo@bionet.nsc.ru

**Introduction.** The psycho-emotional functions of the central nervous system supported by the coordinated activity of neural networks localized in interconnected parts of the brain. Anxiety and depression appear to be "network" pathologies ("circuitopathy"). Most connections between neurons in brain structures are glutamatergic. Changes in the mRNA levels for glutamate receptor subunits in the midbrain and hippocampus of laboratory animals during the induction of a depressive-like state by chronic stress allows us to outline this network, however, the role of the activity of specific groups of neurons that form the pathological state remains unclear.

**Methods.** Opto- and chemo-genetic approaches used to solve this problem.

**Results.** During opto-stimulation of the glutamatergic CA1 neurons of the hippocampus, an increase in the depressive-like behavior occurred exactly during periods of stimulation. Unlike optogenetics, which directly changes the activity of a neuron due to ion current through the membrane, chemogenetics based on DREADDs, not directly changes the discharge activity, but rather through modulating its threshold, and thus well suited for analyzing the effects of long-term modulation. Chemogenetically induced activation of the glutamatergic neurons of the dorsal hippocampus did not affect the severity of the stress-induced depressive-like state, but significantly increased the latent period of its manifestation. The chemogenetic activation of glutamatergic neurons of the prefrontal cortex reduced the anxiety of animals, but did not affect their depressive-like behavior. At the same time, chemogenetically induced decrease in the activity of these cortical neurons significantly enhanced the depressive-like behavior of animals.

**Conclusions.** In general, the results of the work indicate that glutamatergic neurons of the prefrontal cortex and the hippocampus involved in the neural mechanisms of anxiety and depression. Thus, modulation of these neurons activity has potential for its use with therapeutic purposes.

This work supported by the grant from the Russian Science Foundation 19-15-00093.

***H<sub>2</sub>S DECREASES THE CALCIUM TRANSIENTS INDUCED BY ACTIVATION OF ATP RECEPTORS IN RAT TRIGEMINAL NEURONS***

Ermakova E.V., Koroleva K.S., Sitdikova G.F.  
Kazan Federal University, Kazan, Russia

e-mail: latinochrome0@gmail.com

**Introduction.** Migraine is a widespread disorder with not fully understood pathogenesis. The purinergic hypothesis suggests a significant role of ATP and its metabolites in migraine pathophysiology. An activation of ATP receptors in the trigeminal system increases nociceptive spiking in the peripheral part of the trigeminal nerve. ATP is associated with activation of P2X<sub>3</sub>-receptors (P2X<sub>3</sub>R) and mast cell degranulation, followed by the release of several active agents. In trigeminal ganglion (TG) neurons ATP opens the cation channels and causes an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup>-level. Gasotransmitter hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) participates in nociception and can exert both pro- and antinociceptive effects, however, its effect on purinergic nociceptive mechanisms is not clear. This work aimed to analyze the effects of the NaHS – H<sub>2</sub>S donor on Ca<sup>2+</sup>-signals induced by ATP and P2X<sub>3</sub>R-agonist  $\alpha$ , $\beta$ -meATP in rat TG-neurons.

**Methods.** The experiments were carried out on isolated TG-neurons of rats aged 10-15 days. To visualize calcium signals Fluo4-AM dye (2  $\mu$ M) was used. To differentiate neuronal and glial cells, KCl (100 mM) was applied at the end of the experiments. To avoid desensitization agonists were applied using a fast perfusion system for 2 sec with an interval of 5 min between repeated applications.

**Results.** ATP (100  $\mu$ M) induced Ca<sup>2+</sup>-transients in 70% of the cells,  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP (20  $\mu$ M) – in 41.4% cells. To control the degree of desensitization of receptors, we analyzed Ca<sup>2+</sup>-signals in 3 repeated applications of agonists. The average amplitudes of the 1st, 2nd and 3rd Ca<sup>2+</sup>-responses to ATP were  $7.56 \pm 0.78$ ,  $7.94 \pm 0.78$ , and  $7.076 \pm 0.74$  r.u., respectively ( $n = 61$ ,  $p > 0.05$ ). P2X<sub>3</sub>R-agonist induced Ca<sup>2+</sup>-responses with an average amplitude  $3.44 \pm 0.45$ ;  $3.38 \pm 0.42$  and  $2.96 \pm 0.29$  r.u. at the 1st, 2nd and 3rd applications respectively ( $n = 33$ ,  $p > 0.05$ ). Next, we analyzed the effects of NaHS (100  $\mu$ M) on agonist-induced Ca<sup>2+</sup>-signals. Application of NaHS for 5 min decreased the mean amplitude of ATP-induced Ca-peaks from  $5.63 \pm 0.60$  r.u. in control to  $3.42 \pm 0.40$  r.u. ( $n = 66$ ;  $p < 0.05$ ). The amplitude of  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP mediated Ca<sup>2+</sup>-responses decreased from  $3.08 \pm 0.30$  r.u. in control to  $2.01 \pm 0.27$  r.u. in 5 min of NaHS incubation ( $n = 27$ ,  $p < 0.05$ ).

**Conclusions.** Our results for the first time demonstrated that H<sub>2</sub>S reduces the amplitude of Ca<sup>2+</sup>-signals induced by the application of ATP or P2X<sub>3</sub>R-agonist, which may decrease the pronociceptive effects of ATP in rat trigeminal system.

RFBR 18-315-00256 and NSFC according to the research project 20-515-53005

**ACTIVITY OF PARIETAL ASSOCIATION CORTEX NEURONS DURING  
COMPLEX FEAR MEMORY FORMATION AND RETRIEVAL IN MICE**

Efremov A.A., Rogozhnikova O.S., Toropova K.A., Ivashkina O.I., Anokhin K.V.  
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

e-mail: efremov.aleksei.2016@post.bio.msu.ru

The development of complex associations like those observed in conditioning to complex stimuli (CCS) is one of the key characteristics of memory. The ability of animals to learn in CCS experiments, in other words, their capability for integration of multimodal information is one of the fundamental mechanisms of brain activity and some authors consider it to be a marker of early forms of consciousness [1]. However, the mechanisms and neural substrates of such learning remain poorly investigated.

Here we employ a method of fear conditioning of C57/Bl6 mice for a complex stimulus, consisting of sound and light. During the training session, mice received 7 pairings between CCS and footshock. After that, with an interval of 24 hours, three consecutive test sessions were conducted: for the full CCS, as well as for its sound and light components. The animals were placed in different contexts during each session to exclude its effect on freezing. During the experiment, we have registered calcium activity in mice parietal association cortex (PAC) neurons using an in vivo fiber photometry method [2]. PAC is a neocortex area which is considered to be a multimodal association cortex [3]. To prepare the mice for fiber photometry, adeno-associated virus vector with CAG promoter that carried calcium indicator gene has been injected intracranially to the PAC and a fiber optrode has been installed subsequently to the same place.

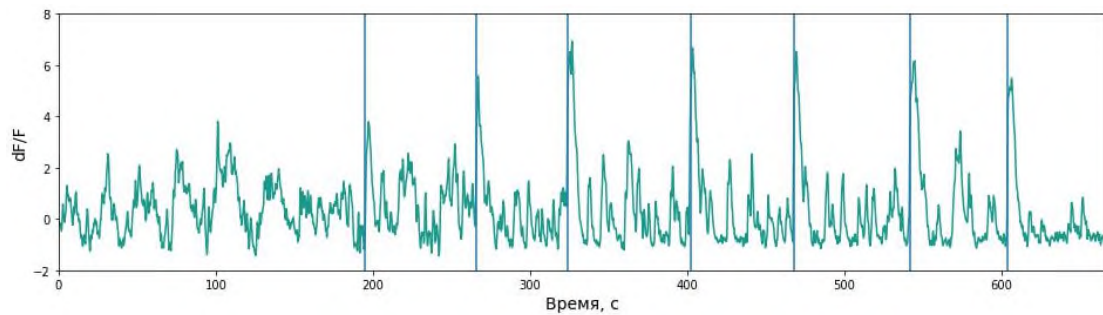
Mice have demonstrated an ability to learn in the fear conditioning to CCS protocol with simultaneous fiber photometry of PAC neuronal activity. We have registered activity in the PAC and calcium events during the formation and retrieval of CCS memory and memory about its components. The amplitude of calcium transients was higher in response to unconditioned stimuli (Fig.1).

*References:*

- [1] Bronfman Z.Z., Ginsburg S., Jablonka E. The transition to minimal consciousness through the evolution of associative learning // *Frontiers in Psychology*. 2016. Vol. 7, DEC.
- [2] Gunaydin L.A. et al. Natural neural projection dynamics underlying social behavior // *Cell*. Elsevier Inc., 2014. Vol. 157, № 7. P. 1535–1551.
- [3] Torrealba F., Valdés J.L. The parietal association cortex of the rat // *Biol. Res. Society of Biology of Chile*, 2008. Vol. 41, № 4. P. 369–377.

RFBR Grants 17-00-00215, 18-32-20212 and 20-015-00427





**Fig. 1.** An example of the calcium trace in complex stimulus fear conditioning session. Vertical lines represent unconditioned stimuli.

**Рис. 1.** Пример обработанной записи кальциевого сигнала теменной ассоциативной коры мыши при обучении на комплексный условный сигнал. Вертикальные линии – моменты нанесения электрокожного раздражения.

### ***АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ТЕМЕННОЙ АССОЦИАТИВНОЙ КОРЫ МЫШИ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ И ИЗВЛЕЧЕНИИ ПАМЯТИ О КОМПЛЕКСНЫХ УСЛОВНЫХ СИГНАЛАХ***

Ефремов А.А., Рогожникова О.С., Торопова К.А., Ивашкина О.И., Анохин К.В.  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва,  
Россия

e-mail: efremov.aleksei.2016@post.bio.msu.ru

Одной из ключевых особенностей памяти является способность живых организмов формировать комплексные воспоминания, в том числе при ассоциативном обучении на комплексные условные сигналы (КУС). Способность к такому обучению, то есть способность к интеграции мультимодальной информации, является фундаментальным механизмом деятельности мозга и некоторыми авторами считается маркером ранних форм сознания [1]. Однако на данный момент механизмы и нейрональные субстраты такого обучения остаются малоизученными.

В данной работе применена модель выработки у мышей линии C57/B16 реакции условно-рефлекторного замирания (УРЗ) на предъявление КУС, состоящего из звукового и светового компонентов. В сессию обучения проводили 7 сочетаний КУС и электрокожного раздражения лап. Далее с промежутком в 24 ч проводили три последовательные сессии тестирования животных: на полный КУС, а также его звуковой и световой компоненты. В каждой сессии эксперимента мышей помещали в новый контекст для устранения влияния обстановки на результаты тестирования. При обучении животных и их тестировании проводили регистрацию активности нейронов их теменной ассоциативной коры (ТАК) методом оптоволоконной фотометрии [2]. ТАК – ассоциативная область неокортекса, в которой происходит интеграция сенсорной информации разных модальностей [3]. Для этого мышам проводили операцию, в ходе которой в ТАК был введен AAV вирусный вектор, несущий

генетически кодируемый кальциевый сенсор под неспецифическим промотором CAG, а также оптическое волокно.

Было показано, что животные успешно обучаются в задаче УРЗ на КУС в условиях параллельной оптоволоконной регистрации активности нейронов ТАК. Кроме того, в ТАК была зарегистрирована активность, а также выделены значимые кальциевые события при формировании и извлечении памяти о КУС и его компонентах. Наибольшая амплитуда кальциевых ответов в теменной ассоциативной коре наблюдалась во время нанесения животным электрокожного раздражения (Рис.1).

*Литература:*

- [1] Bronfman Z.Z., Ginsburg S., Jablonka E. The transition to minimal consciousness through the evolution of associative learning // *Frontiers in Psychology*. 2016. Vol. 7, DEC.
- [2] Gunaydin L.A. et al. Natural neural projection dynamics underlying social behavior // *Cell*. Elsevier Inc., 2014. Vol. 157, № 7. P. 1535–1551.
- [3] Torrealba F., Valdés J.L. The parietal association cortex of the rat // *Biol. Res. Society of Biology of Chile*, 2008. Vol. 41, № 4. P. 369–377.

Гранты РФФИ № 17-00-00215, 18-32-20212 и 20-015-00427

***NEXT GENERATION OPTOGENETIC TOOLS***

Gordeliy V.I.<sup>1</sup>, Kovalev K.V.<sup>2</sup>, Zabelskii D.<sup>3</sup>, Bratanov D.<sup>3</sup>, Alekseev A.A.<sup>4</sup>,  
Shevchenko V.A.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),  
Moscow, Russia, <sup>2</sup> Institut für Biologische Informationsprozesse: Structural  
Biochemistry (IBI-7), Research Centre Juelich, Juelich, Germany, <sup>3</sup> Research Center  
for Molecular Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases, Moscow Institute for  
Physics and Technology, Moscow, Russia, <sup>4</sup> The University of Aachen (RWTH),  
Aachen, Germany

e-mail: valentin.gordeliy@gmail.com

We will describe recent discoveries and properties of rhodopsins [1, 2, 3] which are potential candidates as next generation optogenetic tools.

Comprehensive structure-function studies of the representatives of recently characterized xenorhodopsins (XeRs), a family of microbial rhodopsins will be presented. We showed that these proteins are inward proton pumps in *E.coli* cells, human embryonic kidney cells, neuroblastoma cells and rat hippocampal neuronal cells. It will be demonstrated that the XeRs are powerful pumps which are able to elicit action potentials in rat hippocampal neuronal cells up to their maximal intrinsic firing frequency, proving that the inwardly directed proton pumps are suitable for light induced remote control of neurons and are an alternative to the well-known cation selective channelrhodopsins [3, 4].

In addition, we will provide for the first time the results of structure-function studies of viral rhodopsins and discuss their potential for optogenetic applications.

*References*

- [1] Gordeliy *et al.* Molecular basis of transmembrane signaling by sensory rhodopsin II– transducer complex. *Nature* 419, 484-487 (2002).
- [2] Moukhametzianov *et al.* Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the related transducer. *Nature* 440, 115-119 (2006).
- [3] Shevchenko *et al.* Inward H<sup>+</sup> pump xenorhodopsin: Mechanism and alternative optogenetic approach. *Science Advances* 3: e1603187 (2017).
- [4] Volkov *et al.* Structural insights into ion conduction by channelrhodopsin 2. *Science* 358: eaan8862 (2017).

RSF 19-44-06302

## ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИНСТРУМЕНТЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Горделий В.И.<sup>1</sup>, Ковалев К.В.<sup>2</sup>, Забельский Д.<sup>3</sup>, Братанов Д.<sup>3</sup>,  
Алексеев А.А.<sup>4</sup>, Шевченко В.А.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Москва, Россия, <sup>2</sup> Институт Биологических Информационных Процессов: Структурная Биохимия (IBI-7), Научно-исследовательский центр Юлиха, Юлих, Германия, <sup>3</sup> Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, МФТИ, Москва, Россия, <sup>4</sup> Рейнско-Вестфальский технический университет Ахена, Ахен, Германия

e-mail: valentin.gordeliy@gmail.com

Мы представляем результаты последних исследований свойств белков родопсинов [1, 2, 3], которые являются потенциальными кандидатами в качестве инструментов оптогенетики нового поколения.

Так, будут описаны комплексные структурно-функциональные исследования представителей найденного в недавнем времени семейства ксенородопсинов (XeRs). Мы продемонстрировали, что эти белки являются светочувствительными протонными насосами, способными переносить протон внутрь клетки, в клетках кишечной палочки *E.coli*, в эмбриональных клетках печени человека, в клетках нейробластомы, а также в нейронах гиппокампа крыс. Мы также показали, что ксенородопсины являются сильнодействующими насосами, способными создавать активирующий потенциал в нейронах гиппокампа крыс с максимальной частотой возбуждения. Это доказывает, что инвертированные протонные помпы являются подходящими кандидатами для оптогенетического контроля нейронов, представляя собой инструменты нового поколения, альтернативные широкоиспользуемым канальным родопсинам, селективным к катионам [3, 4].

В дополнение, впервые мы обсудим результаты структурно-функциональных исследований вирусных родопсинов, а также их потенциал для использования в оптогенетике.

*Литература*

- [1] Gordeliy et al. Molecular basis of transmembrane signaling by sensory rhodopsin II– transducer complex. *Nature*. 419, 484-487 (2002).
- [2] Moukhametzianov et al. Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the related transducer. *Nature* 440, 115-119 (2006).
- [3] Shevchenko et al. Inward H<sup>+</sup> pump xenorhodopsin: Mechanism and alternative optogenetic approach. *Science Advances* 3: e1603187 (2017).
- [4] Volkov et al. Structural insights into ion conduction by channelrhodopsin 2. *Science* 358: eaan8862 (2017).

РНФ 19-44-06302

***NEURONAL ENCODING OF OBJECT-TYPE AND OBJECT-PLACE MEMORIES IN MOUSE HIPPOCAMPUS AND RETROSPLLENIAL CORTEX***

Ivashkina O. I.<sup>1,2,3</sup>, Toropova K.A.<sup>1,2,3</sup>, Rogozhnikova O.S.<sup>2</sup>, Gruzdeva A.M.<sup>4</sup>,  
Plusnin V.V.<sup>1</sup>, Sotskov V.P.<sup>2</sup>, Fedotov I.V.<sup>5</sup>, Anokhin K.V.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russia, <sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <sup>3</sup> Scientific Research Institute of Normal Physiology named after P.K. Anokhina, Moscow, Russia <sup>4</sup> Max Planck Institute of Neurobiology, Martinsried, Germany, <sup>5</sup> Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

e-mail: oivashkina@gmail.com

Neuronal encoding of environmental information has long been in the focus of neuroscience. However, despite a considerable amount of experimental data, the specific neural bases of space and objects encoding remain an open question. In this work, we test the hypothesis that neurons in different regions of the brain, hippocampus and retrosplenial cortex (RSC) encode spatial and object information respectively. For this purpose, we developed an approach combining optical recording of neuronal activity and assessment of animal behavior during novel object recognition (NOR) and object place recognition (OPR) tasks.

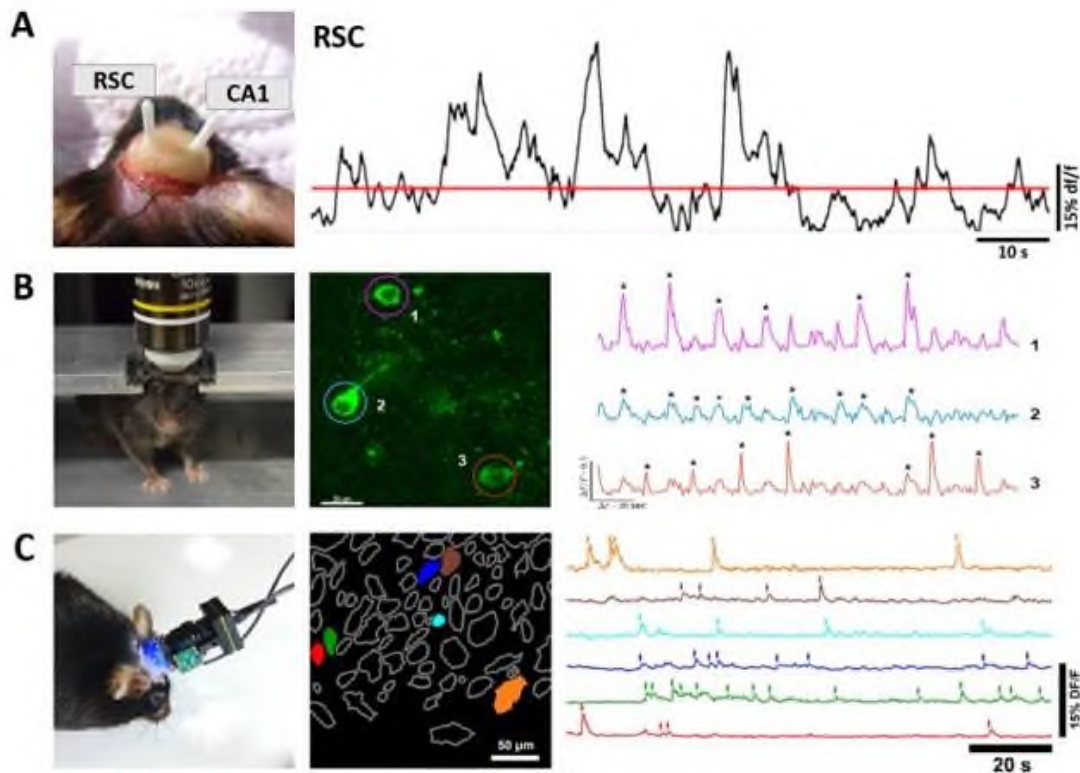
First, we recorded the object-type and object-place related calcium activity in the RSC and hippocampus CA1 of mice using genetically encoded calcium sensor and fiber-optic photometry (Fig. 1, A). We found an increase in number of calcium events in the RSC when animals examined new position of the familiar object. We also discovered a decrease in the RSC activity during exploration of a novel object.

Next, we developed the object-in-place recognition task in the Mobile Home Cage (MHC, Neurotar Ltd) setup – an air-lifted mobile cage, where a head-fixed animal can move around and explore the environment. We showed that mice actively explored MHC with cues and objects and successfully formed both place and object recognition memories.

Using multiphoton microscopy and NVista minimicroscopy we registered calcium activity of identified RSC (Fig. 1, B) and CA1 (Fig. 1, C) neurons during NOR and OPR tasks performed in the MHC. CA1 neurons demonstrate a subsequent increase in activity in novel situations like adding a new object or moving it to a new place. We also found CA1 location-specialized cells, and these specializations did not depend on the position and type of objects in the MHC. Thus, we have shown that hippocampus encodes information about space, including objects in it, but regardless of their type and position. We also conducted a population analysis of the activity of neurons in the RSC, and showed, that this area is activated specifically with the type of objects, regardless of their position.

These results support the hypothesis about the independent encoding of information about space in the hippocampus and information about objects in the retrosplenial cortex. However, the mechanisms of dynamic interactions between the hippocampus and the retrosplenial cortex for encoding complete information about an object in space have yet to be revealed.

RFBR grants 17-00-00215, 19-315-80020, 18-32-20212, 20-015-00427



**Fig. 1.** Neuronal calcium activity in novel object recognition and object place recognition tasks. **A:** fiber-optic photometry of calcium signal from retrosplenial cortex (RSC) and hippocampus CA1; red line baseline. **B:** two-photon microscopy of identified GCaMP6S neurons in the retrosplenial cortex; asterisks show calcium events spikes. **C:** NVista minimicroscopy of GCaMP6S neurons in hippocampus CA1; arrows show calcium spikes.

**Рис. 1.** Нейронная кальциевая активность в задачах распознавания типа и положения объектов. **A:** волоконно-оптическая фотометрия кальциевой активности ретроспленциальной коры (РСК) и гиппокампа CA1; красная линия - базовый уровень. **B:** двухфотонная микроскопия идентифицированных GCaMP6S нейронов в ретроспленциальной коре; звездочки показывают кальциевые события - спайки. **C:** NVista минимикроскопия GCaMP6S нейронов в CA1 гиппокампа; стрелки показывают кальциевые спайки.

### **КОДИРОВАНИЕ ПАМЯТИ О ТИПЕ И ПОЛОЖЕНИИ ОБЪЕКТОВ В ПРОСТРАНСТВЕ НЕЙРОНАМИ ГИППОКАМПА И РЕТРОСПЛЕНИАЛЬНОЙ КОРЫ У МЫШЕЙ**

Ивашкина О. И.<sup>1,2,3</sup>, Торопова К.А.<sup>1,2,3</sup>, Рогожникова О.<sup>2</sup>, Груздева А.М.<sup>4</sup>,  
 Плюснин В.В.<sup>1</sup>, Сотсков В.П.<sup>2</sup>, Федотов И.В.<sup>5</sup>, Анохин К.В.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский Институт», Москва, Россия, <sup>2</sup> Институт перспективных исследований мозга МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, <sup>3</sup> НИИ Нормальной физиологии имени П.К. Анохина, Москва, Россия <sup>4</sup> Институт нейробиологии Макса Планка, Мартинсрид, Германия, <sup>5</sup> Физический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: oivashkina@gmail.com

Нейронное кодирование информации об окружающей среде находится в центре внимания нейробиологии в течение долгого времени. Однако, несмотря

на значительный объем экспериментальных данных, конкретные нейронные механизмы кодирования пространства и объектов в нем остаются открытым вопросом. Данная работа посвящена проверке гипотезы о том, что нейроны в различных областях головного мозга, гиппокампе и ретроспленальной коре (РСК) кодируют информацию о пространстве и объектах, соответственно. Для решения этой задачи нами был разработан подход, сочетающий оптическую регистрацию активности нейронов и оценку поведения животных при решении задач распознавания объектов нового типа (РТО) и находящихся в новом месте (РМО).

Мы регистрировали кальциевую активность, связанную с типом или положением объекта в пространстве, в РСК и гиппокампе CA1 мышей с помощью генетически кодируемого кальциевого сенсора и волоконно-оптической фотометрии (рис. 1, а). Мы обнаружили увеличение количества кальциевых событий в РСК, в те моменты, когда животные обследовали знакомый объект, находящийся в новом месте. Мы также обнаружили снижение активности РСК при обследовании объекта нового типа.

Затем мы разработали модель распознавания типа и положения объектов в мобильной домашней клетке (МДК - Mobile Home Cage, МНС, Neurotar Ltd) – установке на воздушной подушке, в которой закрепленное за голову животное может передвигаться и исследовать окружающую среду. Мы показали, что мыши активно исследовали МДК со зрительными ключами и объектами и успешно формировали память как о типе, так и о положении объектов.

С помощью мультифотонной микроскопии и минимикроскопии NVista была зарегистрирована кальциевая активность идентифицированных нейронов РСК (рис. 1, Б) и CA1 (рис. 1, в) во время выполнения задач РТО и РМО в МДК. Нейроны CA1 демонстрировали увеличение активности в ситуациях новизны, например, при помещении в арену нового объекта или перемещении его на новое место. Мы также обнаружили в CA1 специализированные клетки, специализации которых не зависели от положения и типа объектов в МДК. Таким образом, мы показали, что гиппокамп кодирует информацию о пространстве, включая объекты в нем, но независимо от их типа и конкретного положения. Мы также провели популяционный анализ активности нейронов в РСК и показали, что эта область специфически активизируется в связи с типом объектов, независимо от их положения.

Эти результаты свидетельствуют в пользу выдвинутой гипотезы – о независимом кодировании информации о пространстве в гиппокампе и информации об объектах в ретроспленальной коре. Однако, механизмы динамических взаимодействий гиппокампа и ретроспленальной коры для кодирования полной информации об объекте в пространстве еще предстоит раскрыть.

Гранты РФФИ № 17-00-00215, 19-315-80020, 18-32-20212, 20-015-00427

***MODELING ON-OFF RECEPTIVE FIELDS OF GANGLION CELLS FOR VISION RESTORATION IN RETINAL DEGENERATIVE DISEASES USING OPTOGENETICS***

Kolotova D.E.<sup>1</sup>, Petrovskaya L.E.<sup>2</sup>, Roshchin M.V.<sup>1</sup>, Smirnova G.R.<sup>1</sup>, Balaban P.M.<sup>1</sup>,  
Malyshev A.Yu.<sup>1</sup>

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

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

e-mail: kolotova.darya@yandex.ru

Retinal degenerative diseases lead to the death of photoreceptor cells and, ultimately, to blindness. There are various approaches to restore vision in these diseases, including the optogenetic approach. Using optogenetics, it is possible to express photosensitive proteins (opsins) in survived retinal neurons. An important direction of the optogenetic approach is the modeling of On-Off receptive fields in retinal neurons, which is aimed at partial restoration of information processing lost in retinal degeneration.

The aim of this work was to simulate On-Off relationships of receptive fields of retinal ganglion cells in the pyramidal neurons of mice and rats, which were used as model systems. A genetic construct carrying the genes of excitatory (CHR2) and inhibitory (GtACR2) opsins was created. A mutant IRES sequence was inserted between the genes of two opsins to ensure a certain ratio of the expression levels of these two genes in each cell and to reduce the expression of the inhibitory opsin gene. In addition, excitatory opsin was targeted to the somatic region of cells using the Kv2.1 motif. Transfection of rat primary hippocampal neuronal cultures and pyramidal neurons of the cerebral cortex of mice with this construct was carried out. To record the electrical activity of cells, the whole-cell patch-clamp was used. The central or peripheral regions of the neuron were stimulated with blue light (470 nm).

It was shown that light stimulation of the central region of a neuron leads to cell activation. In contrast, light stimulation of the peripheral region causes suppression of neuronal activity.

In our study, we modeled On-Off relationships of receptive fields of retinal ganglion cells in neurons using a genetic construct containing the genes of two opsins. Thus, this construct might potentially be used to restore vision in retinal degenerative diseases.

RNF Grant № 161500291



**МОДЕЛИРОВАНИЕ ON-OFF РЕЦЕПТИВНЫХ ПОЛЕЙ  
ГАНГЛИОНАРНЫХ КЛЕТОК С ЦЕЛЬЮ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЗРЕНИЯ  
ПРИ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СЕТЧАТКИ ПРИ ПОМОЩИ  
ОПТОГЕНЕТИКИ**

Колотова Д. Е.<sup>1</sup>, Петровская Л.Е.<sup>2</sup>, Рощин М.В.<sup>1</sup>, Смирнова Г.Р.<sup>1</sup>, Балабан П.М.<sup>1</sup>,  
Мальшев А.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,  
Москва, Россия, <sup>2</sup> Институт биоорганической химии имени академиков М.М.  
Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

e-mail: kolotova.darya@yandex.ru

Дегенеративные заболевания сетчатки приводят к гибели фоторецепторов и, в конечном итоге, к слепоте. Для восстановления зрения при данных заболеваниях представляется перспективным использование оптогенетических методов, при помощи которых возможно придание светочувствительности выжившим нейронам сетчатки путем экспрессии в них светочувствительных белков (опсинов). Одним из направлений оптогенетического подхода является моделирование On-Off рецептивных полей в нейронах сетчатки, что направлено на частичное восстановление обработки зрительной информации при дегенерации сетчатки.

Целью данной работы было моделирование On-Off взаимоотношений рецептивных полей ганглионарных клеток сетчатки в пирамидных нейронах мышей и крыс, которые были использованы в качестве модельных систем. Была создана генетическая конструкция, включающая гены двух опсинов – возбуждающего (CHR2) и тормозного (GtACR2). Между генами двух опсинов была помещена мутантная IRES-последовательность, которая обеспечивала определенное соотношение уровней экспрессии двух данных генов в каждой клетке, а также ослабляла экспрессию гена тормозного опсина. Помимо этого, осуществлялась направленная доставка возбуждающего опсина в соматическую область клеток при помощи мотива Kv2.1. Проводилась трансфекция данной конструкцией первичных нейрональных культур гиппокампа крыс, а также трансфекция пирамидных нейронов коры мозга мышей. Для регистрации электрической активности клеток применяли метод петч-клямпы в конфигурации «целая клетка». Также осуществлялась стимуляция центральной или периферической области нейрона синим светом (470 нм).

Было показано, что световая стимуляция центральной области нейрона приводит к активации клетки. Световая стимуляция периферической области, напротив, вызывала подавление активности нейрона.

В нашей работе было проведено успешное моделирование On-Off взаимоотношений рецептивных полей ганглионарных клеток сетчатки в нейронах с помощью генетической конструкции, содержащей гены двух опсинов. Таким образом, созданная конструкция может быть потенциально использована для восстановления зрения при дегенеративных заболеваниях сетчатки.

Грант РФФИ № 161500291

***EPIGENETIC REGULATION OF NEURONAL GENES – NEPRILYSIN AS A  
ROLE MODEL***Nalivaeva N.N.<sup>1</sup>, Turner A.J.<sup>2</sup>, Zhuravin I.A.<sup>1</sup><sup>1</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St.Petersburg, Russia, <sup>2</sup> University of Leeds, Leeds, UK

e-mail: n.n.nalivaeva@leeds.ac.uk

Epigenetic regulation of gene expression in response to various stimuli and factors is important for normal brain development and plasticity. It involves orchestration of numerous transcription factors which might be active only during development or in the adult nervous system. Mechanisms of epigenetic regulation include chromatin modifications (DNA methylation, post-translational histone modifications) and a fast-growing spectrum of small non-coding RNAs. Histone deacetylases (HDAC) which control gene silencing play an important role in gene regulation. The recently discovered mechanism of epigenetic regulation of a neuropeptidase neprilysin (NEP) and other genes by the amyloid precursor protein (APP) intracellular domain (AICD) and its dependence on the cell type and APP isoform expression suggest possibilities for selective manipulation of gene expression in neuronal cells. Our studies strongly indicate that in the process of gene regulation AICD competes with HDAC occupancy on the target gene promoters and treatment of cells or animals with HDAC inhibitors such as valproic acid results in up-regulation of NEP and TTR mRNA and protein levels and increased NEP activity leading to a reduction in total cellular amyloid (A $\beta$ ) peptide levels. Overexpression of APP in neuronal cells, in turn, affects the levels of HDAC mRNA expression, which extends the role of this protein in gene regulation. The development profile and specificity of NEP gene expression in the brain suggest the existence of a certain specificity in its epigenetic regulation in different brain structures and cell types. Understanding these mechanisms and modulating NEP expression in the brain by various classes of natural and synthetic compounds, including HDAC inhibitors or chromatin modulators, opens new avenues for developing preventive strategies in neurodegeneration and Alzheimer's disease.

RFBR-19-015-00232

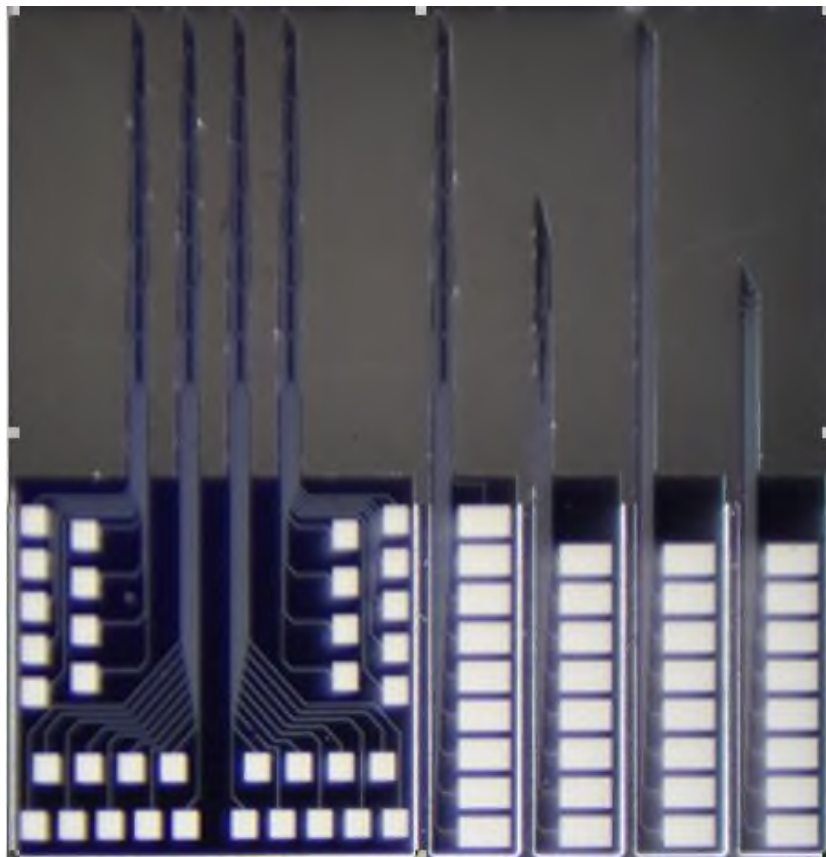
***MULTICHANNEL LOCAL FIELD POTENTIAL ACQUISITION SYTSEM***

Nekrasov A.P., Komarevcev I.M., Makarov D.A., Vlasova O.L.  
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

e-mail: [hypernyan@gmail.com](mailto:hypernyan@gmail.com)

Local field potential (LFP) is an extracellular signal generated by summed electrical activity of multiple neurons. It can express integral activity of neural tissue near the recording electrode. We have developed a system capable of acquiring LFP from 32 channels simultaneously from an anesthetized or freely behaving animal. The multielectrodes are custom made silicon needle-like probes with metallization. Each of the four needles has eight recording channels. Inter-electrode distance is 200  $\mu\text{m}$  and total area of registration is about  $1.5 \times 1.5 \text{mm}^2$ . The registration unit connects directly to the multielectrode and is responsible for amplification, filtration, digitization as well as streaming data to a computer. The spectrum of the LFP signal has a band of about 500 Hz as opposed to neural spikes' several kHz. The recording unit is capable of filtering out spikes as well as removing DC component to provide consistent and reliable results. The system is currently being tested at the Laboratory of Molecular neurodegeneration of Saint-Petersburg State Polytechnic University.

The Fund for Assistance to Small Innovative Enterprises



**Fig. 1.** A series of microelectrodes

*THERMOGENETIC STIMULATION OF SINGLE MAMMALIAN NEURONS IN ELECTROPHYSIOLOGICAL EXPERIMENTS*

Nikitin E.S., Ermakova Y.G., Roshchin M.V., Lanin A.A., Chebotarev A.S.,  
Kelmanson I.V., Balaban P.M., Zheltikov A.M., Belousov V.V.  
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia

e-mail: [nikitin@ihna.ru](mailto:nikitin@ihna.ru)

Thermogenetics has emerged recently as an evolving extension of optical methods for neuronal stimulation that employing focused light to activate photosensitive cationic channels in neuronal membrane. Light-activation to open photosensitive channels that can be expressed genetically in all types of neurons is aimed to induce depolarization of neuronal membrane to evoke a neuronal discharge. Unlike conventional optogenetics that employs visible spectrum, thermogenetics uses channels gated by heating. It provides the possibility to activate the channels not only with IR-radiation, but also with any other way to heat nervous tissue such as ultrasound or microwave radiation. The permeability of living tissue to IR-radiation is orders higher than that to visible light spectra, which allows use of thermogenetic stimulation in the experiments in vivo without invasive surgery to make access for optogenetic stimulation. On the other hand, the thermal nature of stimulation imposes additional limitations to application of thermogenetics as heating should be quite reasonable to avoid heat shock response at cellular level, while the threshold of activation of channels should be high enough to rule out their activation at normal physiological temperatures. We employed TRPA and TRPV channels for activation of neurons in cultures and acute brain slices in our experiments. In addition, we combined thermogenetics with the genetically encoded fluorescent marked tdTomato and calcium reporter GCaMP6s that required excitation by visible light that did not activate thermochannels.

RFBF 19-015-00022, 20-04-00874

**ПРИМЕНЕНИЕ ТЕРМОГЕНЕТИКИ ДЛЯ АКТИВАЦИИ НЕЙРОНОВ  
МЛЕКОПИТАЮЩИХ В ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ  
ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Никитин Е.С., Ермакова Ю.Г., Роцин М., Ланин А.А., Чеботатов А.С.,  
Келмансон И.В., Балабан П.М., Желтиков А.М., Белоусов В.В.  
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва,  
Россия

e-mail: nikitin@ihna.ru

Термогенетика появилась совсем недавно как эволюционное продолжение методов оптической стимуляции нервных клеток, использующих сфокусированный свет, активирующий фоточувствительные катионные каналы на нейрональной мембране. Активация светом и открытие фоточувствительных каналов, которые можно генетически экспрессировать в любых типах нейронов, вызывает мембранную деполяризацию нейрона и, как следствие, разряд потенциалов действия. В отличие от классических методов оптогенетики, где применяется видимый спектр, термогенетика использует каналы, чувствительные к нагреву. Это позволяет дополнительно использовать активацию этих каналов не только ИК-излучением, но и любыми другими методами нагревания нервной ткани, такими, как ультразвук или микроволновое излучение. Проницаемость живой ткани для стимуляции ИК-излучением на порядки выше, чем для излучений видимого спектра, что потенциально позволяет использовать методы термогенетики в экспериментах *in vivo* без инвазивных хирургических методик, «расчищающих проход» для оптогенетической стимуляции. С другой стороны, тепловая природа стимуляции накладывает дополнительные границы применения метода, так как нагревание должно быть достаточно умеренным, чтобы не вызвать тепловой шок на клеточном уровне, а порог активации каналов должен быть достаточно высоким, чтобы открытие каналов не происходило спонтанно при обычных физиологических температурах. В нашей методике применены каналы TRPV и TRPA для активации нейронов культуры или переживающих срезов мозга. Вместе с ними в термогенетических экспериментах используются генетически кодируемые флуоресцентные маркер *tdTomato* и репортер уровня внутриклеточного кальция *GCaMP6s*, возбуждение которых не оказывает заметного активирующего воздействия на термочаналы, которые не чувствительны к видимому спектру.

РФФИ 19-015-00022, 20-04-00874

**DEVELOPMENT OF PHOTOSWITCHES FOR AMPA AND NMDA RECEPTORS**Nikolaev M.V.<sup>1</sup>, Strashkov D.M.<sup>2</sup>, Ryazantsev M.N.<sup>2</sup>, Tikhonov D.B.<sup>1</sup><sup>1</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia, <sup>2</sup> St. Petersburg Academic University RAS, St. Petersburg, Russia

e-mail: fmedfstud@gmail.com

**Introduction.** Glutamate ionotropic receptors play a key role in synaptic transmission and plasticity. Photosensitive ligands (photoswitches) can provide fast and reversible control of glutamate receptor activity. This will open up new possibilities in the study of the biophysics of synaptic processes. Many photoswitches for various ion channels have been developed to date. However, there are very few photosensitive ligands with high activity and selectivity for glutamate receptors. Taking into account the structural features of NMDA receptors blockers we have synthesized a series of azobenzene-containing compounds that effectively modulate NMDA receptors functions.

**Methods.** The action of compounds was studied in electrophysiological experiments on pyramidal cells of the rat brain hippocampus using the patch-clamp method (voltage clamp, whole-cell configuration). Receptors were activated by selective agonists (NMDA + glycine). The drugs were applied using a fast perfusion system. A monochromator was used as a light source.

**Results.** Most of the tested substances produced an inhibitory effect on NMDA receptors. The most active substances, when applied together with agonists, caused a deep block of NMDA receptors (70 - 80%), which weakened by 40 -50% under ultraviolet radiation (380-400 nm). We found an additional potentiating effect of these substances on NMDA receptors. The potentiation of NMDA-mediated currents was observed when the drugs applied to the perfusion solution before receptor activation by agonist. This effect was also light-dependent. Original experimental protocols allowed us to determine that the inhibitory and potentiating effects of the compounds appear to be mediated by different binding sites to the NMDA receptor.

**Discussion.** Our substances are active at relatively low concentrations (30  $\mu$ M) which makes them promising tools for studying NMDA receptors properties and their role in synaptic transmission. The data obtained are important for the development of new effective photoswitches of glutamate ionotropic receptors, new pharmacological tools for studying the involvement of glutamate receptors in the pathologies of the CNS.

The study was carried out using the equipment of the CCU of the IEPHB RAS.

The reported study was funded by RFBR, project number 20-04-00218.

**THE MODULATION OF NEUROPLASTICITY USING OPTOGENETIC  
STIMULATION OF THE DORSAL HIPPOCAMPUS**

Petrenko V.I., Sorokina L.Ye., Shevandova A.A., Nomerovskaya A.Yu.  
Medical Academy named after S.I. Georgievsky, Simferopol, Russia

e-mail: petrenko-vitalina@mail.ru

**Introduction.** Currently, the modulation of neuroplasticity is one of the topical direction, because a lot of age-related, metabolic and neurodegenerative diseases are associated with memory and learning disorders. In this case, the use of optogenetic technologies that can affect on neurons and modulate its activity becomes especially relevant.

**Aim:** to determine the effects of neuroplasticity modulation using optogenetic stimulation of the dorsal hippocampus.

**Materials and methods.** The study was performed on 20 transgenic mice of the line B6.Cg-Tg (Thy1-COP4/EYFP) 18Gfng/J. The modern stereotaxic technologies were used (Drill Robot, Germany, 2016), a fiber optic neurointerface was introduced into the area of the dorsal hippocampus using stereotaxic atlase of the mouse brain. The blue light (470 nm) stimulation was used in the «on-off» pulse mode, with a total duration of 21 minutes/day for 8 weeks.

Morphological methods with morphometry of the hippocampal density and the number of myelin processes were used. Examination of cognitive functions was performed with Barnes test, in which the track and speed of passing the test, were registered. Statistics analysis was performed with the "Statistica 10.0".

**Results.** Optogenetic stimulation of the dorsal hippocampus leads to an increase in the speed of passing the Barnes test compared to the control group by 22% ( $p<0.01$ ) and a decrease in the track by 28% ( $p<0.01$ ). Light microscopy and morphometry revealed an increase in the dorsal hippocampal density (58.79 cells per 10 000 mm<sup>2</sup>) compared to the control group (46.99 cells per 10 000 mm<sup>2</sup>). Electron microscopy revealed an increase in the number of myelin processes in the parietal (21.00 in the sight) and temporallobes (22.67 in the sight) near the stimulation zone.

**Conclusions.** Optogenetic stimulation of the dorsal hippocampus improves the cognitive abilities, which is manifested by an increase in speed and a decrease in track passing the Barnes test. Morphologically, there is an increase in the dorsal hippocampal density, in the number of myelin processes and dendritic synapses, indicating the activation of neuroplasticity.

The study was carried out with the partial support of the V. I. Vernadsky  
CFU Development Program. 2015-2024

**МОДУЛЯЦИЯ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ С ПОМОЩЬЮ  
ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ ГИППОКАМПА**

Петренко В. И., Сорокина Л.Е., Шевандова А.А., Номеровская А.Ю.  
Медицинская академия им. С.И. Георгиевского, Симферополь, Россия

e-mail: petrenko-vitalina@mail.ru

**Введение.** Одним из современных направлений является поиск возможных способов модуляции нейропластичности для решения проблемы воздействия на нейродегенеративные заболевания, связанные с различными формами нарушения памяти и обучения. При этом становится особенно актуальным применение оптогенетических технологий, способных оказывать влияние на отдельные клетки и ткани.

**Цель исследования:** определить эффекты модуляции нейропластичности в результате длительной оптогенетической стимуляции нейронов дорзального гиппокампа трансгенных мышей.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на 20 трансгенных мышцах линии B6.Cg-Tg(Thy1-COP4/EYFP)18Gfng/J. Для реализации проекта использованы современные технологии стереотаксического внедрения оптоволоконного нейроинтерфейса в область дорзального гиппокампа (стереотаксический аппарат Drill Robot, Германия, 2016). Для стимуляции использовался импульсный режим свечения синим светом длиной волны 470 нм в режиме «on-off», общей продолжительностью свечения 21 мин/день на протяжении 8 недель ежедневно.

Использовались методы общей морфологии головного мозга с морфометрией плотности дорзального гиппокампа и подсчетом количества миелинизированных отростков. Оценка когнитивных функций основывалась на прохождении животными теста Барнса, где оценивалось время и скорость, необходимые для обнаружения укрытия. Статистический анализ выполнялся в программе Statistica 10.0.

**Результаты исследования.** В результате оптогенетической стимуляции дорзального гиппокампа выявлены эффекты модуляции нейропластичности в виде улучшения когнитивных способностей, что объективно проявляется увеличением скорости прохождения теста Барнс по сравнению с контрольной группой на 22% ( $p < 0,01$ ) и сокращением длины трека на 28% ( $p < 0,01$ ). По данным световой микроскопии и морфометрии выявлено увеличение плотности дорзального гиппокампа – 58,79 кл по сравнению с группой контроля – 46,99 кл на 10 000 мкм<sup>2</sup>. По данным электронной микроскопии выявлено увеличение количества миелинизированных отростков в теменной и височной доле в проекции зоны стимуляции – 21 и 22,67 в поле зрения соответственно.

**Выводы.** Оптогенетическая стимуляция дорзального гиппокампа улучшает когнитивные способности животных, что объективно проявляется увеличением скорости и трека при прохождении теста Барнс. Морфологически наблюдается повышение плотности дорзального гиппокампа, увеличение количества миелинизированных отростков и дендритных связей, свидетельствует об активации нейропластичности.

Исследование выполнено при частичной поддержке Программы развития КФУ им. В. И. Вернадского 2015-2024 г.



***MICROBIAL RHODOPSINS IN OPTOGENETICS: PROBLEMS AND PERSPECTIVES***

Petrovskaya L.E.

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow, Russia

e-mail: lpetr65@yahoo.com

Microbial rhodopsins are retinal-containing proteins that perform light-dependent ion transport, sensory and other functions. A large number of their variants have been found in nature or constructed using protein engineering based on information about the spatial structure of the proteins belonging to this family. Cationic and anionic channelrhodopsins are widely used in molecular biology and biomedical research as a universal tool for light-induced regulation of various cellular processes. In particular, the technology of ontogenetic restoration of vision due to the expression of channelrhodopsins in retinal cells is proposed. In order to effectively implement the possibilities of optogenetic approaches, it is necessary to further improve both the functional properties of rhodopsin molecules (increasing sensitivity, optimizing kinetics, etc.) and the mechanisms of their targeted expression in particular cells or cell compartments.

RFBR Grant № 17-00-00165comfi

***МИКРОБНЫЕ РОДОПСИНЫ В ОПТОГЕНЕТИКЕ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ***

Петровская Л.Е.

Институт биоорганической химии им. Шемякина – Овчинникова РАН, Москва, Россия

e-mail: lpetr65@yahoo.com

Микробные родопсины – ретиналь-содержащие белки, осуществляющие светозависимый транспорт ионов, сенсорные и другие функции. Большое количество вариантов микробных родопсинов обнаружено в природе, а также сконструировано с помощью белковой инженерии на основе информации о пространственной структуре белков данного класса. Катионные и анионные каналные родопсины находят широкое применение в молекулярно-биологических и биомедицинских исследованиях в качестве универсального инструмента светоиндуцируемой регуляции различных клеточных процессов. В частности, предложена технология оптогенетического восстановления зрения за счет экспрессии каналных родопсинов в клетках сетчатки. Для эффективной реализации возможностей оптогенетических подходов необходимо дальнейшее совершенствование как функциональных свойств молекул родопсинов (повышение чувствительности, оптимизация кинетики и т.д.), так и механизмов их направленной экспрессии в целевых клетках или компартментах.

РФФИ № 17-00-00165comfi

***RELATIONSHIP BETWEEN CELLULAR REPRESENTATIONS OF INDIVIDUALLY AND SOCIALLY ACQUIRED MEMORIES: C-FOS EXPRESSION PATTERNS AND HIPPOCAMPAL NEURONAL ACTIVITY IN SOCIAL TRANSMISSION OF FOOD PREFERENCE IN MICE***

Plyusnin V.V.<sup>1</sup>, Toropova K.A.<sup>1,2,3</sup>, Ivashkina O.I.<sup>1,2,3</sup>, Anokhin K.V.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russia, <sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <sup>3</sup> P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia

e-mail: witkax@mail.ru

Currently the main efforts in the study of cellular bases of learning are focused on memory acquired through individual experience. However animals can infer knowledge from experience of others, the social transmission of food preference (STFP) being a widespread model for such memory. The neurobiological mechanisms underlying STFP remain not sufficiently understood, as well as the relationship between individual and social memory acquired by one animal. The goal of the present study was to investigate these mechanisms and relations at the cellular level.

For this purpose, we utilized the STFP paradigm in mice. Animals were trained to form a successful short-term (1 hour later), and long-term (24 hours) memory in this task. Then we performed immunohistochemical mapping of the behavior-induced neuronal expression of the of immediate early gene product c-Fos following acquisition and 24-h recall of individual and social memories and identified the brain regions involved in in these two forms of learning. In addition, we registered the calcium activity of CA1 neurons during the acquisition and retrieval of individual and social memories in the same freely moving mice using minimicroscopy. We found the strong specialization of CA1 neurons activity related to feeding and several other forms of behavior in this task. Altogether in this study we report for the first time the activity of hippocampal CA1 neurons during STFP task and describe the relationship between cellular representations of individually and socially acquired memories.

RFBR Grants № 17-29-07083, 17-00-00215, 18-34-00640, 19-315-80020

***ELECTRON TRANSPORT AND SELECTIVE RESONANCE ENHANCEMENT  
OF RAMAN LIGHT SCATTERING IN INTEGRATED SEMICONDUCTOR  
QUANTUM DOTS AND BIOMOLECULAR MATERIALS***

Poloskin E. D.  
Ioffe Institute, St. Petersburg, Russia

e-mail: kinoman85@gmail.com

Rapidly developing nanobiotechnologies have increased interest in the development of a new class nanobiohybrid materials of semiconductor quantum dots (QDs) functionalized by nucleic acid molecules due to the importance of biomacromolecules themselves and, in particular, synthetic oligonucleotides which are fragments of DNA and RNA acids. They are extremely attractive for a wide range of applications in many areas of modern molecular biophysics, genetic engineering, and medicine. This work reveals new features of light scattering caused by nonradiative transfer of a photo-excited electron and hole at the interface of the metamaterial complex of nc-Si/SiO<sub>2</sub> QDs dots functionalized by short oligonucleotides d(5' - 20G, 20T -3'). It has been found that the creation of these additional channels radically modifies the occurrence of Raman scattering. Our approaches revealed an unprecedented in quantum optics resonance coherent energy transfer pathways of a photo-excited electron and hole in metamaterial complexes of the QDs functionalized by the DNAs. A selective resonant inelastic light scattering enhancement in terahertz range visualized in the visible spectral range by a single molecule of the DNA giving evidence for coherent electron motion is discovered. The new knowledge obtained on coherent resonance transport of elementary electron-hole excitations that allow to enhance the optical signal from specific molecules can be used to visualize a broader range of molecular changes in the organic-inorganic interfaces. This finding can help to tailor innovative capabilities of label-free probes in a broader perspective highlighting the potential importance and impact for applications including early diagnosis of diseases at the molecular level.

Presidium RAS Program No. 5: Photonic technologies in probing inhomogeneous media and biological objects

***ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ И СЕЛЕКТИВНОЕ УСИЛЕНИЕ  
РЕЗОНАНСНОГО РАМАНОВСКОГО РАССЕЙЯНИЯ СВЕТА В  
ИНТЕГРИРОВАННЫХ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧКАХ  
И БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАТЕРИАЛАХ***

Полоскин Е. Д.  
ФТИ им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: kinoman85@gmail.com

Быстро развивающиеся направления нанобиотехнологий повышают интерес к разработке нового класса нанобиогибридных материалов полупроводниковых квантовых точек (КТ), функционализированных молекулами нуклеиновых кислот вследствие важности самих биомакромолекул и, в особенности, синтетических олигонуклеотидов, которые являются фрагментами ДНК и РНК. Такие материалы крайне привлекательны для широкого спектра применений во многих областях современной молекулярной биофизики, геной инженерии и медицины. В этой работе выявлены новые особенности процесса рассеяния света, вызываемые безызлучательным переносом электрона и дырки в квантовых точках  $nc\text{-Si/SiO}_2$ , функционализированных олигонуклеотидами  $d(5' - 20G, 20T - 3')$ , где  $d$  – дезоксирибонуклеотиды,  $G$  и  $T$  – нуклеотиды гуанин и тимин, соответственно. Обнаружено, что рождение таких дополнительных каналов радикально модифицирует процесс возникновения рамановского рассеяния света. Наши подходы выявили ранее неизвестные в квантовой оптике пути когерентного переноса энергии фотовозбужденного электрона и дырки на границе раздела комплекса КТ, функционализированных ДНК. Обнаружено селективное усиление резонансного неупругого рассеяния света в терагерцевом диапазоне, визуализируемое в видимом спектральном диапазоне одной молекулой ДНК, что свидетельствует о когерентном движении электронов. Новые знания, полученные по когерентному резонансному переносу элементарных электронно-дырочных возбуждений, которые позволяют усилить оптический сигнал от конкретных молекул, могут быть использованы для визуализации более широкого диапазона молекулярных изменений на границе раздела комплексов органических и неорганических материалов и делает их перспективными как для изучения их структурной организации, так и для применений, включая раннюю диагностику заболеваний на молекулярном уровне.

Программа Президиума РАН № 5 "Фотонические технологии в зондировании неоднородных сред и биологических объектов"

**PHOTO-CONTROLLED MODULATION OF THE INHIBITORY  
POSTSYNAPTIC CURRENTS IN BRAIN SLICES**

Ponomareva D.N.<sup>1</sup>, Petukhova E.O.<sup>1</sup>, Mikhailova N.V.<sup>1</sup>, Bregestovski P.D.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> Kazan State Medical University, Kazan, Russia, <sup>2</sup> Aix-Marseille University, Institut  
de Neurosciences des Systèmes, Marseille, France

e-mail: ponomareva\_dn@mail.ru

Disorders of GABAergic and glycinergic synapses, that determine the inhibition in neuronal networks, leads to a series of pathologies, including epilepsy and hyperkplexia. The development of compounds that regulate the function of these synapses are important tasks for contemporary medicine and science. A promising direction is the creation of photochromic compounds that change the effectiveness of the action on receptors when the light wavelength changes. Previously, on cell lines with heterologous gene expression, it was shown that the photochromic compound Azo-NZ1, in the *trans*-configuration, blocks the channels of the glycine receptor (GlyR) formed by  $\alpha 2$  subunits, as well as GABAA and homomeric GABA receptors formed by  $\rho 2$  subunits. Switching the compound into *cis*-state by UV-illumination restores the activity.

In this study we analysed the action of Azo-NZ1 on glycine and GABA receptors at slices of the mice brain using the “whole-cell” configuration of the patch-clamp recordings.

GABAergic evoked inhibitory postsynaptic currents (eIPSCs) were recorded from the dentate gyrus neurons of 2-3 months old mice. After addition of 100  $\mu$ M Azo-NZ1, the amplitude of eIPSCs decreased to  $57.9 \pm 3.4\%$  ( $p < 0.05$ ;  $n = 6$ ). Illumination by UV light caused an elevation of the amplitude to  $73.9 \pm 6.4\%$  ( $p < 0.05$ ), while the illumination with blue light resulted in its decrease to  $52.2 \pm 4.9\%$  ( $p < 0.05$ ). During washing the amplitude recovered to  $83.6 \pm 18.2\%$ .

Glycinergic eIPSCs were recorded from hypoglossal motoneurons in brainstem slices obtained from 4-8 days of postnatal development. The mean amplitude of glycinergic eIPSCs of the incubation in 15  $\mu$ M Azo-NZ1 decreased to  $61.5 \pm 4.7\%$  compare with control condition ( $p < 0.05$ ;  $n = 8$ ). The amplitude of eIPSCs increased to  $80.5 \pm 4.2\%$  after UV illumination ( $p < 0.05$ ), and it decreased to  $56.1 \pm 4.6\%$  ( $p < 0.05$ ) with visible light. The amplitude recovered to  $86.8 \pm 4.9\%$  during washing ( $p < 0.05$ ). At high concentrations of Azo-NZ1 (300  $\mu$ M), UV did not modulate the amplitude of glycinergic eIPSCs. This is, presumably, due to the presence of a relatively high concentrations of photochrome in the *trans*-configuration due to an incomplete transition to the *cis*-form under UV illumination.

In conclusion, in this study demonstrate, that photochrome Azo-NZ1 is capable to perform light-controlled modulation of GABAergic and glycinergic synaptic transmission.

This study was supported by the Russian Science Foundation (grant number: 18-15-00313).

**ФОТОУПРАВЛЯЕМАЯ МОДУЛЯЦИЯ ТОРМОЗНЫХ  
ПОСТСИНАПТИЧЕСКИХ ТОКОВ В СРЕЗАХ МОЗГА**

Пономарева Д. Н.<sup>1</sup>, Петухова Е.О.<sup>1</sup>, Михайлова Н.В.<sup>1</sup>, Брежестовский П.Д.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Институт системных нейронаук, Университет Экс-Марсель, Марсель, Франция

e-mail: ponomareva\_dn@mail.ru

Нарушения ГАМК-ергических и глицинергических синапсов, которые регулируют торможение в нейрональных сетях, приводят к ряду патологий, включая эпилепсию и гиперэкфлексию. Разработка соединений, регулирующих работу этих синапсов, является важной научной и медицинской задачей. Перспективным направлением является создание фотоуправляемых соединений, изменяющих эффективность действия на рецепторы при изменении длины волны света. Ранее на линиях клеток с гетерологической экспрессией генов было показано, что фотохромное соединение Azo-NZ1 в *транс*-конфигурации блокирует каналы глицинового рецептора (ГлиР), образованных  $\alpha$ 2-субъединицами, а также ГАМКА- и гомомерные ГАМКС-рецепторы, сформированные  $\rho$ 2-субъединицами. В *цис*-конфигурации Azo-NZ1 теряет сродство к данным рецепторам.

В настоящей работе нами описано действие Azo-NZ1 на глициновые и ГАМК-рецепторы в синапсах мозга мыши. Регистрацию ионных токов осуществляли на срезах мозга методом пэтч-кламп в конфигурации "whole-cell".

ГАМК-ергические вызванные постсинаптические токи (вПСТ) регистрировали от нейронов зубчатой извилины гиппокампа мышей в возрасте 2-3 месяцев. Azo-NZ1 (100 мкМ) снижал амплитуду ГАМК-ергических вПСТ до  $57.9 \pm 3.4\%$  ( $p < 0.05$ ;  $n=6$ ). После облучения УФ происходило увеличение амплитуды до  $73.9 \pm 6.4\%$  ( $p < 0.05$ ), а синим светом – снижение до  $52.2 \pm 4.9\%$  ( $p < 0.05$ ). Во время отмывки амплитуда ГАМК-ергических вПСТ восстанавливалась до  $83.6 \pm 18.2\%$ .

Глицинергические токи регистрировали от мотонейронов ядра подъязычного нерва мышей в возрасте 4-8 дней после рождения. Средняя амплитуда глицинергических вПСТ под действием Azo-NZ1 (15 мкМ) снизилась до  $61.5 \pm 4.7\%$  по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ;  $n=8$ ). После освещения УФ амплитуда вПСТ увеличилась до  $80.5 \pm 4.2\%$  ( $p < 0.05$ ), а при последующем освещении видимым светом – снизилась до  $56.1 \pm 4.6\%$  ( $p < 0.05$ ). Во время отмывки амплитуда токов восстановилась до  $86.8 \pm 4.9\%$  ( $p < 0.05$ ). При высоких концентрациях Azo-NZ1 (300 мкМ) УФ не модулировал амплитуду глицинергических вПСТ. Возможно, это связано с наличием относительно высокой концентрации фотохрома в *транс*-конфигурации из-за неполного перехода в *цис*-форму при УФ освещении.

Таким образом, в данной работе показано, что Azo-NZ1 осуществляет светуправляемую модуляцию ГАМК-ергических и глицинергических синапсов.

Работа поддержана грантом РФФИ No 18-15-00313.

***THE MOUSE DORSAL CA1 HIPPOCAMPAL ADENOVIRAL VECTORS IN NEURONS OF THE MESENCEPHALIC TEGMENTUM OF JUVENILE CHUM SALMON ONCORHYNCHUS KETA***

Puschina E.V., Kapustyanov I.A., Shamshurina E.V., Varaksin A.A.  
A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch,  
Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

e-mail: puschina@mail.ru

Currently, the data on presence of adenoviral receptors in fish are very limited. We have used a ready-to-image mouse recombinant adenoviral vectors with the GCaMP6m calcium sensor, which are usually applied for the dorsal CA1 hippocampus of mice, but have not previously been used for the gene delivery in the fishes brain. The work objective was to assess the ability of the recombinant adenovirus (rAAV) labeling in the brain cells of juvenile chum salmon and the subsequent determination of the phenotype of rAAV-labeled cells with the help of confocal microscopy. The gene delivery in vivo was performed, using the injection of a ready-to-image FITS-associated viral vector directly into the mesencephalic tegmentum of the one-year-old juvenile *Oncorhynchus keta*. An assessment of the viral delivery level was made 1 week after the vector injection. Using fluorescent microscopy and confocal scanning microscopy, the expression of adenoviral vector in the tegmentum cells of a juvenile *O. keta* was evaluated, followed by IHC analysis of the neuron-specific HuCD protein in combination with DAPI staining. The results of immunofluorescence analysis have shown a colocalization of cells expressing the adenoviral vector with green fluorescence, and with a neuron-specific HuCD protein - with red fluorescence. The results obtained indicate that tegmentum cells of juvenile *O. keta* expressing an adenoviral vector are corresponding to a neuron-specific line of the *O. keta* brain cells, what witnesses the ability of a mammalian hippocampal adenoviruses to incorporate into the fishes CNS neurons. Thus, hippocampus-specific mammalian adenoviral vectors can integrate into fish brain neurons, followed by expression of viral proteins, and that the tegmentum neurons of a juvenile chum salmon contain a mammalian adenovirus receptor homolog.

This work was financially supported by the NSCMB FEB RAS (State contract No. 120k-19 from 11.14.2019).

***FIBER-OPTIC PHOTOMETRY OF RETROSPLENIAL CORTEX NEURONS  
ACTIVITY ON NOVEL PLACE AND NOVEL OBJECT RECOGNITION IN  
MICE***

Rogozhnikova O.S.<sup>1</sup>, Ivashkina O.I.<sup>1,2,3</sup>, Toropova K.A.<sup>1,2,3</sup>, Solotyonkov M.A.<sup>1</sup>,  
Fedotov I.V.<sup>1</sup>, Anokhin K.V.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <sup>2</sup> National Research Center  
“Kurchatov Institute”, Moscow, Russia, <sup>3</sup> P.K. Anokhin Institute of Normal  
Physiology, Moscow, Russia

e-mail: osrogozhnikova@gmail.com

Despite a considerable amount of work, the mechanisms space and objects coding are still not fully understood. The retrosplenial cortex (RSC) plays a key role in forming a connection between the perception of an object and the space in which it is located [1]. The RSC is specifically activated in tasks for object type recognition [2], but the disruption of RSC results in the impairment of the perception of objects-in-context, but not of the objects themselves.

In current work, RSC activity was analyzed by fiber-optic photometry registration of calcium sensor fluorescence [2, 3]. The sensor was expressed on RSC neuron membranes and its fluorescence is increased in case of intracellular calcium concentration increase when it's irradiated by laser light with 473 nm wavelength through an optrod fixed on an animal cranium.

We registered RSC neuron activity when mice were freely moving in an empty open field marked with the visual cues. After that, two different objects were presented in two different tasks: novel object recognition (NOR) and novel place recognition (NPR).

We used the time of contacts with the objects (sniffing, whisker touching or sitting alongside of the object) as a behavioral measure for such memory.

We demonstrated an increase of calcium events in RSC when animals explored the arena with the objects of new type or on new places. At the same time the amplitude value of the peaks was invaried. There were no RSC activity changes depending on the exact object: familiar, new or replaced object.

In our research, it was for the first time demonstrated a specific overall calcium activity changes of RSC neurons when mice were observing neutral objects. However, for understanding of RSC neurons functional role further research is needed.

*References*

- [1] Минеева О.А., Безряднов Д.В., Чехов С.А., Сварник О.Е., Анохин К.В. Интегративные функции ретроспленальной коры: данные анатомии, коннектомики и клеточной электрофизиологии у крыс. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2019; 13(1): 47–54.
- [2] Желтиков А. М. Нелинейная оптика микроструктурированных волокон. *Успехи физических наук*. 2004. Т. 174. № 1. С. 73-105.
- [3] Luo Y. J., Li Y. D., Wang L., Yang S. R., Yuan X.S., Wang J., Huang Z.L. Nucleus accumbens controls wakefulness by a subpopulation of neurons expressing dopamine D1 receptors. *Nature communications*. 2018. Т. 9. № 1. P. 1576.



**ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ РЕТРОСПЛЕНИЯЛЬНОЙ КОРЫ МЕТОДОМ ОПТОВОЛОКОННОЙ ФОТОМЕТРИИ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ НОВОГО ПРОСТРАНСТВА И ОБЪЕКТОВ У МЫШЕЙ**

Рогожникова О. С.<sup>1</sup>, Ивашкина О.И.<sup>1,2,3</sup>, Торопова К.А.<sup>1,2,3</sup>, Солотёнков М.А.<sup>1</sup>, Федотов И.В.<sup>1</sup>, Анохин К.В.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, <sup>2</sup> Национальный исследовательский центр "Курчатовский Институт", Москва, Россия, <sup>3</sup> Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия

e-mail: osrogozhnikova@gmail.com

В нейрофизиологии до сих пор остается не изученным механизм кодирования информации о пространстве и находящихся в нем объектах. Известно, что ретроспленциальная область коры (РСК) играет ключевую роль в формировании связи между восприятием объекта и пространством, в котором он находится [1].

В данной работе мы регистрировали изменения активности РСК методом оптоволоконной фотометрии флуоресцентной активности кальциевого сенсора GCaMP6s [2, 3]. Экспрессированный на мембране нейронов РСК кальциевый сенсор флуоресцирует в случае изменения концентрации внутриклеточного кальция в участке коры, облучаемом лазерным излучением с длиной волны в 473 нм через размещённый на голове животного оптод.

Регистрация активности клеток РСК мы проводили при свободном обследовании мышами пустой арены с нанесёнными зрительными ориентирами. В этой же арене мышам предлагали два типа объектов в двух типах задач: распознавание на арене нового объекта и распознавание изменения положения уже знакомого объекта. Критерием изменения поведения мыши являлась длительность контакта с объектом (нюхает; касается вибриссами; сидит рядом).

Нами было обнаружено увеличение количества кальциевых событий в РСК при обследовании пространства с объектами нового типа или в новом месте с неизменной величиной средней амплитуды регистрируемого пика. Не было показано изменения активности РСК в зависимости от того, какой именно объект животное обследовало: знакомый объект, объект нового типа или перемещённый в рамках арены объект.

В работе впервые было показано специфическое изменение суммарной активности нейронов РСК при обследовании животными нейтральных объектов. Однако для понимания функциональной роли нейронов РСК в кодировании пространства и объектов необходимы дальнейшие исследования.

*Литература*

[1] Минеева О.А., Безряднов Д.В., Чехов С.А., Сварник О.Е., Анохин К.В. Интегративные функции ретроспленциальной коры: данные анатомии, коннектомики и клеточной электрофизиологии у крыс. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2019; 13(1): 47–54.

[2] Желтиков А. М. Нелинейная оптика микроструктурированных волокон. *Успехи физических наук*. 2004. Т. 174. № 1. С. 73-105.

[3] Luo Y.J., Li Y.D., Wang L., Yang S.R., Yuan X.S., Wang J., Huang Z. L. Nucleus accumbens controls wakefulness by a subpopulation of neurons expressing dopamine D1 receptors. *Nature communications*. 2018. Т. 9. № 1. P. 1576.

**POLYMER NANOCAPSULES AS AN INSTRUMENT FOR TARGETED  
DELIVERY INTO RETINAL CELLS**

Rotov A.Yu.<sup>1</sup>, Sitnikova V.S.<sup>1</sup>, Tarakanchikova Y.V.<sup>2</sup>, Muslimov A.R.<sup>2</sup>, Firsov M.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia, <sup>2</sup> Saint-Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

e-mail: rotovau@gmail.com

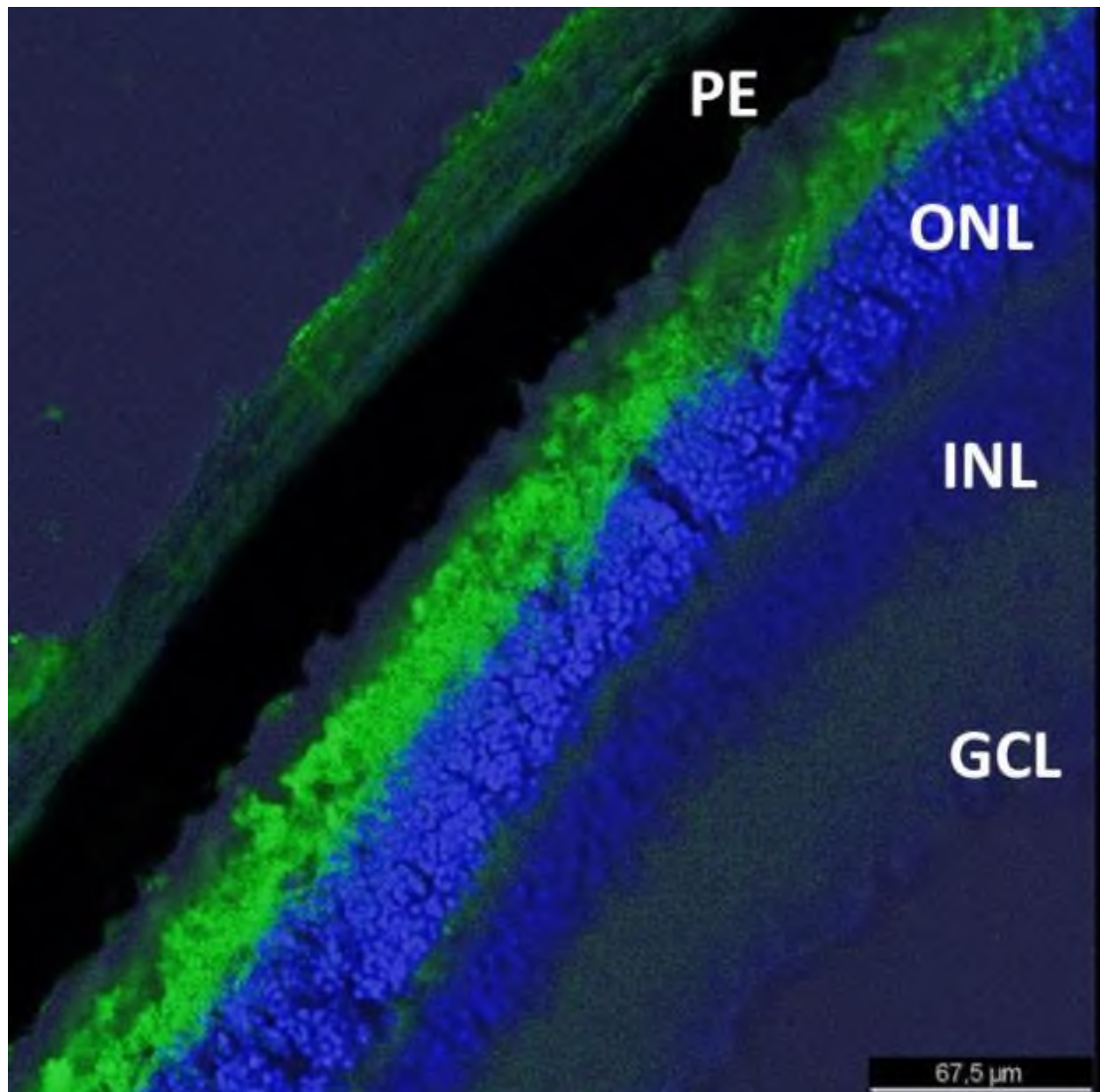
**Introduction:** Therapy for photoreceptor degeneration caused by retinal diseases such as retinitis pigmentosa can use the exogenous light-controlled elements: molecular photoswitches (optopharmacology) and bacterial or animal opsins (optogenetics). These approaches are both based on the principle of transformation of retinal cells which were not affected by pathological processes into light-sensitive “pseudo-photoreceptors”. The inner retinal barriers such as inner limiting membrane can block most of the administered photoswitch molecules or viral vector particles and highly reduce the efficacy of the therapy. A possible solution for this problem could be binding of photoswitches or opsin-encoding DNA to polymer nanocapsules, which can penetrate intracellular space.

**Methods:** 50 nm-diameter nanocapsules consisted of polyarginine and dextran sulphate multilayers were used. We performed intravitreal injections of solution which contained nanocapsules loaded with rhodamine or GFP-encoding mRNA to C57Bl mice. 12 h after injections the eyecup cryosections were prepared and stained with DAPI + Phalloidin-Alexa488 or only DAPI for confocal microscopy. Control of capsules administration effect on visual function was performed using *in vivo* electroretinography from anesthetized mice.

**Results:** Nanocapsules showed successful passing through the entire thickness of all retinal layers. Rhodamine was co-localized with outer segments of photoreceptors and apical side of pigment epithelial cells. The observed expression of GFP in photoreceptor cells (see Fig.1) also confirmed the capsules ability to penetrate intracellular space. Preliminary electroretinogram recordings from mice showed no effect of both the injection procedure itself and the capsules on the visual response.

**Conclusions:** We have shown the high-efficacy delivery of polymer nanocapsules to the photoreceptor layer of the retina after their intravitreal injection. However, their ability to deliver photoswitch molecules and DNA to the photoreceptory and other retinal layers has not yet been confirmed. Also there might be a necessity for modification of the capsules surface to make them more cell type-specific among retinal cells.

The study was carried out using the equipment of the CCU of the IEPHB RAS.  
RFBR grant number 19-34-90182.



**Fig.1.** Localization of GFP expression after injection of mRNA-loaded nanocapsules. Green GFP, Blue DAPI nuclear staining, Black melanin from pigment epithelial cells. PE pigment epithelium, ONL outer nuclear layer (contains photoreceptor cell bodies), INL inner nuclear layer, GCL ganglion cell layer.

**Рис.1.** Локализация экспрессии GFP после введения мРНК-нагруженных нанокапсул. Зеленый - GFP, синий - окраска ядер DAPI, черный - меланин из пигментных эпителиальных клеток. PE - пигментный эпителий, ONL - внешний ядерный слой (содержит тела фоторецепторных клеток), INL - внутренний ядерный слой, GCL - слой ганглиозных клеток.

**ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОКАПСУЛЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ В КЛЕТКИ СЕТЧАТКИ**

Ротов А. Ю.<sup>1</sup>, Ситникова В.С.<sup>1</sup>, Тараканчикова Я.В.<sup>2</sup>, Муслимов А.Р.<sup>2</sup>,  
Фирсов М.Л.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия, <sup>2</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: rotovau@gmail.com

**Введение:** В терапии дегенерации фоторецепторов, вызванной такими заболеваниями сетчатки, как пигментный ретинит, могут использоваться экзогенные светоуправляемые элементы: молекулярные фотопереклюватели (оптофармакология) и бактериальные или животные опсины (оптогенетика). В основе обоих подходов лежит принцип преобразования клеток сетчатки, которые не были затронуты патологическими процессами, в светочувствительные «псевдо-фоторецепторы». Внутренние барьеры сетчатки, такие как внутренняя пограничная мембрана, могут блокировать большую часть вводимых молекул фотопереклювателя или частиц вирусного вектора и значительно снижать эффективность терапии. Возможным решением этой проблемы может быть связывание фотопереклювателей или опсин-кодирующей ДНК с полимерными нанокapsулами, которые способны проникать во внутриклеточное пространство.

**Методы:** Использовались нанокapsулы диаметром 50 нм, состоящие из слоев полиаргинина и декстрансульфата. Мышам C57Bl были проведены интравитреальные инъекции раствора, который содержал нанокapsулы, загруженные родамином или мРНК, кодирующей GFP. Через 12 ч после инъекций изготавливались криосрезы глазных бокалов и окрашивались DAPI + Фаллоидин-Alexa488 или только DAPI для конфокальной микроскопии. Контроль влияния инъекций капсул на зрительную функцию осуществлялся с помощью электроретинографии *in vivo* от анестезированных мышей.

**Результаты:** Нанокapsулы продемонстрировали успешное прохождение сквозь все слои сетчатки. Родамин был локализован с наружными сегментами фоторецепторов и апикальной стороной клеток пигментного эпителия. Наблюдаемая экспрессия GFP в фоторецепторных клетках (см. Рис.1) также подтвердила способность капсул проникать во внутриклеточное пространство. Ретинографический контроль не показал какого-либо влияния, как самой процедуры инъекции, так и капсул на зрительный ответ.

**Выводы:** Нами показана высокая эффективность доставки полимерных нанокapsул в фоторецепторный слой сетчатки при их инъекции в стекловидное тело. Тем не менее, их способность доставлять молекулы фотопереклювателей и ДНК в фоторецепторный и другие слои сетчатки, еще не подтверждена. Также может возникнуть необходимость в модификации поверхности капсул, чтобы сделать их более специфичными для конкретных типов клеток сетчатки.

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН.  
Грант РФФИ № 19-34-90182

**OPTOGENETIC TOOLS FOR EXPERIMENTS WITH BEHAVING ANIMALS**

Rysakova M.P.<sup>1</sup>, Kuleshova E.P.<sup>2</sup>, Sidorina V.V.<sup>1</sup>, Borodinova A.A.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, VA, USA

e-mail: rymarik@gmail.com

The mammalian brain consists of many distinct types of excitatory, inhibitory, and modulatory cells. One of the central challenges of neuroscience has long been to decipher the role of distinct cell types in the organization and function of brain circuits and behavior. In 2005 new method “Optogenetics”, combining progress in genetic and optical techniques has offered new opportunities for neuroscientists. With the use of light-activated proteins called opsins, optogenetics allows controlling a subset of neurons. The advantages of optogenetics over traditional electrical or chemical manipulations are cell-specific targeting and excellent temporal resolution (within millisecond). At this time optogenetics has found many applications in different fields of neuroscience. Moreover, a large array of optogenetic technologies, which enable fast and precise control over neurons within behaving mammals, have greatly progressed as well. Yet the application of new optogenetic tools in the rat system has been slower than in the mouse system due in part to technical challenges. However, a number of important behavioral tasks have been validated and optimized especially well in rat models. To effectively utilize optogenetic techniques in behaving rodents, investigators must consider opsin selection, opsin targeting to the cell population of interest and integration of optogenetic control with readouts (behavioral, electrophysiological et al.) in the context of the constraints and opportunities of the rat model.

The studies in our lab are focused on understanding neural circuit mediating anxiety. However, heterogeneity of brain regions suggested playing a role in these behaviors and the complexity of connections between them makes it difficult. But optogenetic tools have provided new opportunities to investigate neural substrates of anxiety.

In the current work, we have developed an optical interface that allows bilateral optical access to any brain structure in freely moving rats. We tested this optical interface on rats expressing Channelrhodopsin-2 (ChR2) in glutamatergic neurons in the basolateral amygdala (BLA). The behavior of rats was assessed using elevated plus-maze and open field test. It was revealed that optogenetic stimulation of BLA increased anxiety-related behavior. These results suggest that developed optical interface can be successfully applied for chronic investigation of neural circuits mediating complex behaviors in freely moving rats.

RFBR Grant 19-015-00129A

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИНСТРУМЕНТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА СВОБОДНО ПОДВИЖНЫХ ЖИВОТНЫХ**Рысакова М.П.<sup>1</sup>, Кулешова Е.П.<sup>2</sup>, Сидорина В.В.<sup>1</sup>, Бородинова А.А.<sup>1</sup><sup>1</sup> ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия,<sup>2</sup> Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, VA, USA

e-mail: rymarik@gmail.com

Мозг млекопитающих состоит из большого числа различных типов возбуждающих, тормозных и модуляторных клеток. Основной проблемой, которую пытается решить нейробиология является выяснение роли различных типов клеток в организации и функциях нейронных сетей мозга и поведения. Появление в 2005 году принципиально нового метода «оптогенетика», сочетающего в себе достижения генной инженерии и оптики, открыло новые возможности для нейробиологов. Данный метод позволил управлять работой нервных клеток путем внедрения в мембрану специальных белков — опсинов, реагирующих на возбуждение светом. Основными преимуществами оптогенетического метода по сравнению с традиционными электрическими и химическими манипуляциями являются высокая селективность воздействия на определенные типы клеток и его высокое временное разрешение (порядка миллисекунд). К настоящему времени оптогенетика нашла широкое применение в различных областях нейробиологии. Активно развиваются и технологии, позволяющие контролировать специфические нейронные популяции у животных в свободном поведении. Однако стоит отметить, что внедрение новых оптогенетических инструментов в экспериментах на крысах происходит гораздо медленнее, чем на мышах отчасти в силу технических трудностей. Вместе с тем целый ряд поведенческих задач и тестов верифицирован и оптимизирован для крыс. Чтобы эффективно использовать возможности оптогенетики в экспериментах на грызунах экспериментатор должен продумать каждый этап такого эксперимента начиная с выбора опсина, способа доставки генов-опсинов в клетки мишени, способа доставки света в ткани и заканчивая способами интеграции оптостимуляции с электрофизиологическими, поведенческими методами и др. с учетом возможных ограничений и преимуществ в работе с крысами.

Часть исследований в нашей лаборатории в течение длительного времени посвящена изучению механизмов, лежащих в основе тревожности. Однако многообразие структур мозга участвующих в ее регуляции, и сложность связей между ними значительно усложняют эту задачу. Благодаря появлению оптогенетики открылись новые возможности для изучения нейронных субстратов сложных форм поведения, в том числе, регулирующих тревожность.

В данной работе нами была собрана установка для билатеральной оптогенетической стимуляции различных структур мозга крыс, находящихся в свободном поведении. Данная установка была протестирована на крысах экспрессирующих каналородопсин в глутаматергических клетках базолатеральной миндалины. Поведение животных тестировали в приподнятом крестообразном лабиринте и открытом поле. Было показано, что оптогенетическая активация пирамидных нейронов миндалины оказывает анксиогенный эффект. Эти результаты подтвердили возможность успешного использования данной системы для хронических экспериментов по изучению нейронных субстратов различных форм поведения у свободно подвижных крыс.

Грант РФФИ № 19-015-00129А.

***TWO GENERATIONS OF AZOBENZENE-BASED POTASSIUM CHANNEL BLOCKERS: DIFFERENT MECHANISMS OF PHOTOACTIVATION AND THERMAL DEACTIVATION.***

Ryazantsev M.N.<sup>1</sup>, Panov M.S.<sup>2</sup>, Shtyrov A.A.<sup>1</sup>, Nikolaev D.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Saint-Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia, <sup>2</sup> Saint-Petersburg State University, Institute of Chemistry, St. Petersburg, Russia

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

Azobenzene-based potassium channel blockers are commonly used in photopharmacology. All applied azobenzenes are divided into two generations, which differ significantly in solubility, rate of thermal isomerization, spectral properties, and in the rate of physiological response during the activation and deactivation of neurons. To investigate the factors that define the observed differences we considered two azobenzenes -- AAQ from the first generation and DENAQ from the second generation. The photoactivation and thermal isomerization mechanisms of AAQ and DENAQ were investigated with UV-Vis spectroscopy (including time-resolved spectroscopy), Raman spectroscopy, electrochemical methods, and the methods of computational chemistry. We showed that the key factor that defines the difference in the properties important for photopharmacological applications between two generations of azobenzenes is the protonation state of the compounds. While azobenzenes from the first generation (AAQ) remain unprotonated at physiological pH levels, the compounds from the second generation (DENAQ) undergo a protonation on the nitrogen atoms forming the reactive N=N bond. Therefore, the protonation state of azobenzenes should be taken into account as an important factor during the design of new azobenzene-based photopharmacological tools.

The work was funded by Ministry of Education and Science of Russian Federation.

***OPTOGENETIC APPROACHES TO CONTROL ASTROGLIAL ACTIVITY IN  
BRAIN NEUROVASCULAR UNIT***

Salmina A.B., Morgun A.V., Shuvaev A.N., Osipova E.D., Boytsova E.B.,  
Pozhilenkova E.A., Yakimov A.S., Komleva Yu.K.  
Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F.Voino-Yasenetsky,  
Krasnoyarsk, Russia

e-mail: allasalmina@mail.ru

**Introduction.** Brain microvessel endothelial cells (BMECs) are the part of the neurovascular unit (NVU) being in a close functional connection with astrocytes, neurons and pericytes. Perivascular astrocytes play a key role in the regulation of microcirculation and integrity of the blood-brain barrier (BBB). It is of great importance for controlling physiological mechanisms associated with BBB-provided vascular support within the neurogenic niches and establishment of microenvironment optimal for neural stem cells (NSCs) and neural progenitor cells (NPCs) development. Target activation of astroglial cells might be very helpful for manipulating with adult neurogenesis.

**Methods.** Optogenetic stimulation of GFAP-mKate-ChR2-expressing astrocytes (vector was kindly provided by Professor S. Kasparov, Bristol University, UK) has been tested in the models of neurogenic niche and BBB in vitro.

**Results.** In the in vitro models of hippocampal subgranular zone (SGZ) neurogenic niche, we found that astrocytes support neuronal differentiation of stem cells. Optogenetic stimulation of astrocytes results in prominent activation of neurogenesis, suppression of cell differentiation toward astroglial phenotype, and provide high local lactate concentrations in the niche. It is interesting that after exposure of NSCs/NPCs to cytotoxic concentrations of beta-amyloid 1-42, compromised neurogenic activity of cells within the neurogenic niche was partially restored by optogenetic stimulation of astroglia. In the in vitro models of BBB, optogenetic activation of astrocytes leads to significant reduction of BMECs K<sup>+</sup> inward and outward currents, transient decrease of paracellular permeability of endothelial monolayer, presumably reflecting astroglia-driven mechanisms of vasoconstriction which are associated with excessive K<sup>+</sup> buffering by astrocytes and changes in BBB integrity.

**Conclusion.** Optogenetics is a promising tool for controlling astroglia-mediated mechanisms of NVU intercellular communications and neuroplasticity.

The work is supported by the State Assignment for Research, Ministry of Public Health, 2018-2020.



**NEUROOPTIC RESPONSES ADAPTATION OF THE RAT OLFACTORY BULB GLOMERULI IN DEPENDENCE ON THE TEMPORARY PARAMETERS OF OLFACTORY STIMULATION**

Semykina V.G., Chechevatova V.V., Kiroy V.N., Matukhno A.E.  
 Research Technological Center of Neurotechnology, Southern Federal University,  
 Rostov-on-Don, Russia

e-mail: lera.semykina@gmail.com

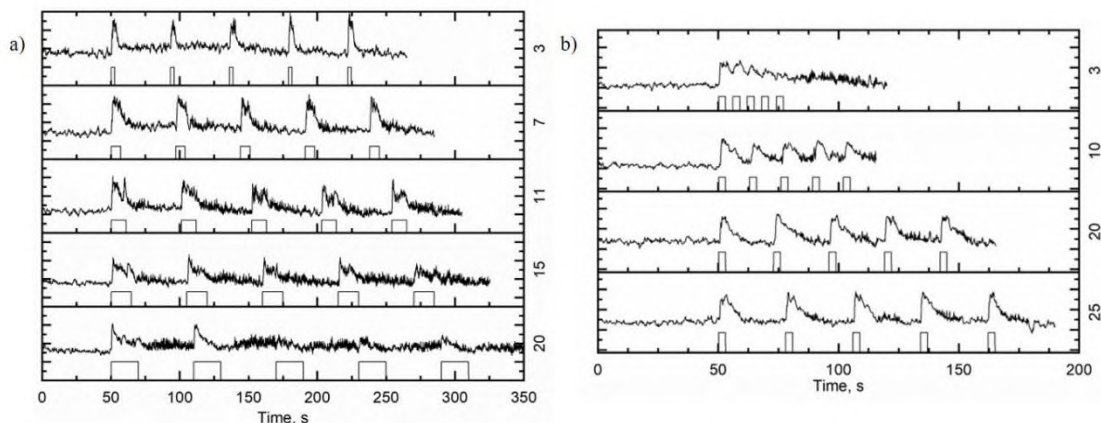
Analysis of spatiotemporal patterns of glomerular activity in the rat olfactory bulb (OB) in response to various odors allows us to understand the principles of olfactory coding and create a biohybrid system with sensitivity comparable to that of macrosmatic animals.

In that case, it is important to determine the optimal stimulation time parameters. Thus the aim of our study was to analyze the dynamics of the glomerular responses to exposure of methyl benzoate (the saturated vapor) with varying duration of the stimulus and interstimulus interval. Fluorescence of calcium-sensitive indicator Cal-590 AM was detected by laser scanning microscope (Zeiss LSM 880), then odorant-evoked signals were processed to stabilize images and create a map of glomerular activity. Temporal profile of the fluorescence was analyzed at the region of interest, drawn around glomerulus. Two stimulation protocols have been used in the present study: stimulation (n=5) of different durations (from 1 to 20 s) with a constant interstimulus interval (40 s) and 3-s stimulation (n=5) with various interstimulus interval from 3 s to 50 s.

It is shown that the amplitude of the response to the first stimulus in each series is usually greater than to the following ones. Consistent increase in duration of stimulus lead to adaptation expressed in decrease of the response amplitudes to consecutive stimuli and to the increase of response duration (fig. 1a). When the stimulus duration reached 20 s, the background level of fluorescence was not restored.

Adaptation has become less noticeable with lengthening of interstimulus interval. The adaptation has not been observed with 20 s interstimulus interval, which is the evidence of the optimal parameters of stimulation (fig. 1b).

Foundation for Advanced Research of the Russian Federation (No. 6/112/2017-2020)



**Fig. 1.** Dynamics of glomerular odor responses as a function of stimulus duration (a) and interstimulus interval (b). Labels to the right of each stack indicate the stimulus duration, s (a), and interstimulus interval, s (b).

**Рис. 1.** Динамика отклика целевой гломерулы при изменении длительности стимула (а) и межстимульного интервала (б). По оси ординат: F – величина флуоресценции, отн.ед.; справа от каждого графика: (а) длительность стимула, с, (б) длительность межстимульного интервала, с.

### **ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ АДАПТАЦИИ НЕЙРООПТИЧЕСКИХ ОТКЛИКОВ ГЛОМЕРУЛ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ЛУКОВИЦЫ КРЫС ОТ ВРЕМЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ**

Семьнина В. Г., Чечеватова В.В., Киров В.Н., Матухно А.Е.

Научно-исследовательский технологический центр нейротехнологий Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

e-mail: lera.semynina@gmail.com

Анализ пространственно-временных паттернов активности гломерул обонятельной луковицы (ОЛ) при предъявлении одорантов позволяет понять принципы обонятельного кодирования и создать биогбридную систему, по чувствительности сопоставимую с обонянием животных-макросматиков.

Принципиальным при этом является определение оптимальных временных параметров стимуляции. В связи с этим, целью работы было исследование динамики отклика гломерул ОЛ крысы на предъявление метилбензоата (н.п.) при варьировании длительности стимула и межстимульного интервала. Изменения флуоресценции кальций-чувствительного индикатора Cal-590 AM регистрировали в мультифотонном режиме (Zeiss LSM 880), затем временные серии подвергали обработке для стабилизации изображений и формирования карты активности гломерул. Контур гломерулы использовали в качестве области интереса для получения временного профиля флуоресценции. Применяли два протокола стимуляции: предъявление стимулов (n=5) различной длительности (от 1 до 20 с) при неизменном межстимульном интервале (40 с) и предъявление стимулов (n=5) длительности 3 с при вариации межстимульного интервала от 3 с до 50 с.

Показано, что амплитуда реакции на первое предъявление стимула, как правило, больше, чем на последующие. При последовательном увеличении длительности стимула возникает эффект адаптации, отражающийся в снижении амплитуды реакции на последующие стимулы и удлинении реакции (рис. 1а). При подаче стимула длительностью 20 с базовый уровень флуоресценции не восстанавливался.

При удлинении межстимульного интервала проявление адаптации становится менее выраженным, а при 20 с интервале адаптации не наблюдается, что свидетельствует об оптимальных параметрах стимуляции (рис. 1б).

Фонд перспективных исследований РФ (договор от 01.11.2017 №6/112/2017-2020)

**PAIRED OPTOGENETIC STIMULATION OF NEURONS IN THE MOUSE  
VISUAL CORTEX CAN CHANGE ORIENTATION SELECTIVITY OF  
STIMULATED CELLS**

Smirnov I.V., Malyshev A.Yu.

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

e-mail: ivan.vas.smirnov@gmail.com

According to one of the central paradigms of modern neurobiology, synaptic plasticity represents the cellular mechanism of learning and memory. However, most studies of cellular and molecular mechanisms of synaptic plasticity are performed on simplified *in vitro* models, which does not provide a complete picture of the role of these mechanisms in the functioning of the brain. In this study, we took the first steps to investigate the role of cellular mechanisms of synaptic plasticity in the functioning of neocortex networks in the whole brain *in vivo*.

We used the primary visual cortex of mice as a model object for the study of synaptic plasticity *in vivo*. To assess the state of the synaptic inputs of the studied cell, we used visual stimulation, presenting the moving vertical and horizontal stripes to the animal. A characteristic feature of neurons of the visual cortex is the presence of orientation selectivity, which is expressed in the fact that the greatest response in the cell arises on moving bands oriented at a certain angle.

In this study, we paired non-optimally oriented visual stimuli with optogenetic stimulation of individual neurons of the layer V of the primary visual cortex in transgenic mice expressing ChR2 under the Thy promoter. Neurons were recorded using a glass micropipette using the method of juxtacellular registration in animals under urethane anesthesia. Optogenetic stimulation of the recorded neuron was performed via optical fiber placed in the recording microelectrode and connected to the blue LED. In total, from 100 to 200 paired stimulations were performed for each cell at the time of passage of the visual stimulus along the receptive field of the recorded neuron. Paired stimulation caused a change in the optimal orientation of the studied neurons, which was expressed in an increase in the response to the reinforced orientation and lasted at least one hour after pairing. In addition, we found a significant decrease in the response to an unpaired orientation, which may be due to mechanisms of heterosynaptic plasticity.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant No. 18-015-00397.

**СОЧЕТАННАЯ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ НЕЙРОНОВ  
ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЫ МЫШИ МОЖЕТ ПРИВОДИТЬ К ИЗМЕНЕНИЮ  
ОРИЕНТАЦИОННОЙ СЕЛЕКТИВНОСТИ СТИМУЛИРУЕМЫХ КЛЕТОК**

Смирнов И.В., Малышев А.Ю.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва,  
Россия

e-mail: ivan.vas.smirnov@gmail.com

Согласно одной из центральных парадигм современной нейробиологии клеточным механизмом обучения и памяти является синаптическая пластичность. Однако большая часть исследований клеточных и молекулярных механизмов синаптической пластичности выполняется на упрощенных моделях *in vitro*, что не дает полного представления о роли этих механизмов в работе мозга. В данной работе мы предприняли первые шаги по изучению роли клеточных механизмов синаптической пластичности в функционировании сетей неокортекса в целом мозге *in vivo*.

В качестве модельного объекта для исследования синаптической пластичности *in vivo* нами была выбрана первичная зрительная кора мышей. Для оценки состояния синаптических входов исследуемой клетки мы использовали зрительную стимуляцию, предъявляя животному движущиеся вертикальные и горизонтальные полосы. Характерной особенностью нейронов зрительной коры является наличие ориентационной селективности, выражающейся в том, что наибольший ответ в клетке возникает на движущиеся полосы, ориентированные под определенным углом.

В ходе данного исследования мы производили сочетание неоптимально ориентированных зрительных стимулов с оптогенетической стимуляцией отдельных нейронов 5-го слоя первичной зрительной коры у трансгенных мышей, экспрессирующих ChR2 под Thy промотором. Регистрация нейронов производилась стеклянной микропипеткой методом юкстраклеточной регистрации на животных под уретановой анестезией. В регистрирующем микроэлектроде располагалось оптоволокно, через которое производилась оптогенетическая стимуляция регистрируемого нейрона с помощью синего светодиода. При сочетанной стимуляции в момент прохождения зрительного стимула по рецептивному полю регистрируемого нейрона производилась его оптогенетическая стимуляция; всего на каждой клетке производилось от 100 до 200 таких сочетаний. Сочетанная стимуляция вызывала изменение оптимальной ориентации у исследуемых нейронов, которое выражалось в увеличении ответа на подкрепляемую ориентацию и длилось не менее одного часа после сочетания. Кроме того, нами было обнаружено значительное уменьшение ответа на несочетанную ориентацию, что может быть обусловлено механизмами гетеросинаптической пластичности.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 18-015-00397.

**LOW-FREQUENCY LIGHT STIMULATION OF PRINCIPAL CELLS PREVENTS THE GENERATION OF ICTAL DISCHARGE IN SLICES OF THE ENTORHINAL CORTEX OF THY1-CHR2-YFP MICE IN THE 4-AMINOPYRIDINE MODEL**

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

<sup>1</sup> Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia, <sup>2</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg, Russia  
e-mail: elena.smirnova@mail.ioffe.ru

**Introduction.** Low-frequency stimulation is a promising method for the treatment of pharmacoresistant epilepsy. Experiments in animal models have shown the efficacy of low-frequency electrical stimulation, which prevents the generation of ictal discharges [1, 2]. However, electrical stimulation has side effects [3]. The way to minimize side effects is to stimulate a specific group of cells with the optogenetic approach. We aimed to study the effect of low-frequency photostimulation on ictal activity in slices of the entorhinal cortex of Thy1-ChR2-YFP mice.

**Methods.** In Thy1-ChR2-YFP mice, channelrhodopsin expressed under promoter Thy1, mostly in principal neurons [4]. We made 350- $\mu$ m-width horizontal slices of the entorhinal cortex of adult Thy1-ChR2-YFP mice as described previously [5], CA3 zone was cut. Epileptiform activity was induced using 4-aminopyridine (0.1 mM) solution at 30°C with the following composition (in mM): 125 NaCl, 3.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25 MgSO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 10 D-glucose. The focal ictal activity was induced by the paired application of 1 mM NMDA via 1.5 M $\Omega$  glass electrode. 100-ms-long pulses of 470 nm light with 0.2 Hz frequency were used for the stimulation of the entorhinal cortex. Epileptic activity in deep layers of the entorhinal cortex was monitored by intracellular recording with whole-cell patch-clamp in voltage- or current-clamp.

**Results.** In the entorhinal cortex, ictal discharges are periodically generated in 4-aminopyridine solution. Photostimulation with 0.2 Hz-frequency in the entorhinal cortex induced interictal discharges that prevented the generation of ictal discharges in slices. We also found that low-frequency photostimulation prevented the generation NMDA-induced focal ictal discharges.

**Conclusion and discussion.** The observed effect of specific stimulation of principal cells expressing channelrhodopsin under Thy1 promoter is stronger than the reported effect of photostimulation of neurons expressing channelrhodopsin under promoter VGLUT2, which shorten the duration of ictal activity [6] or CamkIIa which increased the interval between ictal discharges [7]. Low-frequency photostimulation in slices of Thy1-ChR2-YFP mice prevents the generation of ictal discharges.

*References*

- [1] Toprani S, Durand DM. Long-lasting hyperpolarization underlies seizure reduction by low frequency deep brain electrical stimulation. *J Physiol.* 2013 Nov 15;591(22):5765-90.
- [2] Barbarosie M, Avoli M. CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures. *J Neurosci.* 1997 Dec 1;17(23):9308-14.
- [3] Fisher RS, Velasco AL. Electrical brain stimulation for epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2014 May;10(5):261-70.
- [4] Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, et al. In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron.* 2007;54(2):205–218.
- [5] Smirnova EY, Amakhin DV, Malkin SL, Chizhov AV, Zaitsev AV. Acute changes in electrophysiological properties of cortical regular-spiking cells following seizures in a rat lithium-pilocarpine model. *Neuroscience.* 2018. 379:202-215.
- [6] Yekhhlef L, Breschi GL, Taverna S. Optogenetic activation of VGLUT2-expressing excitatory neurons blocks epileptic seizure-like activity in the mouse entorhinal cortex. *Scient. Reports.* 7:43 230. 2017.
- [7] Shiri Z, Lévesque M, Etter G, Manseau F, Williams S, Avoli M. Optogenetic Low-frequency stimulation of specific neuronal populations abates ictogenesis. *J. Neurosci.* 37(11): 2999—3008. 2017.

The study was funded by № RFBR 19-315-60016.

**OPTOGENETIC APPROACH TO THE STUDY OF MOLECULAR MECHANISMS OF NEUROPLASTICITY**

Sorokina L.E.<sup>1,2</sup>, Petrenko V.I.<sup>3</sup>, Halilov S.E., Petrosyan T.R.<sup>2</sup>, Oleynik V.E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia, <sup>2</sup> V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia, <sup>3</sup> Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia  
e-mail: leya.sorokina@mail.ru

**Introduction.** The works which are devoted to the study of the mechanisms of formation and implementation of brain plasticity have aroused a special interest in the field of neurobiology in recent years. To date, such an innovative concept as optogenetics has provided a significant progress in the study of the features of brain functioning. It is believed these are optogenetic technologies which can become the key to understanding of the molecular mechanisms of neuroplasticity and to solving the problem of treating socially significant neurodegenerative diseases of mankind. Objective. The study of the molecular mechanisms of neuroplasticity formation and implementation when using optogenetic technologies in an experiment.

**Materials and methods.** The surveys were conducted on twenty (20) B6.Cg-Tg (Thy1-COP4/EYFP) 18gfng/J transgenic mice, which were divided into 2 groups: the main group (MG) ( $n=10$ ), which contained experimental animals undergoing an optogenetic stimulation, and the control group (CG) ( $n=10$ ), which contained intact animals. The stereotactic insertion technologies (Drill Robot apparatus, Germany) were used in order to perform the operation of implanting a fiber-optic neurointerface in the dorsal hippocampus of an experimental animal. The optogenetic photostimulation of the mice in the MG was performed in the pulse mode daily, for 8 weeks.

In order to assess the neurochemical aspects of neuroplasticity, an immunoassay of the mice's plasma samples was performed, with further assessment of the level of the glial factor of the nerve tissue growth (GDNF), of the alpha growth factor (TGF- $\alpha$ ), and of the glutamate transporters (EAAT). The light and electron microscopy methods were used to study the morphological features of the brain after the optostimulation. The statistical analysis of the obtained data was performed in the program Statistica 10.0.

**Results of the study.** When performing the immunoassay of blood plasma samples of the mice in the MG, which underwent the optical stimulation, there was a statistically significant increase in the concentration of GDNF ( $p=0.004$ ) and EAAT ( $p=0.03$ ) in comparison with the indices in the CG. As for TGF- $\alpha$ , the MG had a tendency to increase the concentration of this growth factor, but the obtained indices did not show statistically significant differences.

The morphological examination of brain sections in the MG revealed an increase in the thickness of the cortical layer of the brain hemispheres compared to the group of intact animals ( $p<0.00001$ ).

**Conclusions.** After the optostimulation, the group of experimental animals had a statistically significant increase in the concentration of GDNF and EAAT, as well as an increase in the thickness of the parietotemporal cortex, in comparison with the intact animals, which indicates the activation of brain plasticity and synapse formation.

University grant AAAA-A18-118112690034-0

**ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД В ИЗУЧЕНИИ ВОПРОСОВ  
МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ**

Сорокина Л. Е.<sup>1,2</sup>, Петренко В.И.<sup>3</sup>, Халилов С.Э.<sup>2</sup>, Петросян Т.Р.<sup>2</sup>, Олейник В.Е.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, Симферополь, Россия, <sup>2</sup> «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь, Россия, <sup>3</sup> «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: leya.sorokina@mail.ru

**Введение.** Последние годы особый интерес в области нейробиологии вызывают работы, посвященные вопросу изучения механизмов формирования и реализации пластичности мозга. На сегодняшний день значительный прогресс в исследовании особенностей функционирования мозга привнесло такое инновационное направление как оптогенетика. Принято считать, что именно оптогенетические технологии могут стать ключом к пониманию молекулярных механизмов нейропластичности и решению проблемы лечения социально значимых нейродегенеративных заболеваний человечества.

**Цель:** изучение молекулярных механизмов формирования и реализации нейропластичности при использовании оптогенетических технологий в эксперименте.

**Материалы и методы.** Исследования проведены на 20 трансгенных мышах линии B6.Cg-Tg(Thy1-COP4/EYFP)18Gfng/J, разделенных на 2 группы: основная группа (ОГ) (n=10) – экспериментальные животные, подвергающаяся оптогенетической стимуляции и группа контроля (КГ) (n=10) – интактные животные. Для осуществления операции по вживлению волоконно-оптического нейроинтерфейса в область дорсального гиппокампа экспериментального животного использованы технологии стереотаксического внедрения (аппарат Drill Robot, Германия). Оптогенетическая фотостимуляция мышей ОГ проводилась в импульсном режиме на протяжении 8 недель, ежедневно.

Для оценки нейрохимических аспектов нейропластичности выполнялся иммуноферментный анализ образцов плазмы крови мышей с дальнейшей оценкой уровня глиального фактора роста нервной ткани (GDNF), ростового фактора альфа (TGF- $\alpha$ ), транспортеров глутамата (EAAT). Для исследования морфологических особенностей головного мозга после оптогенетической стимуляции применяли методы световой и электронной микроскопии. Статистический анализ полученных данных выполнялся в программе Statistica 10.0.

**Результаты исследования.** При выполнении иммуноферментного анализа образцов плазмы крови мышей ОГ, подвергнутых оптической стимуляции, наблюдалось статистически значимое увеличение концентрации GDNF ( $p=0,004$ ) и EAAT ( $p=0,03$ ) по сравнению со значениями КГ. В отношении TGF- $\alpha$  в ОГ наблюдалась тенденция к повышению концентрации данного ростового фактора, однако полученные значения не несли статистически достоверных различий.

При морфологическом исследовании срезов головного мозга в ОГ выявлено увеличение толщины коркового слоя полушарий мозга по сравнению с группой интактных животных ( $p<0,00001$ ).

**Выводы.** В группе экспериментальных животных после проведенной оптогенетической стимуляции наблюдается статистически достоверное повышение концентрации GDNF и EAAT, а также увеличение толщины височно-теменной коры головного мозга, по сравнению с интактными животными, что свидетельствует об активации пластичности мозга и синапсообразования.

Внутривузовский грант АААА-А18-118112690034-0

**THE WORKSHOP ON ADVANCED METHODS OF NON-INVASIVE  
CONTROL OF NEURONAL ACTIVITY****ШКОЛА ПО СОВРЕМЕННЫМ МЕТОДАМ НЕИНВАЗИВНОГО  
КОНТРОЛЯ НЕЙРОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ**

---

**PHOTOCHROMIC MODULATION OF CYS-LOOP RECEPTORS**

Bregestovski P.D.

Kazan State Medical University, Kazan, Russia,  
INSERM Institute of System Neuroscience, Marsel, France  
e-mail: pbreges@gmail.com

Photopharmacology is a direction based on the creation of chemical compounds capable of controlling the functions of biological molecules possessing photosensitive switches. This approach is based on the ability of certain molecules (azobenzenes, spiropiranes, diarylethenes) to change their conformation upon illumination with the light of specific wavelength. Photochromic compounds that activate or inhibit the activity of key cellular proteins, especially ion channels, represent a powerful tools for non-invasive control of neuronal network activity and, consequently, functional control of organisms and their behaviour. Photoswitchable regulators have been designed and characterized for a large number of ligand-gated receptors in the mammalian nervous system. We have developed several new azobenzene-based light-controlled compounds capable to modulate function of inhibitory GABA and glycine Cys-loop receptors. The other photochromic compounds, which offers new opportunities to study and modulate neurotransmission mediated by Cys-loop receptors will be also described.

**ФОТОХРОМНАЯ МОДУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ CYS-ПЕТЕЛЬНЫХ  
РЕЦЕПТОРОВ**

Брежестовский П. Д.

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия,  
INSERM, Марсель, Франция  
e-mail: pbreges@gmail.com

Фотофармакология - это направление, основанное на создании химических соединений, способных контролировать функции биологических молекул, обладающих светочувствительными переключателями. Этот подход основан на способности определенных молекул (азобензолов, спиропиранов, диарилэтенев) изменять свою конформацию при освещении светом определенной длины волны. Фотохромные соединения, которые активируют или ингибируют активность клеточных белков, особенно ионных каналов, представляют собой мощные инструменты для неинвазивного контроля активности нейронных сетей и, следовательно, функционального контроля активности мозга и поведения организмов.

Фотопереключаемые регуляторы были разработаны и охарактеризованы для большого числа лиганд-управляемых рецепторов в нервной системе млекопитающих. На основе азобензола, мы создали несколько новых соединений, способных модулировать функции ингибирующих ГАМК и глициновых Cys-петельных рецепторов. Будут также описаны другие фотохромные соединения, которые открывают новые возможности для изучения и модуляции нейротрансмиссии, опосредованной Cys-петельными рецепторами.



***OPTICAL RECORDING OF MOUSE CORTICAL AND HIPPOCAMPAL NEURONS WITH MINISCOPES***

Malyshev A.Yu.

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

e-mail: malyshev@ihna.ru

Currently, optical recording of neural activity using genetically-encoded fluorescent calcium probes is widespread. Such an approach allows capturing the activity of large populations of neurons in non-narcotized animals when they perform various behavioral tasks. Traditionally, multiphoton microscopy is used for such recording, which, for all its advantages, has one significant drawback - the high cost of equipment, which greatly limits the possibility of using this approach. Recently, a much more affordable alternative to the confocal microscope has appeared, which also allows optical recording of neuronal activity in free behaving animals - these are miniature recording microscopes - miniscopes. One of the features of the miniscope is the possibility to assemble it from separately purchased components, which makes this method of recording of neuronal activity affordable to many laboratories.

***ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИНИСКОПОВ ДЛЯ ОПТИЧЕСКОЙ РЕГИСТРАЦИИ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ НЕОКОРТЕКСА И ГИППОКАМПА МЫШЕЙ***

Мальшев А. Ю.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва,  
Россия

e-mail: malyshev@ihna.ru

В настоящее время широкое распространение получила оптическая регистрация нейронной активности с использованием генетически-кодированных флуоресцентных кальциевых зондов. Подобный подход позволяет осуществлять регистрацию активности больших популяций нейронов на ненаркотизированных животных при выполнении ими различных поведенческих задач. Традиционно для такой регистрации применяется мультифотонная микроскопия, которая, при всех ее достоинствах, обладает одним существенным недостатком – высокой стоимостью оборудования, что значительно ограничивает возможность использования этого подхода. В последнее время появилась существенно более доступная альтернатива конфокальному микроскопу, позволяющая также проводить оптическую регистрацию активности нейронов у животных в свободном поведении – это миниатюрные регистрирующие микроскопы – минископы. Одной из особенностей минископа является возможность его самостоятельной сборки из приобретаемых отдельно комплектующих, что делает данный способ регистрации активности нейронов доступным для многих отечественных лабораторий.

***OPTOGENETICS AND NEUROPHOTONICS: READ-IN AND READ-OUT  
METHODS IN THE STUDY OF BRAIN NEURAL NETWORK***

Tsytsarev V. Yu.

University of Maryland, Maryland, United States

e-mail: [tsytsarev@som.umaryland.edu](mailto:tsytsarev@som.umaryland.edu)

The development of optogenetics and neurophotonic technologies make it possible to study the nervous system using artificially expressed photosensitive ion channels in cellular membranes. During the experiment, photons interact with lightsensitive peptides that form channels, activating or inhibiting them. Such an effect modulates the excitability of neurons with an accuracy of fractions of a millisecond. This technology is called read-in; from a physiological point of view, it consists in the ability to change the physiological status of an individual neuron contactless and almost instantly.

Artificially expressed in the neuron peptides or introduced from outside chemical agents with specific fluorescence properties make it possible to accurately record the physiological parameters of a neuron, primarily the concentration of intracellular calcium and the transmembrane voltage. This technology, aimed at visualizing the activity of neurons in vivo and in vitro is called read-out.

Both of these technologies, read-in and read-out, are inextricably linked not only with chemical and molecular genetic components, but also with the continuously evolving optoelectronic hardware support. This report summarizes optogenetic and neurophotonic approaches using examples from neurobiological studies of recent years, including our own. We consider light-sensitive peptide channels - opsins, including depolarizing and hyperpolarizing variants, as well as modulators of intracellular signal transmission associated with the G-protein, voltage-dependent dyes, and methods of their use in vivo.

Read-out includes visualization of wide field optical imaging of neuronal activity using voltage-sensitive dye, multiphoton microscopy using voltage-dependent and calcium-dependent fluorescence indicators, the use of optical tomography aFLOT (angled fluorescence laminar optic tomography). The combined use of aFLOT and voltage-sensitive fluorescent indicators allows direct visualization of neuronal activity in vivo in the cerebral cortex of the animal with a high temporal - up to the milliseconds - resolution. Thus, this technology allows you to directly monitor the operation of neural networks in relatively large volumes of brain tissue.

Recent advances in read-out include a genetically encoded indicator of membrane potential called Voltron. This indicator is an order of magnitude superior to existing fluorescent proteins and dramatically expands the possibilities of optical registration of neuronal activity in vivo.

In addition to numerous opsins, which allow using light pulses to almost instantly open and close the ion channels of neurons, recently was synthesized artificial ion channel, controlled by a magnetic field. Nevertheless, all technological methods used by read-in have a common limitation - the invasiveness of the stimulation mode and the relatively slow kinetics of the action of photosensitive proteins. These limitations were largely overcome by synthesizing a one-component magnetosensitive protein consisting of the TRPV4 cation channel fused to the paramagnetic protein ferritin and

called Magneto. Magneto enables non-invasive control of neural activity by demonstrating remote stimulation of neurons *in vivo* and *in vitro*, which provides new opportunities in technology for remote selective action on neurons.

Our own results were mainly obtained when working on a vibrating rodent system, which is one of the objects widely used in neurophotonic and optogenetics. Our own data will be presented on optical visualization and functional mapping of the somatosensory cortex of Robo3R3-5cKO mice with the Robo3 gene disabled (Robo3R3-5cKO), which leads to the formation of bilateral representations of whiskers in the thalamus, as well as in the barrel field of the cortex. Data obtained by the using of two-photon calcium imaging of the neural activity of the II-III layer of the primary somatosensory cortex when a single whisker deflection in two orthogonal directions (azimuthal or vertical). The obtained data continue the studies of functional topism of the nervous system, that is, the direct relationship of a particular function with a localized neuronal structure.

**ОПТОГЕНЕТИКА И НЕЙРОФОТОНИКА: READ-IN И READ-OUT  
МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ ГОЛОВНОГО  
МОЗГА**

Цыщарев В. Ю.

Университет Мэриленда, Мэриленд, Соединенные Штаты Америки

e-mail: tsytsarev@som.umaryland.edu

Развитие оптогенетики и нейрофотоники позволяет исследовать нервную систему используя искусственно экспрессированные светочувствительные ионные каналы в клеточных мембранах. В процессе эксперимента фотоны взаимодействуют с фоточувствительными пептидами, образуя каналы, активируя или ингибируя их. Такое воздействие модулирует возбудимость клеток с точностью до долей миллисекунды. Эта технология получила название read-in – с физиологической точки зрения она заключается в возможности бесконтактно и практически мгновенно менять физиологический статус отдельного нейрона.

Искусственно экспрессированные в нейроне пептиды или привнесенные извне химические агенты, обладающие специфическими флуоресцентными свойствами, позволяют с высокой точностью регистрировать физиологические параметры нейрона, в первую очередь, концентрацию внутриклеточного кальция и величину мембранного потенциала. Эта технология, направленная на визуализацию активности нейронов в организме, переживающем срезе мозга или в культуре клеток, называется read-out.

Обе эти технологии, read-in и read-out, неразрывно связаны не только с химическими и молекулярно-генетическими компонентами, но и с непрерывно развивающейся оптоэлектронной аппаратной поддержкой. В этом докладе обобщены оптогенетические и нейрофотонные подходы с использованием примеров из нейробиологических работ последних лет, в том числе и из наших собственных работ. Мы рассматриваем светочувствительные пептидные каналы - опсины, включая деполяризующие и гиперполяризующие их варианты, а также модуляторы внутриклеточной передачи сигналов, связанных с G-белком, потенциал-зависимые красители и методы их использования *in vivo*.

К read-out относятся визуализация нейрональной активности в широком поле (wide field optical imaging) с использованием потенциал-зависимых красителей (voltage-sensitive dye), мультифотонная микроскопия с использованием потенциал- и кальций-зависимых флуоресцентных индикаторов, использование оптической томографии aFLOT (angled fluorescence laminae optic tomography). Совместное использование aFLOT и потенциал-зависимых флуоресцентных индикаторов (voltage-sensitive dye) позволяет визуализировать нейрональную активность *in vivo* в коре головного мозга животного с высоким временным разрешением – вплоть до миллисекундного. Таким образом, эта технология позволяет напрямую отслеживать работу нейрональных сетей в относительно крупных объемах мозговой ткани.

К недавним достижениям в области read-out относится генетически кодированный индикатор мембранного потенциала, получивший название Voltron. Этот индикатор на порядок превосходит имеющиеся флуоресцентные белки и кардинально расширяет возможности оптической регистрации нейрональной активности *in vivo*.

В области read-in, помимо многочисленных опсинов, позволяющих с помощью световых импульсов практически мгновенно открывать и закрывать ионные каналы нейронов, в последнее время добавились ионные каналы, управляемые магнитным полем. Тем не менее, все технологические приемы, применяемые read-in, имеют общее ограничение – инвазивность режима стимуляции и относительно медленная кинетика действия фоточувствительных белков. Эти ограничения в значительной степени удалось преодолеть, синтезировав однокомпонентный магнитофоточувствительный белок, состоящий из катионного канала TRPV4, слитого с парамагнитным белком ферритином и получивший название Magneto. Magneto делает возможным неинвазивный контроль над нейронной активностью, демонстрируя дистанционную стимуляцию нейронов *in vivo* и *in vitro*, что предоставляет новые возможности в технологии дистанционного селективного воздействия на нейроны.

Одним из широко используемых в нейрофотонике и оптогенетике объектов является вибриссная система грызунов. Мы представляем наши собственные данные по оптической регистрации нейрональной активности и функциональному картированию соматосенсорной коры мышей линии Robo3R3-5сКО с выключенным геном Robo3. Выключение этого гена приводит к образованию двусторонних представительств вибрисс в таламусе, а также в бочонковом поле соматосенсорной коры. Эта линия генетически модифицированных мышей является моделью редкого заболевания нервной системы человека - horizontal gaze palsy with progressive scoliosis (HGPPS), или горизонтальный паралич содружественного взора, сопровождаемый прогрессивным сколиозом. Также мы представляем данные полученные при использовании двухфотонной кальциевой визуализации для регистрации активности нейронов II-III слоя первичной соматосенсорной коры при отклонении одиночной вибриссы в двух ортогональных направлениях (азимутальном или вертикальном).

*HOW TO WRITE A GOOD PAPER AND GET IT PUBLISHED*Turner A.J.<sup>1</sup>, Nalivaeva N.N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> University of Leeds, Faculty of Biological Sciences, School of Biomedical Sciences, Leeds, Brighouse, United Kingdom, <sup>2</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, Russia

e-mail: a.j.turner@leeds.ac.uk

Intensification of research in the 21st century resulted in a dramatic increase in the number of journals which publish scientific papers. Only in the field of biology and medicine there are about 3000 journal titles. It is currently an exciting and challenging time in the science publishing world as it transitions to a completely open access environment which means that all research data are instantly accessible to the public domain. This puts a significant burden on authors and Institutions since they need to cover publishing costs. The traditional journals are steadily replaced by electronic only journals and the number of journals publishing papers for free are rapidly declining. On the other hand, recent appearance of some dubious journals offering fast publication or even publication without any peer review casts a shade on the whole publishing industry. Impact factor of the journals and citation records (e.g. h-index) are now important parameters for considering employment strategies and research funding, invitations to talk at the meetings etc. Where to publish the results of your research and how make your paper more visible and citable is an important question for young scientists starting and developing their research career. It is also important to write your paper in the way that it gives a clear message to the readers avoiding direct translation of the text from your own language and plagiarism including extensive self-citation. The title, abstract and key words in the paper are also important for promoting visibility of your science. To avoid paying an excessive amount of money for publishing is another important strategy and it is worth to consider publishing in the journals owned by the learned societies or apply for reduced fees which many journals are offering to young scientists. Another important question is related to the peer review process of your paper. Selecting an appropriate journal where most of your peers are publishing similar research and suggesting confident experts as reviewers might help you to get a fair review and even valuable suggestions for improvement and further development of your work. Our experience in scientific publishing for more than three decades can help you to answer these important and burning questions and to guide you through the process of writing a concise research paper.

RFBR-19-015-00232

**OPTOGENETIC PROSTHETICS OF RETINAL BIPOLAR CELLS**

Firsov M.L.

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

e-mail: michael.firsov@gmail.com

Retinitis pigmentosa and other severe degenerative diseases of the retina most often lead to complete blindness and, unfortunately, are not amenable to treatment. There is a strategy for prosthetics of a degenerating retina using optogenetic approaches in which photosensitive proteins are introduced into either bipolar or ganglion cells. This operation provides bipolar cells or ganglion cells the property of photosensitivity, and turns them into pseudo-photoreceptors.

Over the past decade, mouse models with a degenerated retina have shown the principal opportunity of such prosthetics. In these animals, the expression of photosensitive proteins in degenerated neurons of the retina led to the appearance of photosensitivity and even the ability to orientate in space. At the same time, a circle of problems has yet to be resolved - low sensitivity to light of prosthetic cells, low selectivity and effectiveness of viral constructs, different specificity of viral constructs to a healthy and degenerated retina, and others.

**ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРОТЕЗИРОВАНИЕ БИПОЛЯРНЫХ КЛЕТОК  
СЕТЧАТКИ**

Фирсов М.Л.

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

e-mail: michael.firsov@gmail.com

Пигментный ретинит и другие тяжелые дегенеративные заболевания сетчатки чаще всего приводят к полной слепоте и к сожалению не поддаются лечению. Существует стратегии протезирования дегенерирующей сетчатки при помощи оптогенетических подходов, при которых светочувствительные белки внедряются либо в биполярные, либо в ганглиозные клетки. Такая операция придает биполярам или ганглиозным клеткам свойство светочувствительности, и превращает их в псевдофоторецепторы.

За прошедшее десятилетие на мышиных моделях с дегенерированной сетчаткой была показана принципиальная возможность такого протезирования. У этих животных, экспрессия светочувствительных белков в переживших дегенерацию нейронах сетчатки, приводила к появлению светочувствительности и даже способности к ориентации в пространстве. За это же время обозначился круг проблем, которые еще предстоит решить - низкая чувствительность к свету протезируемых клеток, низкая селективность и эффективность вирусных конструкторов, различная специфичность вирусных конструкторов к здоровой и дегенерированной сетчатке, и другие.

**SATELLITE SYMPOSIUM  
"IMAGING OF BIOLOGICAL OBJECTS"**

**САТЕЛЛИТНЫЙ СИМПОЗИУМ  
«ИМИДЖИНГ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ»**

---

**MECHANISMS OF EXCITOTOXICITY AND NEUROPROTECTION: A STUDY  
USING VITAL FLUORESCENCE TECHNIQUES**

Antonov S.M.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian  
Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

e-mail: antonov452002@yahoo.com

It is well established that a long-term action of L-glutamate (Glu), an excitatory neurotransmitter in the CNS, or L-homocysteine (HCY), an endogenous sulfur-containing amino acid involved in synthesis of methionine and cysteine, on cortical neurons in primary cultures induces neurodegeneration by necrosis and apoptosis which represents a widely used model of excitotoxicity and hyperhomocysteinemia, correspondently. Using a fluorescent viability assay (FVA, Mironova et al., 2007), and on-line monitoring of intracellular  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$  imaging experiments with Fluo-3) and mitochondrial membrane potential (using rhodamine123) with confocal microscopy, here neuroprotective effects of ouabain at concentrations 0.1 nM - 1 nM against excitotoxic stress were investigated *in vitro*. During short- (4 h) as well as long- (24 h) term treatments with Glu (100  $\mu$ M) or HCY (100  $\mu$ M) in the presence of 30  $\mu$ M glycine at both 0.1 nM and 1 nM ouabain prevented apoptosis of cortical neurons. In short-scale experiments this neuroprotective effects of ouabain appeared to be determined by an enhancement of  $Ca^{2+}$  extrusion from neurons by  $Na^+/Ca^{2+}$ -exchanger so that neither an accumulation of  $Ca^{2+}$  in neurons nor a drop of mitochondrial membrane potential were observed. In long-scale experiments in case of HCY 0.1 nM and 1 nM ouabain triggered neuroprotective cascades that involved activation of PKA and PKC, since proteinkinase A (PKA) inhibitor and proteinkinase C (PKC) inhibitor — chelerythrine abolished the neuroprotection and more than a half of neuronal population exhibited apoptosis. However, these inhibitors did not affect ouabain-caused neuroprotection against Glu excitotoxicity.

Thus, the data reveal that different intracellular cascades are involved in ouabain-triggered neuroprotection against Glu- and HCY-caused neurodegeneration that may suggest an existence of different possible targets for therapy in excitotoxicity and hyperhomocysteinemia

This work was supported by RSF by grant № 16-15-101192.

**CHAPERONE INDUCER U133 COUNTERACTS DEVELOPMENT OF  
ALPHA-SYNUCLEIN PATHOLOGY IN SUBSTANTIA NIGRA IN A MODEL  
OF PARKINSON'S DISEASE IN ELDERLY RATS**

Belan D.V.<sup>1</sup>, Polonik S.G.<sup>2</sup>, Ekimova I.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia, <sup>2</sup> G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of Far East Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

e-mail: daf205@yandex.ru

**Introduction:** Parkinson's disease (PD) is a chronic neurodegenerative disorder mainly of elderly people. The main causes of PD incurability are late diagnosis and the inconsistency of traditional methods of treatment with the modern understanding of the molecular mechanisms of PD pathogenesis. Misfolding of the  $\alpha$ -synuclein, which lead to its aggregation and the formation of toxic protofibrils, is considered as one of the main elements in the neurodegeneration of substantia nigra pars compacta (SNpc) neurons in PD. Post-translational modifications of  $\alpha$ -synuclein, including phosphorylation, may enhance its ability to aggregate. In Lewi bodies, about 90% of the  $\alpha$ -synuclein is phosphorylated at Ser129, indicating that this modification may be associated with the formation and toxicity of aggregated protein species. The chaperone system of HSP70 heat shock proteins is the first line of defense against the fatal consequences of protein misfolding. Pharmacotherapy aimed at mobilizing chaperones seems promising for the development of preventive therapy for PD. Particular attention is given to small molecules that penetrate through the blood-brain barrier and increase the expression of HSP70.

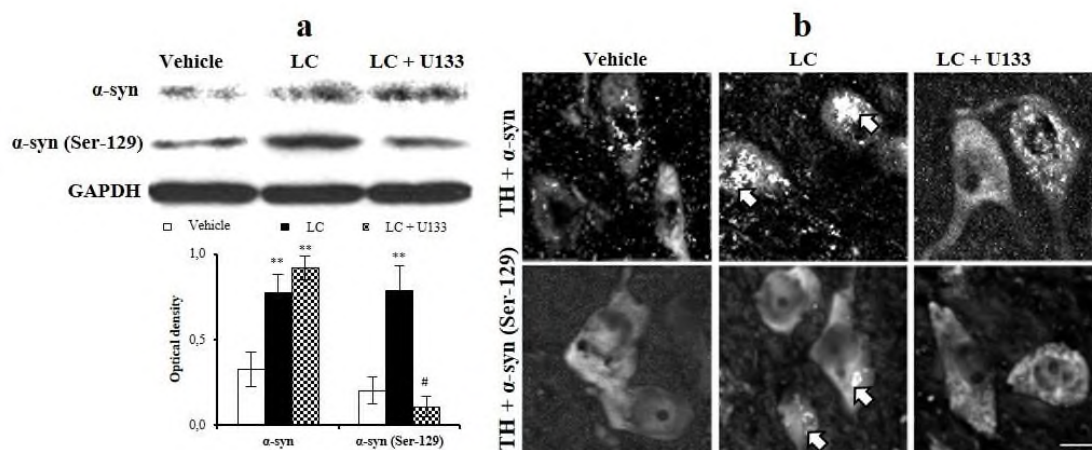
**Methods:** In the present study, we used a model of PD created by reducing the activity of the proteasome system in elderly rats (19-21 months). An increase in the level of Hsp40 and stress-induced protein Hsp70 in PD-relevant brain structures was reached by systemic administration of the quinoid compound chaperone inducer U133.

**Results:** In the model of PD, immunoblot assay showed that the contents of the  $\alpha$ -synuclein (total) and  $\alpha$ -synuclein (Ser129) increase in SNpc. Confocal microscopy revealed Lewi bodies containing large protein aggregates immunoreactive to both forms of  $\alpha$ -synuclein in dopaminergic neurons of SNpc (Fig.). Therapy with U133 led to a decrease of  $\alpha$ -synuclein (Ser129) amount and did not affect the amount of total  $\alpha$ -synuclein (Fig. 1). This was associated with the disappearance of large  $\alpha$ -synuclein aggregates and the homogeneous distribution of small inclusions of  $\alpha$ -synuclein in the cytoplasm of SNpc dopaminergic neurons (Fig. B).

**Conclusion:** The results indicate that HSP70-inducing therapy with U133 decreases the amount of cytotoxic aggregation-prone phosphorylated  $\alpha$ -synuclein (Ser-129). The results are of scientific and practical importance for the development of innovative technology for the pharmacotherapy of PD.

This work was supported by the state assignment (topic No. AAAA-A18-118012290427-7).





**Fig. 1.** The effect of therapy with the U133, heat shock proteins inducer, on the development of  $\alpha$ -synuclein pathology in the substantia nigra pars compacta (SNpc) in the Parkinson's disease model in elderly rats. Unmodified total soluble  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn);  $\alpha$ -synuclein phosphorylated at Ser-129 ( $\alpha$ -syn (Ser-129)). a. Representative immunoblots of SNpc. The significance of differences in the experiment relative to: vehicle \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ ; LC + U133 compared with LC # -  $p < 0.05$ . b. Confocal microscopy of SNpc: double immunolabeling using antibodies against tyrosine hydroxylase (TH) and  $\alpha$ -syn (upper panel) or  $\alpha$ -syn (Ser-129) (lower panel); scale - 10 m. Arrows indicate  $\alpha$ -synuclein aggregates.

**Рис. 1.** Влияние терапии с индуктором белков теплового шока U133 на развитие  $\alpha$ -синуклеиновой патологии в компактной части черной субстанции (кчЧС) в модели болезни Паркинсона у крыс пожилого возраста. Немодифицированная общая форма растворимого  $\alpha$ -синуклеина ( $\alpha$ -syn); посттрансляционно модифицированная форма  $\alpha$ -синуклеина, фосфорилированного по Ser-129 ( $\alpha$ -syn (Ser-129)). а. Репрезентативные иммуноблоты кчЧС. Достоверность различий в опыте относительно: контроля \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ ; ЛЦ + U133 по сравнению с действием ЛЦ # -  $p < 0.05$ . б. Результирующие изображения конфокальной микроскопии препаратов кчЧС: двойное иммуномечение с применением антител против тирозингидроксилазы (ТН) и  $\alpha$ -син (верхняя панель) или  $\alpha$ -син (Ser-129) (нижняя панель); масштаб 10 мкм. Стрелками показаны агрегаты  $\alpha$ -синуклеина.

### **ИНДУКТОР ШАПЕРОНОВ U133 ПРОТИВОДЕЙСТВУЕТ РАЗВИТИЮ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНОВОЙ ПАТОЛОГИИ В ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА**

Белан Д. В.<sup>1</sup>, Полоник С.Г.<sup>2</sup>, Екимова И.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия, <sup>2</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Владивосток, Россия

e-mail: daf205@yandex.ru

Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое нейродегенеративное заболевание преимущественно пожилых людей, основными причинами неизлечимости которого являются поздняя постановка диагноза и несоответствие традиционных методов лечения современному представлению о молекулярных механизмах патогенеза БП. В качестве одного из основных звеньев патогенеза нейродегенерации при БП рассматривается нарушение конформации белка  $\alpha$ -синуклеина, приводящее к его агрегированию и формированию токсичных

протофибрилл. Посттрансляционные модификации  $\alpha$ -синуклеина, в том числе фосфорилирование, могут усиливать его способность к агрегации. Около 90%  $\alpha$ -синуклеина, входящего в состав телец Леви, фосфорилировано в положении Ser129, что указывает на то, что эта модификация может быть связана с образованием и/или токсичностью агрегированных форм белка. Шаперонная система белков теплового шока HSP70 является первой линией защиты от фатальных последствий неправильной укладки белков. Фармакотерапия, направленная на мобилизацию шаперонов, представляется перспективной для разработки превентивной терапии БП. Особое внимание уделяется малым молекулам, повышающим экспрессию HSP70 и хорошо проникающим через гематоэнцефалический барьер.

В настоящем исследовании в модели БП у крыс пожилого возраста (19-21 мес.), созданной путем снижения активности протеасом головного мозга, применена терапия, основанная на системном введении индуктора шаперонов – низкомолекулярного хиноидного соединения U133, вызывающего повышение уровня стресс-индуцируемого белка Hsp70 и его ко-шаперона Hsp40 в значимых для БП структурах головного мозга. Методом иммуноблоттинга установлено, что в модели БП у пожилых крыс в кЧС возрастает содержание общей формы  $\alpha$ -синуклеина и  $\alpha$ -синуклеина, фосфорилированного по Ser-129. При использовании конфокальной микроскопии в дофаминергических нейронах кЧС обнаружены тельца Леви, содержащие крупные агрегаты белка, иммунореактивные к обеим формам  $\alpha$ -синуклеина (рис.). Терапия с U133 привела к регрессии  $\alpha$ -синуклеина (Ser129) и не оказала заметного влияния на количество общего растворимого  $\alpha$ -синуклеина (рис. 1). Это было сопряжено с исчезновением больших агрегатов  $\alpha$ -синуклеина и гомогенным распределением небольших включений  $\alpha$ -синуклеина в цитоплазме дофаминергических нейронов кЧС (рис. Б). Полученные результаты свидетельствуют, что HSP70-индуцирующая терапия с помощью U133 противодействует посттрансляционной модификации  $\alpha$ -синуклеина, приводящей к его агрегированию и цитотоксичности. Результаты имеют научно-практическую значимость для разработки инновационной технологии фармакотерапии БП.

Работа выполнена при поддержке госзадания (тема № АААА-А18-118012290427-7).

*ANALYSIS OF AUTOPHAGY MARKERS EXPRESSION AND AUTOPHAGIC FLUX IN THE RAT BRAIN STRUCTURES*

Churilova A.V.

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

e-mail: annch05@mail.ru

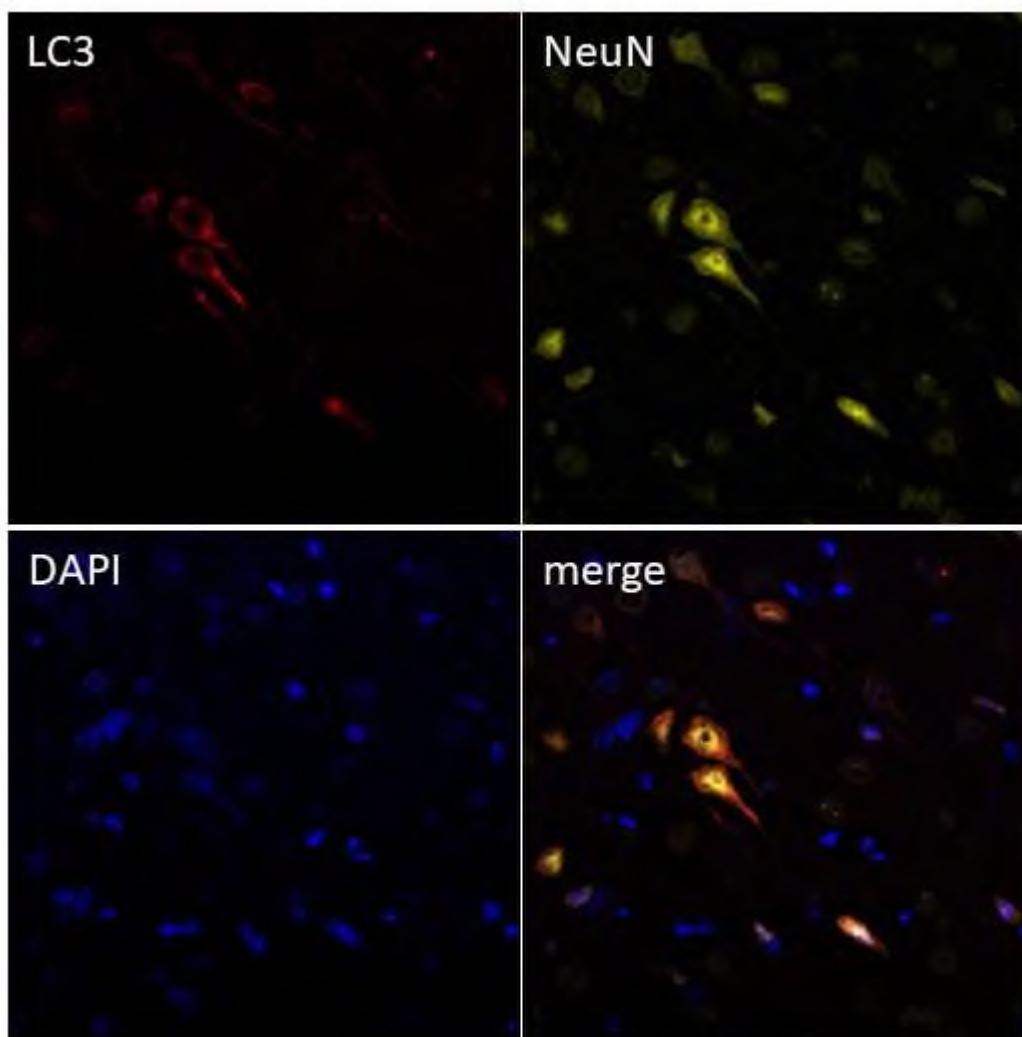
**Introduction:** Autophagy is an intracellular mechanism of degradation of cytoplasmic molecules and organelles in autophagosomes that regulates the balance between the level of decay and synthesis of cellular components, which is necessary for maintenance of cellular homeostasis. Autophagy is extremely important for the normal neuronal functioning. The purpose of this study was to characterize the expression of autophagy markers (LC3, p62, HSC70) as well as to assess the autophagy flux in the rat brain structures.

**Methods:** The study was performed using male Wistar rats (200-220 g). The cellular localization of the autophagy markers (neuronal, glial) was revealed by immunohistochemistry with a fluorescent label and visualized using confocal microscope at the Pavlov Institute of physiology of the RAS. The quantitative analysis was performed by measuring the optical density of the fluorescent signal. To assess the intensity of autophagy, a late-stage autophagy inhibitor, chloroquine, was used. Chloroquine changed the pH of lysosomes leading to autophagy block and accumulation of protein markers.

**Results:** LC3, p62, and HSC70 were expressed in cells immunopositive to neuronal marker NeuN. Expression of LC3, p62, and HSC70 was not observed in GFAP-labeled cells as well as other DAPI-colored cells that did not have a NeuN or GFAP signal. The basal levels of autophagy markers were much higher in the pyramidal neurons of the V layer of the neocortex than other cells of the neocortex and hippocampus. After chloroquine administration the levels of autophagy markers increased to a greater extent in the CA1 field of the hippocampus compared to the V layer of the neocortex: the accumulation of LC3 in the CA1 field exceeded the V layer of the neocortex by 4 times and HSC70 - by 2 times. Despite the higher levels of autophagy markers LC3, p62, HSC70 in the V layer of the neocortex compared to the hippocampus, the autophagy flux was higher in the CA1 field of the hippocampus rather than the V layer of the neocortex of rats.

**Conclusion:** LC3, p62, and HSC70 expression was found to be concentrated in neurons but not in glial cells of the rat brain. The functional difference between neurons of CA1 field of the hippocampus and the V layer of the neocortex in the levels of basal autophagy activity was revealed, which may partially explain the pronounced sensitivity of neurons of CA1 field of the hippocampus to injurious exposures, including hypoxia.

The work supported by the grant RFBR 19-04-01152.



**Fig.1.** Photomicrographs showing localization of LC3 predominantly in neuronal cells of V layer of neocortex of rats. LC3 (red), NeuN (yellow), DAPI (blue). Dimension 40x.

**Рис. 1.** Фотомикрографии, иллюстрирующие локализацию LC3 преимущественно в нейронах в V слое неокортекса крыс. LC3 (красный), NeuN (желтый), DAPI (синий). Увеличение 40x.

### **ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АУТОФАГИИ И ИНТЕНСИВНОСТИ АУТОФАГИИ В СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС**

Чурилова А. В.

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

e-mail: annch05@mail.ru

**Введение:** Аутофагия – внутриклеточный механизм деградации цитоплазматических молекул и органелл в аутофагосомах, осуществляющий регуляцию равновесия между уровнем распада и синтеза клеточных компонентов, что необходимо для поддержания клеточного гомеостаза. Аутофагия имеет исключительно важное значение для нормального функционирования нейронов. Целью настоящего исследования было выявление маркеров аутофагии (LC3, p62, HSC70), а также оценка интенсивности протекания аутофагии в структурах мозга.

**Методы:** Исследование выполнено на крысах-самцах линии Вистар (200-220 г), полученных из ЦКП Биокolleкция ИФ РАН. Клеточную локализацию исследуемых маркеров (нейрональную, глиальную) оценивали иммуногистохимическим методом с использованием флуоресцентной метки на конфокальном микроскопе в ЦКП ИФ РАН. Количественный анализ выполняли путем измерения оптической плотности с флуоресцентного сигнала. Для оценки интенсивности аутофагии использовали ингибитор поздних стадий аутофагии хлорохин, действие которого связано с изменением pH лизосом, в результате чего блокируется процесс аутофагии и происходит накопление белков-маркеров.

**Результаты:** выявлено, что LC3, p62, HSC70 экспрессируются в клетках, иммунопозитивных к нейрональному маркеру NeuN. Экспрессия LC3, p62 и HSC70 не наблюдалась в клетках, меченых GFAP, а также других клетках, окрашенных DAPI, но не имеющих сигнала к NeuN или GFAP. Базальный уровень содержания маркеров аутофагии был наиболее выражен в пирамидных нейронах V слоя неокортекса по сравнению с другими клетками неокортекса и гиппокампа. При введении хлорохина содержание белков-маркеров аутофагии увеличивалось значительно сильнее в поле CA1 гиппокампа, чем в V слое неокортекса: накопление LC3 в поле CA1 превосходило V слой неокортекса в 4 раза, а HSC70 – 2 раза. Т.е., несмотря на более высокий уровень содержания маркеров аутофагии LC3, p62, HSC70 в V слое неокортекса по сравнению с гиппокампом у животных, интенсивность аутофагии выше в поле CA1 гиппокампа по сравнению с V слоем неокортекса.

**Выводы:** Обнаружено, что экспрессия LC3, p62 и HSC70 сосредоточена в нейронах, но не глиальных клетках мозга крыс. Выявлено функциональное различие между нейронами поля CA1 гиппокампа и V слоя неокортекса по уровню базальной активности аутофагии, что, может частично объяснять особую роль и чувствительность нейронов поля CA1 гиппокампа к действию повреждающих воздействий, в том числе гипоксии

Грант РФФИ № 19-04-01152.

***EVALUATION OF THE T-SYSTEM OF RAT CARDIOMIOCYTES ON EARLY STAGES OF THE STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES***

Dobretsov M.G.<sup>1</sup>, Kubasov I.V.<sup>1</sup>, Bobkov D.E.<sup>2</sup>, Suhov I.B.<sup>1</sup>, Chistyakova O.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia, <sup>2</sup> Institute of Cytology of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

e-mail: dobretsovmaxim@gmail.com

Diabetic Cardiomyopathy (DCM) is a frequent complication of Diabetes Mellitus (DM) and a major cause of mortality in DM patients. However, the pathogenesis of DCM remains poorly studied. In particular, disorganization of the T-system (the system of transverse invaginations of plasma membrane into the cell and their longitudinal connections) of cardiomyocytes is considered as an early marker of cardiac pathology of various etiology and as a potentially critical step in the development of DCM. Testing this suggestion was the main goal of the current investigation conducted in rat models (male Wistar rats) of short-term (1 month), streptozotocin-induced (STZ, 30 mg/kg body weight, single intraperitoneal injection) prediabetes and acute DM (PrDM and ADM). STZ-rats that developed hyperglycemia (random glucose > 11 mM) were considered as ADM-rats, while the remaining STZ-rats – as PrDM animals. Evaluation of structural integrity of the T-system was done using analysis of confocal images of the left ventricle epicardium myocytes of isolated hearts, stained with the Di-8-ANEPPS (20  $\mu$ M). The results of the study have demonstrated that in the control hearts cardiomyocytes T-system is organized into regular networks of t-tubules, which run in parallel with Z-discs of the sarcomeres. Respectively, the frequency distributions of intervals between neighboring t-tubules (INT, measured along the major cell axis) peaked at 2  $\mu$ m value with not more than 21% of INT (per cell) exceeding 3  $\mu$ m cut-off. Only 4 $\pm$ 3% of the control heart cardiomyocytes (274 cells, 4 rats) could be considered as deficient, according to this parameter (>21% occurrence of long INT). At the same time, in the hearts of ADM- and, unexpectedly, of PrDM-rats, the fractions of such deficient with regard to regularity of T-system cardiomyocytes were statistically significantly higher than those in control: 76 $\pm$ 8% (ADM, 4 rats, 247 cells) and 48 $\pm$ 13% (PrDM, 8 rats, 573 cells). Thus, our data confirm that structural changes in the T-system of the rat heart left ventricle cardiomyocytes develop early during ADM and also during prediabetic stages of DM. Evaluation of pathogenesis of these changes and their relevance to the increased risk of development of the heart failure in subjects with prediabetes remains to be studied.

Supported by RFBR, award №19-015-00139.

**ИССЛЕДОВАНИЕ T-СИСТЕМЫ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ НА  
РАННИХ СТАДИЯХ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДИАБЕТА**

Добрецов М.Г.<sup>1</sup>, Кубасов И.В.<sup>1</sup>, Бобков Д.Е.<sup>2</sup>, Сухов И.Б.<sup>1</sup>, Чистякова О.В.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия, <sup>2</sup> Институт цитологии Российской академии наук,  
Санкт-Петербург, Россия

e-mail: dobretsovmaxim@gmail.com

Диабетическая кардиомиопатия (ДКМ) является частым осложнением сахарного диабета (СД) и основной причиной смертности среди пациентов с СД. Тем не менее, патогенез ДКМ, остается малоизучен. В частности, дезорганизация T-системы (системы поперечных инвагинаций плазматической мембраны внутрь клетки, t-трубочек, и их продольных соединений) кардиомиоцитов рассматривается, как ранний маркер сердечных патологий разных этиологий, и как потенциально важная ступень в развитии ДКМ. Основной задачей данной работы была проверка этого предположения в исследовании в крысиных моделях (самцы линии Вистар) вызванных стрептозотоцином (СТЗ, 30 мг на кг веса; однократная внутрибрюшинная инъекция) краткосрочных преддиабета и острого диабета (1 месяц, ПрСД или ОСД). СТЗ крысы, развившие гипергликемию (случайная глюкоза >11 mM) были отнесены к группе ОСД, тогда как остальные СТЗ крысы рассматривались, как ПрСД животные. Оценка структурной целостности T-системы проводилась на основании анализа конфокальных изображений клеток миокарда левых желудочков изолированных сердец, прокрашенных флуоресцентным красителем Di-8-ANEPPS (20 μM). Результаты исследования показали, что, в кардиомиоцитах контрольных сердец T-система организована в плотные сети t-трубочек, параллельные Z-дискам саркомеров. Соответственно, основной пик в частотных распределениях интервалов между соседними t-трубочками контрольных миоцитов (ИСТ, измеренных вдоль оси клетки) находился при 2 μm значении оси X распределения. При этом не более 21% ИСТ (на клетку) превышало величину в 3 μm. Только 4±3% кардиомиоцитов контрольных сердец (274 клетки, 4 крысы) обнаруживали дефектность по этому параметру (>21% встречаемость аномально длинных ИСТ). В то же время, в сердцах ОСД крыс и, неожиданно, в сердцах крыс ПрСД группы, пропорция таких дефектных с точки зрения регулярности T-системы кардиомиоцитов достоверно выше, чем в контроле, составляя соответственно 76±8% (4 крысы, 247 клеток) и 48±13% (8 крыс, 573 клетки). Таким образом, наши данные подтверждают быстрое развитие структурных изменений в T-системе кардиомиоцитов левого желудочка сердца крысы как при ОСД, так и на преддиабетических стадиях заболевания. Выяснение патогенеза этих изменений и их отношения к увеличению риска развития сердечной недостаточности в популяции пациентов с преддиабетом нуждается в дальнейших исследованиях.

Поддержано грантом РФФИ №19-015-00139.

**VISUALIZATION OF HIPPOCAMPAL NEURONS IN THE CA1 REGION  
USING A MINIATURE FLUORESCENT MICROSCOPE**Gerasimov E.I.<sup>1</sup>, Erofeev A.I.<sup>1</sup>, Pushkareva S.A.<sup>1</sup>, Vlasova O.L.<sup>1</sup>, Bezprozvanny I.<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia, <sup>2</sup> The University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA

e-mail: evgeniigerasimov1997@gmail.com

Nowadays, the actual objective of neurobiology is to visualize not only the morphology of neurons, but also neuronal activity *in vivo*, which is achieved by using special sensors that fluoresce when the concentration of various ions, such as calcium, changes. Until recently, there were methods for visualizing the activity of neurons using a two-photon microscope on fixed animals, or methods that allow it to be detected *in vivo*, but not with cellular resolution, for example, a fiber array [1].

With the development of technologies, two-photon miniature microscopes were developed to detect calcium fluctuations in groups of neurons, but their use was difficult due to their complex structure and cost. Therefore, single-photon miniature microscopes (Miniscopes) with high resolution were developed to allow experiments on free-moving animals [2].

Various indicators are used to evaluate changes in neuronal activity using Miniscope, such as GCamp (a genetically encoded calcium indicator), potential sensors on the membrane, etc., which makes this method promising in the study of neuronal dynamics. To understand the relationship between neural circuit activity and behavior, optogenetics can be and simultaneous registration of a calcium signal in the brains of free-moving animals.

In the laboratory of Molecular Neurodegeneration (LMN) Spbpu conducted work on the development of the Miniscope implantation technique for visualizing the activity of hippocampal neurons *in vivo*.

In the course of their implementation, the following tasks were solved:

- 1) a virus (AAV2-GFP) was injected using a stereotactic operation;
- 2) implanted GRIN (gradient) lens for focusing fluorescence from the field of neurons;
- 3) the Miniscope is fixed to a stationary base.

The algorithm for performing stereotactic virus injection operations (AAV2-GFP) was also optimized. To verify the accuracy of the introduction of the virus into the hippocampus, images were taken with a confocal microscope (Fig.1 A, B).

During stereotactic surgery, the layers of the brain were removed before the oblique course of the hippocampal fibers (Fig.1 C).

After Miniscope implantation, hippocampal neurons expressing GFP were visualized (Fig.1 D).

Thus, the method of implantation of Miniscope with subsequent visualization of hippocampal neurons in the LMN is set. In the future, it is expected to be used for *in vivo* calcium imaging in behavioral tests on mouse models of neurodegenerative diseases.

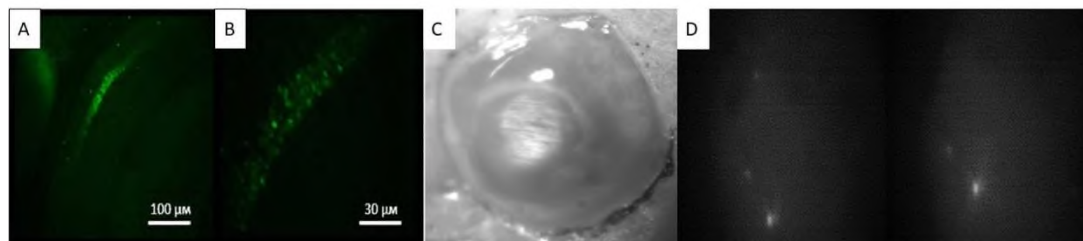
References:



[1] Ferezou, I. Visualizing the Cortical Representation of Whisker Touch: Voltage-Sensitive Dye Imaging in Freely Moving Mice / I. Ferezou, S. Bolea, C.C.H. Petersen. – 2006. – P. 617–629 – doi: 10.1016/j.neuron.2006.03.043.

[2] Ghosh, K.K. Miniaturized integration of a fluorescence microscope / K.K. Ghosh, L.D. Burns, E.D. Cocker, A. Nimmerjahn, Y. Ziv, A. El Gamal, M.J. Schnitzer. – 2011. – Vol. 8 – № 10 – doi:10.1038/nmeth.1694.

Russian Science Foundation Grant 19-15-00184



**Fig.1.** A, B-visualization of CA1 neurons in the hippocampal region that express GFP in slices (A-increase of 10-x, B-increase of 40-x), C-the course of neural fibers in the hippocampal region, D- In vivo images of hippocampal region of the mouse using a Miniscope.

**Рис.1.** А, Б-Визуализация нейронов СА1 области гиппокампа, экспрессирующих GFP в срезах (А – увеличение 10-х, В– увеличение 40-х), С-ход нейронных волокон в гиппокампальных области, D- In vivo снимки области гиппокампа мыши с помощью Miniscope.

### **ВИЗУАЛИЗАЦИЯ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА ОБЛАСТИ СА1 С ПОМОЩЬЮ МИНИАТЮРНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МИКРОСКОПА**

Герасимов Е. И.<sup>1</sup>, Ерофеев А.И.<sup>1</sup>, Пушкарева С.А.<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> Отделение физиологии Юго-Западного медицинского центра Университета Техаса, Даллас, Техас, США

e-mail: evgeniigerasimov1997@gmail.com

В настоящее время актуальной задачей нейробиологии становится визуализация не только морфологии нейронов, но и нейрональной активности *in vivo*, что достигается при помощи специальных сенсоров, которые флуоресцируют при изменении концентрации различных ионов, например, кальция. До недавних пор существовали методики визуализации активности нейронов при помощи двухфотонного микроскопа на фиксированных животных, либо методы, позволяющие ее детектировать *in vivo*, но не с клеточным разрешением, например, оптоволоконный массив (fiber assay) [1].

С развитием технологий появились двухфотонные миниатюрные микроскопы, позволяющие детектировать флуктуации кальция в группах нейронов, однако их применение было затруднено в связи с их сложным устройством и стоимостью. Поэтому были разработаны однофотонные

миниатюрные микроскопы (Miniscope) с высокой разрешающей способностью, позволяющие проводить эксперименты на свободнодвижущихся животных [2].

Для оценки изменения активности нейронов с помощью Miniscope используются различные индикаторы, например, GCaMP (генетически кодируемый кальциевый индикатор), сенсоры потенциала на мембране и др., что делает данный метод перспективным в изучении нейрональной динамики. Чтобы понять связь между активностью нейронных цепей и поведением, можно использовать оптогенетику и одновременную регистрацию кальциевого сигнала в мозге свободно перемещающихся животных.

В Лаборатории Молекулярной Нейродегенерации (ЛМН) СПбПУ проведены работы по освоению методики имплантации Miniscope для визуализации активности нейронов гиппокампа *in vivo*.

В ходе их выполнения были решены следующие задачи:

- 1) инжескирован вирус (AAV2-GFP) при помощи стереотаксической операции;
- 2) имплантирована GRIN (градиентной)-линза для фокусировки флуоресценции с поля нейронов;
- 3) закреплен Miniscope на неподвижное основание.

Был, также, оптимизирован алгоритм проведения стереотаксических операций по введению вируса (AAV2-GFP). Для проверки точности введения вируса в гиппокамп были сделаны снимки на конфокальном микроскопе (Рис.1 А, Б).

Во время стереотаксической операции проводилось удаление слоев мозга до косоого хода волокон гиппокампа (Рис.1 В).

После имплантации Miniscope были визуализированы нейроны гиппокампальной области, экспрессирующие GFP (Рис.1 Г).

Таким образом, методика имплантации Miniscope с последующей визуализацией нейронов гиппокампа в ЛМН поставлена. В дальнейшем предполагается ее использовать для проведения кальциевого имаджинга *in vivo* в поведенческих тестах на мышах-моделях нейродегенеративных заболеваний.

#### *Литература:*

- [1] Ferezou I. Visualizing the Cortical Representation of Whisker Touch: Voltage sensitive Dye Imaging in Freely Moving Mice / S. Bolea, C.C.H. Peterson - 2006. - P.616-629.  
[2] Ghosh, K.K. Miniaturized integration of a fluorescence microscope / L.D. Burns, E. D. Cocker, A. Nimmerjahn, Y. Ziev, M.J. Schnitzer.- 2011. - Vol.8 - №10.

РФФИ 19-15-00184

**DEVELOPMENT OF THE FETAL CEREBRAL CORTEX**Krasnoschekova E.I.<sup>1</sup>Tkachenko L.A.<sup>1</sup>, Nasyrov R.A.<sup>2</sup>, Zykin P.A.<sup>1</sup><sup>1</sup> St Petersburg University, St. Petersburg, Russia

e-mail: krasnelena@gmail.com

We studied peculiarities of the structure of human cortex at weeks 21-26 of gestation (10 hemispheres). Prenatal ontogeny of human neocortex have distinctive features that make it unique. Experimental data obtained on animal models could not be easily extrapolated on human corticogenesis of middle and late gestational period. Material was obtained during legal autopsies. The samples were Nissl-stained and immunohistochemically treated with antibodies against microtubule associated protein MAP2, specific layer FOXP1, CTIP2, TBR1 and SATB2. Expression of these proteins marked neurons of specific layer and the beginning of dendrogenesis. It was shown, that SATB2+ neurons are identifiable in embryonic cortical layers eIII and eII, TBR1 positive neurons in layer eVI. Morphotype and position of neuron within cortical layers could identify due to abundance of MAP2 in neuron body and dendrites. It was shown, that FOXP1+/CTIP2+ and MAP2 positive neurons are identifiable in embryonic cortical layer eV as early as 21th gestational week. At 26th gestational week two populations of pyramidal neurons are apparent inside cortical plate. In addition to layer eV neurons that have had differentiated earlier, layer eIII neurons appears. Our results suggest that critical periods for cortico-cortical and corticofugal populations of pyramidal cells occurs at different stages of second gestational trimester.

The research was supported SPbSU grant № 1.38.333.2015, and conducted with the use of SPbSU “CM&CT” Research Park facility (project № 109-306).

**ОСОБЕННОСТИ ПРЕНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ КОРЫ МОЗГА  
ЧЕЛОВЕКА**Краснощечкова Е.И.<sup>1</sup>, Ткаченко Л.А.<sup>1</sup>, Насыров Р.А.<sup>2</sup>, Зыкин П.А.<sup>1</sup><sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия,<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: krasnelena@gmail.com

Цель работы – изучить постмиграционное развитие нейронов неокортекса мозга человека.

Весь пренатальный период развития неокортекса у лабораторных животных гомологичен 1-му триместру гестации человека, 2 и 3 триместры не могут быть смоделированы, поэтому изучены слабо. Пренатальные УЗИ и МРТ фиксируют только анатомические изменения – гирификацию коры, соотношение серого и белого вещества, на ранних этапах – корковую пластинку (КП) и субпластинку (СП). Цито- и хемоархитектонику пренатального мозга человека исследуют редко из-за объективных проблем со стандартизацией постмортемного плодного материала.

Наше исследование проведено комплексом методов – цитоархитектоническим, иммуногистохимическим с широкой линейкой антител, анализом распределения липидов (MALDI), исследованием морфологии нейронов в объемном блоке ткани (Clarity).

Исследовано 10 экземпляров мозга плодов 21 - 26 недель гестации, блоки ткани залиты в парафин, каждый 10-й срез окрашен по Нисслю. Из них 8 случаев дополнительно обработаны ИГХ с MAP2, 5 – с рилином и N200, 4 – с антителами к слой-специфическим белкам.

SPbSU grant № 1.38.333.2015

**POSSIBLE ANTINOCICEPTIVE MECHANISMS TRIGGERED BY NANOMOLAR CONCENTRATIONS OF OUABAIN IN PRIMARY SENSORY NEURONS. USING ATOMIC FORCE AND CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY TO VISUALIZE CELL REACTIONS**

Krylov B.V.<sup>1</sup>, Penniyaynen V.A.<sup>1</sup>, Khalisov M.M.<sup>1</sup>, Podzorova S.A.<sup>1</sup>,  
Ankudinov A.V.<sup>2</sup>, Plakhova V.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia,

<sup>2</sup> Ioffe Physical-Technical Institute RAS, St. Petersburg, Russia

e-mail: krylovbv@yandex.ru

Earlier, a new signaling cascade was found in the membrane of the primary sensory neuron, in which the Na, K-ATPase / Src complex plays the role of a signal transducer [1, 2]. NaV1.8 channels encoding nociceptive signals function here as an effector unit. In this work, we investigated the possible physiological role of endogenous ouabain (EO), which is present in the bloodstream in nanomolar concentrations. It was previously shown that EO modulates the transducer function of Na, K-ATPase, transmitting signals to both NaV1.8 channels and the cell genome [3]. In the first case, the voltage sensitivity of these channels decreases and, as a result, an antinociceptive reaction occurs. Another EO-triggered process is directed radially to the genome. The use of confocal and atomic force microscopy (AFM) methods allowed us to obtain indications that this process probably leads to modulation of the expression of NaV1.8 channels, which manifests itself in a decrease in their density in the membrane. Indications of the existence of this effect were detected by immunofluorescence analysis. The use of the AFM method showed that the EO-triggered mechanism leads to an increase in cell stiffness, which is consistent with a decrease in the density of NaV1.8 channels embedded in the neuron membrane. As a result of this, a decrease in the perforation of the membrane matrix by these protein molecules should occur, that is why, the neuron as a whole becomes more rigid. The data obtained indicate that at the organismal level the EO might be a potent analgesic.

Experiments were carried out using the equipment of the Confocal Microscopy Collective Use Center (Pavlov Institute of Physiology).

*References*

- [1] Krylov B. V., Rogachevsky I. V., Shelykh T. N., Plakhova V. B. New non-opioid analgesics: understanding molecular mechanisms on the basis of patch-clamp and quantum-chemical studies // Sharjah: Bentham sci. publ., 2017. - 203 p. — (Frontiers in pain sci.; Vol. 1)
- [2] Penniyaynen V.A., Plakhova V.B., Rogachevsky I.V., Terekhin S.G., Podzorova S.A., Krylov B.V. Molecular mechanisms and signaling by comenic acid in nociceptive neurons influence the pathophysiology of neuropathic pain. // Pathophysiology. - 2019. - Vol. 26, №3-4. - P.245-252.
- [3] Lopatina E.V., Yachnev I.L., Penniyaynen V.A., Plakhova V.B., Podzorova S.A., Shelykh T.N., Rogachevsky I.V., Butkevich I.P., Mikhailenko V.A., Kipenko A.V., Krylov B.V. Modulation of signal transducing function of neuronal membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief // Medicinal Chem.-2012. -V.8, №1.- P. 33-39.

The Russian Foundation for Basic Research funded this work (Project No. 18-015-00079).

**ВОЗМОЖНЫЕ АНТИНОЦИЦЕПТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ,  
ЗАПУСКАЕМЫЕ НАНОМОЛЯРНЫМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ УБАИНА В  
ПЕРВИЧНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНАХ. ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-  
СИЛОВОЙ И КОНФОКАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ  
МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОТВЕТОВ КЛЕТОК**

Крылов Б. В.<sup>1</sup>, Пеннийайнен В.А.<sup>1</sup>, Халисов М.М.<sup>1</sup>, Подзорова С.А.<sup>1</sup>,  
Анкудинов В.А.<sup>2</sup>, Плахова В.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия, <sup>2</sup> Физико-  
технический институт им А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: krylovbv@yandex.ru

Ранее в мембране первичного сенсорного нейрона нами был обнаружен каскад, в котором комплекс Na,K-АТФаза/Src выполняет сигнальную функцию [1, 2]. Эффекторным звеном здесь служат каналы NaV1.8, кодирующие ноцицептивные сигналы. В настоящей работе исследована возможная физиологическая роль эндогенного убаина (ЭУ), присутствующего в организме в наномолярных концентрациях. Ранее было показано, ЭУ модулирует трансдукторную функцию Na,K-АТФазы, передавая сигналы как к каналам NaV1.8, так и на геном клетки [3]. В первом случае происходит снижение потенциалочувствительности указанных каналов и, как следствие, возникает антиноцицептивная реакция. Другой активируемый ЭУ процесс, направлен радиально на геном. Применение методов конфокальной и атомно-силовой микроскопии (АСМ) позволило получить указания на то, что этот процесс приводит, видимо, к модуляции экспрессии каналов NaV1.8, что проявляется в уменьшении их плотности в мембране. Указания на существование этого эффекта обнаружены методом иммунофлуоресцентного анализа. Применение метода АСМ показало, что активируемый ЭУ механизм проявляется в увеличении жесткости клетки, что согласуется с выявленным выше снижением плотности каналов NaV1.8, встроенных в мембрану нейрона. Вследствие этого должно происходить уменьшение перфорации мембранного матрикса указанными белковыми молекулами. В результате нейрон в целом становится более жестким. Полученные данные позволяют предположить, что на организменном уровне ЭУ является сильнейшим анальгетиком.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН

*Литература*

- [1] Krylov B. V., Rogachevsky I. V., Shelykh T. N., Plakhova V. B. New non-opioid analgesics: understanding molecular mechanisms on the basis of patch-clamp and quantum-chemical studies // Sharjah: Bentham sci. publ., 2017. - 203 p. — (Frontiers in pain sci.; Vol. 1)
- [2] Penniyaynen V.A., Plakhova V.B., Rogachevsky I.V., Terekhin S.G., Podzorova S.A., Krylov B.V. Molecular mechanisms and signaling by comenic acid in nociceptive neurons influence the pathophysiology of neuropathic pain. // Pathophysiology. - 2019. - Vol. 26, №3-4. - P.245-252.
- [3] Lopatina E.V., Yachnev I.L., Penniyaynen V.A., Plakhova V.B., Podzorova S.A., Shelykh T.N., Rogachevsky I.V., Butkevich I.P., Mikhailenko V.A., Kipenko A.V., Krylov B.V. Modulation of signal transducing function of neuronal membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief // Medicinal Chem.-2012. -V.8, №1.- P. 33-39.

Грант РФФИ № 18-015-00079

*THE ROLE OF MELANOCORTIN RECEPTOR TYPE 1 IN THE BRAIN AS AN AUTORECEPTOR*

Mikhaylova E.V., Kosicin Yu.M., Romanova I.V.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

e-mail: drakia87@gmail.com

**Introduction.** Melanocortin peptides (alpha-, beta-, gamma-MSH and ACTH) are formed from a common precursor, proopiomelanocortin (POMC), which is expressed in mammals both in the brain and in peripheral tissues. The effects of melanocortin peptides are mediated through five types of melanocortin receptors (MCR). In mammalian brains, POMC expression was detected in neurons of the arcuate hypothalamic nucleus (ARC) and in the nucleus tractus solitaries (NTS). The effects of melanocortin peptides are mainly discussed in connection with type 3 and type 4 MCR (MCR3/MCR4), which are involved in the regulation of food intake and energy balance. It was shown that MCR type 1 (MCR1) is expressed in peripheral tissues and is involved in the regulation of melanogenesis. The several results show the expression of MCR1 in the brain, in particular in connection with neuroinflammation. **The aim** of the study was to analyze the expression of MCR1 in ARC and NTS - brain structures where POMC neurons were detected. The study was conducted on C57Bl / 6J mice.

**Methods:** double fluorescence immunolabeling and confocal microscopy. Immunohistochemical studies were performed on frontal brain sections (16 µm) mounted on glasses. For the reactions a mixture of primary mouse antibodies to POMC (Abcam) and rabbit antibodies to MCR1 (Elabscience), a mixture of secondary antibodies conjugated with fluorochromes (Invitrogen): donkey to mouse-Alexa-568 and chicken to rabbit-Alexa-488 and nuclear colorant DAPI were used. Sections were analyzed using a DMI6000 confocal microscope with a SP5 II laser unit (Leica Microsystems, Germany). Lasers with an excitation wave length of 488, 568 nm and 355 nm for DAPI were used. Images were analyzed using the Leica LAS AF software; preparations for the demonstration were performed using Photoshop CS3.

**The results** of the ARC study demonstrate immuno-expression of MCR1 both in the bodies of POMC-immunopositive neurons and in other ergism structures. In NTS, immuno-expression of MCR1 was detected in the bodies of POMC neurons are localized in various regions of this structure, both in large and small cell regions.

**Conclusions.** Data on the expression of MCR1 in POMC-neurons indicate the functional role of MCR1 as an autoreceptor, which was previously discussed in the literature in connection with the expression of MCR3 in brain POMC-neurons.

The study was carried out using the equipment of the CCU of the IEPHB RAS. State assignment № AAAA-A18-118012290372-7 at the expense of the state budget.

**РОЛЬ МЕЛАНКОРТИНОВОГО РЕЦЕПТОРА 1-ГО ТИПА В МОЗГЕ КАК АУТОРЕЦЕПТОРА**

Михайлова Е.В., Косицын Ю.М., Романова И.В.

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

e-mail: drakia87@gmail.com

**Введение.** Меланокортиновые пептиды (альфа-, бета-, гамма-МСГ и АКТГ) образуются из общего прекурсора - проопиомеланокортина (ПОМК), который у млекопитающих экспрессируется как в мозге, так и в периферических тканях. Эффекты меланокортиновых пептидов опосредуются через пять типов меланокортиновых рецепторов (МКР). В мозге млекопитающих экспрессия ПОМК выявлена в нейронах аркуатного ядра гипоталамуса (arcuate nucleus - ARC) и ядра одиночного тракта (nucleus tractus solitaries – NTS), а эффекты меланокортиновых пептидов в основном обсуждаются в связи с МКР 3-го и 4-го типов (МКР3/МКР4), которые вовлечены в регуляцию пищевого поведения и энергетического баланса. Показано, что МКР 1-го типа (МКР1) экспрессируется в периферических тканях и участвует в регуляции меланогенеза. Результаты ряда исследований показывают экспрессию МКР1 и в мозге, в частности в связи с нейровоспалением. **Цель** настоящего исследования – провести анализ экспрессии МКР1 в ARC и NTS - структурах мозга, где выявлены ПОМК-нейроны. Исследование проведено на мышах C57Bl/6J.

**Методы:** двойное флуоресцентное иммуномечение и конфокальная микроскопия. Иммуногистохимические исследования проводили на фронтальных срезах мозга (16 мкм), монтированные на стеклах. Для реакций использовали смесь первичных антител мыши против ПОМК (Abcam) и кролика против МКР1 (Elabscience), смесь вторичных антител, конъюгированных с флуорохромами (Invitrogen): осли против мыши-Alexa-568 и цыпленка против кролика-Alexa-488, ядерный краситель DAPI. Анализ срезов проводили с помощью конфокального микроскопа DMI6000 с лазерной установкой SP5 II Leica (Leica Microsystems, Германия), использовали лазеры с длиной волны возбуждения 488, 568 нм и 355 нм для DAPI. Изображения анализировали с помощью пакета программ Leica LAS AF, подготовку к демонстрации проводили с помощью программы Photoshop CS3.

**Результаты** исследования ARC демонстрируют иммуоэкспрессию МКР1 как в телах ПОМК-иммунопозитивных нейронов, так и в структурах другой эргичности. В NTS иммуоэкспрессия МКР1 выявлена в телах ПОМК-нейронов, локализованных в различных областях данной структуры: как в крупноклеточных, так и в мелкоклеточных.

**Выводы.** Данные об экспрессии МКР1 в ПОМК-нейронах свидетельствуют о функциональной роли МКР1 как ауторецептора, которая ранее обсуждалась в литературе в связи с экспрессией В ПОМК-нейронах мозга МКР3.

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН на средства государственного бюджета по госзаданию № АААА-А18-118012290372-7

***INVESTIGATION OF THE POSSIBILITY OF DOPAMINE AND SEROTONIN  
INFLUENCE ON OREXIN-IMMUNOPOSITIVE CELLS OF RAT EMBRYONS  
HYPOTALAMUS***

Morina I.Yu., Romanova I.V.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian  
Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

e-mail: irinamorina@mail.ru

**Introduction.** Orexinergic neurons of the hypothalamus are involved in control of the different functions of organism, especially energy balance, food intake, wakefulness and awakening. The direct effect of brain dopamine and serotonin on hypothalamic orexinergic neurons is carried out through various subtypes of the corresponding receptors (in particular, activating G-protein-bound D<sub>1</sub> and 5HT<sub>2C</sub>). In 14-th day old rat pups were subjected to stress in the prenatal period, the increased dopamine level in the hypothalamus and activation of the hypothalamic orexinergic neurons was observed. These data indicates the possibility of the influence of monoaminergic systems on hypothalamic orexinergic neurons already in the embryonic period of development. To verify this hypothesis, a study of the hypothalamus of 18-day-old rat embryos (E18) was carry out.

**Methods.** Western blotting, double fluorescence immunolabeling and confocal microscopy. For Western blotting the primary rabbit antibodies to D<sub>1</sub> (Abcam) or 5HT<sub>2C</sub> (Elabscience) receptors were used. Immunohistochemical studies were performed on frontal brain sections (10 µm) mounted on glasses. For the reactions a mixture of primary mouse antibodies to orexin-A (R&Dsystems) with the same rabbit antibodies to D<sub>1</sub> or 5HT<sub>2C</sub> receptors, a mixture of secondary antibodies conjugated with fluorochromes (Invitrogen): donkey to mouse-Alexa-568 and chicken to rabbit-Alexa-488 and nuclear colorant DAPI were used. Sections were analyzed using a DMI6000 confocal microscope with a SP5 II laser unit (Leica Microsystems, Germany). Lasers with an excitation wave length of 488, 568 nm and 355 nm for DAPI were used. Images were analyzed using the Leica LAS AF software; preparations for the demonstration were performed using Photoshop CS3.

**Results.** In the hypothalamus the expression of dopamine D<sub>1</sub> receptor and 5HT<sub>2C</sub> serotonin proteins was shown by Western blotting. Confocal microscopy confirms the immuno-expression of D<sub>1</sub> and 5HT<sub>2C</sub> in the bodies of developing orexin-immunopositive cells.

**Conclusions.** The obtained results indicate that the development of morphofunctional interactions of monoaminergic systems with orexinergic occurs in the embryonic period of the development of the organism.

The study was carried out using the equipment of the CCU of the IEPHB RAS and was supported by state state assignment No. AAAA-A18-118012290372-7 at the expense of the state budget.



**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВЛИЯНИЯ ДОФАМИНА И  
СЕРОТОНИНА НА ОРЕКСИН-ИММУНОПОЗИТИВНЫЕ КЛЕТКИ  
ГИПОТАЛАМУСА ЭМБРИОНОВ КРЫСЫ**

Морина И. Ю., Романова И.В.

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

e-mail: irinamorina@mail.ru

**Введение.** Орексиnergические нейроны гипоталамуса контролируют различные функции организма, прежде всего энергетический баланс, пищевое поведение, бодрствование и пробуждение. Прямое влияние дофамина и серотонина мозга на орексиnergические нейроны гипоталамуса осуществляется через различные подтипы соответствующих рецепторов (в частности активирующие G-белок-связанные  $D_1$  и  $5HT_{2C}$ ). У 14-ти дневных крысят, подвергнутых стрессу в пренатальном периоде, на фоне увеличения уровня дофамина в гипоталамусе отмечена активация орексиnergических нейронов гипоталамуса, что указывает на возможность влияния моноаминергических систем на орексиnergические нейроны гипоталамуса уже в эмбриональном периоде развития. Для проверки этого предположения было проведено исследование гипоталамуса 18-ти дневных эмбрионов крысы (E18).

**Методы.** Вестерн-блоттинг, двойное флуоресцентное иммуномечение и конфокальная микроскопия. Для Вестерн-блоттинга использовали первичные антитела кролика к  $D_1$  (Abcam) или  $5HT_{2C}$  (Elabscience) рецепторам. Иммуногистохимические исследования проводили на фронтальных срезах мозга (10 мкм), монтированных на стекла. Для реакций использовали смесь первичных антител мыши к орексину-A (R&Dsystems) с теми же антителами кролика к  $D_1$  или  $5HT_{2C}$  рецепторам, смесь вторичных антител, конъюгированных с флуорохромами (Invitrogen): осли против мыши-Alexa-568 и цыпленка против кролика-Alexa-488, ядерный краситель DAPI. Анализ срезов проводили с помощью конфокального микроскопа DMI6000 с лазерной установкой SP5 II (Leica Microsystems, Германия), использовали лазеры с длиной волны возбуждения 488, 568 нм и 355 нм для DAPI. Изображения анализировали с помощью пакета программ Leica LAS AF, подготовку к демонстрации проводили с помощью программы Photoshop CS3.

**Результаты.** С помощью Вестерн-блоттинга в гипоталамусе показана экспрессия белка рецепторов дофамина  $D_1$  и серотонина  $5HT_{2C}$ . Конфокальная микроскопия подтверждает иммуноэкспрессию  $D_1$  и  $5HT_{2C}$  в телах развивающихся орексиnergических-иммунопозитивных клеток.

**Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что развитие морфофункциональных взаимодействий моноаминергических систем с орексиnergической происходит еще в эмбриональном периоде развития организма.

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН на средства государственного бюджета по госзаданию № АААА-А18-118012290372-7.

***RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUSES FOR THE GENE DELIVERY IN THE FISHES BRAIN***

Puschina E.V.<sup>1</sup>, Alexandrova Y.N.<sup>1</sup>, Varaksin A.A.<sup>1</sup>, Obukhov D.K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia, <sup>2</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

e-mail: puschina@mail.ru

Viral vectors constitute a flexible system that can efficiently deliver an exogenous gene to a variety of target cells and, thus, is a potentially powerful tool for genetic manipulation. To deliver the viral genes, an injection of recombinant adeno-associated viruses was performed according to the Wallace method (Wallace et al., 2008). The use of recombinant adenoviral vectors allows viral particles to diffuse relatively easily from the injection area and quickly reproduce themselves in the brain cells. The work objective was to study the effectiveness of infection of the mammalian viral vectors inside various brain regions of chum salmon *Oncorhynchus keta* aged 2 years old with a short-term (4 and 8 days) and a longer-term (10 weeks) time intervals with subsequent ultrastructural analysis of the nerve tissue in the injection area. It was found that mouse hippocampal adenovirus (AAV1.Camc2a.GCaMP6f.WPRE.bGHpA) incorporated in vivo brains of a chum salmon *Oncorhynchus keta*. Injection of an adenoviral vector into various areas of the brain was made: into the telencephalon, cerebellum, mesencephalic tectum, and tegmentum of *O. keta*, what have induced the expression of the genes reported in pallial (Dd and Dl) regions of the telencephalon, the periventricular region of the mesencephalon and diencephalon, in the dorsal part of the brain stem, and in the cerebellum (valvula and corpus cerebellum) as well. Using fluorescent microscopy and transmission electron microscopy, we have demonstrated that the presence of green fluorescence depends on the injection of an adenoviral vector (labeled with FITS). The data of ultrastructural analysis have confirmed the presence of subcellular viral particles in the cells of the brain of the chum salmon trustworthily and indicate the ability of the mammalian viral vector to be transcribed in the virus-infected cells of the fishes brain.

This work was financially supported by the NSCMB FEB RAS (State contract No. 120k-19 from 11.14.2019).

**COMPARISON OF ADAPTIVE AND GLOBAL BINARIZATION METHODS IN DETERMINING THE BOUNDARY OF DENDRITIC SPINES IN CONFOCAL NEURONAL IMAGES**

Pchitskaya E.I.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

e-mail: [katrincreative@yandex.ru](mailto:katrincreative@yandex.ru)

To determine the boundaries of objects in an image, binarization is used – a process in which an image in grayscale is converted to binary image consisting only of black and white pixels, which allows you to separate the objects of interest from the background for subsequent analysis. In the task of determining the numerical values of the dendritic spines morphological parameters in two-dimensional images, it is necessary to designate a clear boundary of the dendritic membrane protrusions, which will determine the area of calculations. Dendritic spines in confocal images are extremely small objects and vary significantly in the brightness of the pixels that form them. The author compares global and adaptive binarization method on a sample of two-dimensional projections of hippocampal neurons *in vitro* confocal images series after deconvolution. Hippocampal neurons were transfected with a plasmid encoding the mCherry fluorescent protein on the 7th DIV and fixed with a 4% solution of paraformaldehyde in phosphate-buffered saline on the 14-15th DIV. Among the global binarization methods presented in ImageJ software, the best result was demonstrated by the Lee segmentation method based on minimizing the relative (cross) entropy. In local binarization methods, the threshold value is determined for each pixel separately, depending on the intensity of the pixels surrounding it. The value of the gray level in a pixel was calculated as the average of the minimum and maximum values of the gray level inside the sphere, the center of which is located in the considered pixel, with an arbitrarily chosen radius  $r$ . For a comparative assessment of global and local binarization, a multi-scale structural similarity index (MS\_MSSI) between the confocal and binary image was calculated. The average MS\_MSSI for 10 different fragments was  $0.81 \pm 0.02$  for Lee global binarization method and  $0.91 \pm 0.01$  for local binarization method ( $p < 0.001$ ). According to the MS\_MSSI index maps, local binarization performs significantly better than global in cases where the dendritic spine is characterized by an inhomogeneity of intensity, the dendritic spine is small in size and two spines are located in close proximity to each other. Thus, the application of the local method in the task of binarization of images containing such small objects as dendritic spines allows one to achieve better results than global methods.

RFBR grant 18-34-0018319.

**СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ АДАПТИВНОЙ И ГЛОБАЛЬНОЙ  
БИНАРИЗАЦИИ В ЗАДАЧЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРАНИЦЫ ДЕНДРИТНЫХ  
ШИПИКОВ НА КОНФОКАЛЬНЫХ ИЗОБРАЖЕНИЯХ НЕЙРОНОВ**

Пчицкая Е. И.

Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: katrincreative@yandex.ru

Для определения границ объектов на изображении применяется бинаризация – процесс, при котором изображение в градациях серого переводится в черно-белое, что позволяет отделить присутствующие на изображении объекты от фона для последующего анализа. В задаче определения численных значений морфологических параметров дендритных шипиков на двумерных изображениях необходимо обозначить четкую границу мембранного выроста дендрита, которая определит область проведения расчётов. Дендритные шипики на конфокальных изображениях являются крайне малыми объектами и значительно различаются по яркости формирующих их пикселей между собой. Автором было произведено сравнение глобального и адаптивного методов бинаризации изображений на выборке из двумерных проекций серии конфокальных изображений гиппокампальных нейронов *in vitro* после деконволюции. Гиппокампальные нейроны трансфицировались плазмидой, кодирующей флуоресцентный белок mCherry, на 7 день культивирования и фиксировались 4% раствором параформальдегида в фосфатно-солевом буфере на 14-15 день культивирования. Среди глобальных методов бинаризации, представленных в программном обеспечении ImageJ, наилучший результат продемонстрировал метод сегментации Ли, основанный на минимизации относительной (перекрестной) энтропии. В методах локальной бинаризации пороговое значение определяется для каждого пикселя отдельно в зависимости от интенсивности окружающих его пикселей. Значение уровня серого в пикселе рассчитывалось как среднее из минимальных и максимальных значений уровня серого внутри сферы, центр которой находится в рассматриваемом пикселе, с произвольно выбранным радиусом  $r$ . Для сравнительной оценки глобальной и локальной бинаризации был рассчитан мульти-масштабный индекс структурного сходства (MS\_MSSI) между конфокальным изображением и его бинарным образом. Среднее значение MS\_MSSI для 10 различных фрагментов составило  $0,81 \pm 0,02$  в случае применения глобального метода бинаризации Ли и  $0,91 \pm 0,01$  при применении метода локальной бинаризации ( $p < 0,001$ ). Согласно картам индекса MS\_MSSI, локальная бинаризация значительно превосходит глобальную в случаях, когда дендритный шипик характеризуется неоднородностью интенсивности, дендритный шипик имеет малый размер и два шипика располагаются в непосредственной близости друг от друга. Таким образом, применение локального метода в задаче бинаризации таких малых объектов как дендритные шипики, позволяет достичь лучших результатов чем глобальные методы.

Грант РФФИ № 18-34-00183\19.

**ANALYSIS OF THE DISTRIBUTION OF THE MELANOCORTINE RECEPTOR 1 IN THE MOUSE BRAIN STRUCTURES IN OBESITY**

Romanova I.V., Mikhaylova E.V., Mikhrina A.L.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

e-mail: irinaromanova@mail.ru

In mammalian brains, expression of proopiomelanocortin (POMC), a precursor to melanocortin peptides, was detected in neurons of the arcuate hypothalamic nucleus (ARC) and the nucleus of tractus solitaries (NTS). Recently it was shown that in the brain, in addition to melanocortin receptors (MCR) of 3 and 4 types (MCR3/MCR4), MCR type 1 (MCR1) is also expressed, which can participate in anti-inflammatory processes. **The aim** of this study is to analyze the expression of MCR1 in brain structures in obesity, which is accompanied by the development of neuroinflammation. The study was conducted on female C57Bl / 6J mice with diet-induced obesity (DIO). The mice for 16 weeks received high-caloric foods with a high content of fat and sugar.

**Methods:** analysis of gene expression by real-time PCR, coupled with reverse transcription, double fluorescence immunolabeling and confocal microscopy, quantitative analysis of fluorescence images. Immunohistochemical studies were performed on frontal cryo-sections (16  $\mu\text{m}$ ) of the perfused brain which were mounted on glasses. For the reactions a mixture of primary antibodies were used: rabbit to MCR1 (Elabscience) and mouse to POMC (Abcam) or goat to 5-HT (Immunostar), goat to 5-HT and mouse to SDH-B (Abcam) or rabbit to BDNF (Abcam). Mixtures of the corresponding secondary antibodies conjugated with fluorochromes (Invitrogen) were also used: chicken to rabbit-Alexa-488, donkey to mouse-Alexa-568, donkey to goat-Alexa-543. Sections were analyzed using a DMI6000 confocal microscope with a SP5 II laser unit (Leica Microsystems, Germany). Lasers with an excitation wave length of 488 and 543/568 nm were used. Images were analyzed using the Leica LAS AF software; preparations for the demonstration were performed using Photoshop CS3.

**The results** of the studies demonstrate that in the hypothalamus of DIO mice an increase in the level of MCR1 mRNA ( $p < 0.05$ ) is accompanied by an increase in the level MCR1 ( $p < 0.05$ ) in POMC neurons of the arcuate nucleus. Moreover, in the midbrain at the tendency to a decrease in the level of MCR1 mRNA, an increase in the level of the MCR1 ( $p < 0.05$ ) in 5-HT-immunopositive neurons of the dorsal raphe nucleus was obtained. Thus, an increase in the immune-expression of MCR1 in 5-HT midbrain neurons at the decreasing in their serotonin biosynthesis and an increasing in the level of SDHB and BDNF may indicate the protective properties of melanocortins realized via the MCR1-pathway.

The study was carried out using the equipment of the CCU of the IEPHB RAS and was supported by state state assignment № AAAA-A18-118012290372-7 at the expense of the state budget.

**АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕЛАНКОРТИНОВОГО РЕЦЕПТОРА-1 В СТРУКТУРАХ МОЗГА МЫШИ ПРИ ОЖИРЕНИИ**

Романова И.В., Михайлова Е.В., Михрина А.Л.

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

e-mail: irinaromanova@mail.ru

В мозге млекопитающих экспрессия проопиомеланокортина (ПОМК), предшественника меланокортиновых пептидов, выявлена в нейронах аркуатного ядра гипоталамуса (arcuate nucleus - ARC) и ядра одиночного тракта (nucleus tractus solitaries – NTS). Недавно было показано что в мозге, кроме меланокортиновых рецепторов (МКР) 3 и 4 типов (МКР3/МКР4), также экспрессируются и МКР 1-го типа (МКР1), которые могут участвовать в противовоспалительных процессах. Цель настоящего исследования – провести анализ экспрессии МКР1 в структурах мозга при ожирении, которое сопровождается развитием нейровоспаления.

Исследование проведено на самках мыши C57Bl/6J, которых 16 недель содержали на высококалорийной диете (ДИО). Методы: анализ экспрессии генов с помощью ПЦР в реальном времени, сопряженной с обратной транскрипцией, двойное флуоресцентное иммуномечение и конфокальная микроскопия, количественный анализ флуоресцентного изображения. Иммуногистохимические исследования проводили на фронтальных криостатных срезах перфузированного мозга (16 мкм), монтированные на стеклах. Для реакций использовали смесь первичных антител кролика к МКР1 (Elabscience) и мыши к ПОМК (Abcam) или козы к 5-НТ (Immunostar), козы к 5-НТ и мыши к SDH-B (Abcam) или кролика к BDNF (Abcam). Также были использованы смеси соответствующих вторичных антител, конъюгированных с флуорохромами (Invitrogen): цыпленка против кролика-Alexa-488, осла против мыши-Alexa-568, осла против козы- Alexa-543. Анализ срезов проводили с помощью конфокального микроскопа DMI6000 с лазерной установкой SP5 II (Leica Microsystems, Германия), использовали лазеры с длиной волны возбуждения 488 и 543/568 нм. Изображения анализировали с помощью пакета программ Leica LAS AF, подготовку к демонстрации проводили с помощью программы Photoshop CS3.

Результаты исследования демонстрируют, что в гипоталамусе ДИО-мышей увеличение уровня мРНК МКР1 ( $p<0.05$ ) сопровождается увеличением уровня МКР1 ( $p<0.05$ ) в ПОМК-нейронах аркуатного ядра. При этом в среднем мозге на фоне тенденции к снижению уровня мРНК МКР1 выявлено увеличение уровня МКР1 ( $p<0.05$ ) в 5-НТ-иммунопозитивных нейронах дорзального ядра шва. Таким образом, увеличение иммуноэкспрессии МКР1 в 5-НТ-нейронах среднего мозга на фоне уменьшения в них биосинтеза серотонина и увеличения уровня SDHB и BDNF может свидетельствовать о протективных свойствах меланокортинов, реализуемых через МКР1-путь.

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН на средства государственного бюджета по госзаданию № АААА-А18-118012290372-7.

**APPLICATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES TO CHANGE THE PRESYNAPTIC CALCIUM LEVEL IN MOTONEURONS**

Samigullin D.V.<sup>1</sup>, Sibgatullina G.V.<sup>1</sup>, Blohin S.A.<sup>2</sup>, Fedorenko S.V.<sup>3</sup>, Stepanov A.S.<sup>3</sup>, Mustafina A.R.<sup>3</sup>, Petrov K.A.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of the Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia, <sup>2</sup> A.N. Tupolev Kazan National Research Technical University, 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

The development of nanoparticles (NPs) capable to exert controlled effect on the cell activity is an important area of biomedical research. Particularly promising are the studies related to the development and study of ferromagnetic NPs whose properties can be controlled using magnetic fields.

The present study is performed on NPs synthesized in Arbuzov IOPC FRC Kazan Scientific Center of RAS. These NPs have a core of iron oxide coated with a silicon shell. The presence of a fluorescent label [Ru (dipy) 3]<sup>2+</sup> allows to control the penetration of NPs into cells and monitor their movement in a magnetic field. We analyzed the internalization of NPs in motor neurons, as well as measured the movement of NPs inside cells and assessed the possibility of triggering the entry of Ca<sup>2+</sup> into cells under the influence of a constant magnetic field.

The experiments were carried out on cultures of motor neurons obtained from newborn rat pups. Addition of NPs to the culture medium at a final concentration of 20 µg / ml was performed 48 h after cell planting. The incubation time was 24 hours. Fluorescence of Fluo3 AM calcium dye was recorded in cells using a Leica SP5 TCS microscope using an HCX PL APO CS 40.0x1.25 objective. Relative changes in the dye intensity were evaluated as:  $\Delta F / F_0 * 100\%$ , where  $\Delta F$  is the increase in fluorescence intensity during magnetic stimulation,  $F_0$  is the initial fluorescence intensity, observed without stimulation. The NPs were stimulated with a constant magnetic field induced by the placement of a neodymium magnet (14 mm in diameter and 5 mm thick) at the bottom of the petri dish with a cover glass with cells.

It was found that the internalization level was already 96% 1 hour after the addition of NPs to the cell culture medium. After 24 hours of incubation, almost 100% internalization was observed.

The movement of NPs inside the cells was observed under the influence of a magnetic field. Assessment of the relative fluorescence of calcium dye revealed a 4.5-fold increase in  $\Delta F / F_0$ , which indicates an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> level during magnetic stimulation. The removal of the magnetic field returned the fluorescence intensity to the initial level during 15 min.

Thus, synthesized NPs with a fluorescent label are a promising tool in biomedical research allowing the control of intracellular Ca<sup>2+</sup> level remotely causing the movement of NPs inside the cytoplasm by magnetic stimulation of the sample.

This work was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research 19-04-00490 A. The study was carried out on the equipment of the CSF-SAC FRC KSC RAS.

**ПРИМЕНЕНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ИЗМЕНЕНИЯ ПРЕСИНАПТИЧЕСКОГО УРОВНЯ КАЛЬЦИЯ В МОТОНЕЙРОНАХ**

Самигуллин Д.В.<sup>1</sup>, Сибгатуллина Г.В.<sup>1</sup>, Блохин С.Д.<sup>2</sup>, Федоренко С.В.<sup>3</sup>,  
Степанов А.С.<sup>3</sup>, Мустафина А.Р.<sup>3</sup>, Петров К.А.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный  
исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань,  
Россия, <sup>2</sup> Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н.  
Туполева, Казань, 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

Создание наночастиц (НЧ), способных оказывать контролируемое влияние на активность клеток, является важным направлением биомедицинских исследований. Особенно перспективными являются исследования, связанные с разработкой и изучением ферромагнитных НЧ, свойствами которых можно не инвазивно управлять при помощи магнитных полей.

В настоящем исследовании использовали НЧ, синтезированные в институте ИОФХ им. Арбузова. Данные НЧ имеют ядро, состоящее из оксида железа, покрытое кремниевой оболочкой. Наличие флуоресцентной метки  $[\text{Ru}(\text{dipy})^3]^{2+}$  позволяет контролировать проникновение НЧ в клетки и следить за их перемещением в магнитном поле. Мы анализировали интернализацию НЧ в мотонейроны, а также измерили перемещение НЧ внутри клеток и оценили возможность запуска входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетки под действием постоянного магнитного поля.

Эксперименты проводили на культурах мотонейронов, полученных из новорожденных крысят. Добавление НЧ в среду культивирования в конечной концентрации 20 мкг/мл производили через 48 ч после высадки клеток. Время инкубации составило 24 ч. Регистрацию флуоресценции кальциевого красителя Fluo3 AM в клетках проводили на микроскопе Leica SP5 TCS, используя объектив HCX PL APO CS 40.0x1.25. Относительные изменения интенсивности красителя оценивали как:  $\Delta F / F_0 * 100\%$ , где  $\Delta F$  - увеличение интенсивности флуоресценции при магнитной стимуляции,  $F_0$  - начальная интенсивность флуоресценции, контролируемая без стимуляции. Стимуляцию НЧ проводили постоянным магнитным полем, индуцированным размещением неодимового магнита (диаметром 14 мм и толщиной 5 мм) на дне чашки с покровным стеклом с клетками.

Установлено, что уже через 1 ч после добавления НЧ в среду культивирования клеток уровень интернализации составит 96%. Через 24 ч инкубации наблюдали практически 100% интернализацию.

Было выявлено перемещение НЧ внутри клеток под действием магнитного поля. Оценка относительной флуоресценции кальциевого красителя выявила увеличение  $\Delta F / F_0$  в 4,5 раза, что указывает на увеличение внутриклеточного уровня  $\text{Ca}^{2+}$  при магнитной стимуляции. Снятие магнитного поля возвращало уровень флуоресценции к исходному в течение 15 мин.

Таким образом, синтезированные НЧ с флуоресцентной меткой являются перспективным инструментом в биомедицинских исследованиях, позволяющим контролировать внутриклеточный уровень  $\text{Ca}^{2+}$  дистанционно вызывая перемещение НЧ внутри цитоплазмы клетки магнитной стимуляцией образца.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-04-00490 А. и выполнена с использованием оборудования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН



**INVESTIGATION OF EXPRESSION OF THE SEROTONIN BIOSYNTHESIS ENZYME IN MICE HYPOTHALAMIC NEURONS IN DIET-INDUCED OBESITY**

Sviridova D.L., Mikhaylova E.V., Romanova I.V.  
Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian  
Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

e-mail: [dasha\\_sv@inbox.ru](mailto:dasha_sv@inbox.ru)

**Introduction.** Serotonin is the most important neurotransmitter involved in the control of different functions in the mammals and humans brain. Dysfunctions of the serotonin biosynthesis in the brain is the cause of various diseases, in particular obesity and metabolic disorders. Tryptophanhydroxylase-2 (TPH2) - the rate-limiting enzyme of serotonin biosynthesis in the brain - is a marker of serotonergic neurons. The main source of serotonin in the brain is the neurons of the raphe nuclei (Rn) of the midbrain, in which TPH2 expression occurs. Neurons of the Rn innervate, in particular, the structures of the hypothalamus. **The aim of the study** was to evaluate the expression and distribution of TPH2 in the structures of the midbrain and hypothalamus in diet-induced obesity (DIO). In the study a C57BL / 6J mice were used which for 16 weeks received high-caloric foods with a high content of fat and sugar.

**Methods:** analysis of gene expression using real-time PCR, coupled with reverse transcription, double fluorescence immunolabeling and confocal microscopy. Immunohistochemical studies were made on frontal brain sections (16  $\mu$ m) from the hypothalamic area, fixed on glass. For the reactions a mixture of primary rabbit antibodies to TPH2 (Millipore) with mouse antibodies to proopiomelanocortin (Abcam), or to orexin-A (R&Dsystems), or vasopressin, or the GABA biosynthesis enzyme GAD65 (Abcam), or the catecholamine biosynthesis enzyme tyrosine hydroxylase (Sigma). Also a mixture of secondary antibodies conjugated with fluorochromes (Invitrogen): chicken to rabbit-Alexa-488 and donkey to mouse-Alexa-568 and nuclear colorant DAPI were used. Sections were analyzed using a DMI6000 confocal microscope with a SP5 II laser unit (Leica Microsystems, Germany). Lasers with an excitation wave length of 488, 568 nm and 355 nm for DAPI were used. Images were analyzed using the Leica LAS AF software; preparations for the demonstration were performed using Photoshop CS3.

PCR **results** indicate a decrease of the TPH2 mRNA level in the midbrain ( $p < 0.05$ ), but no significant changes in TPH2 mRNA were detected in the hypothalamus. The results of confocal microscopy demonstrate in different types of hypothalamic neurons a very insignificant level of TPH2 immuno-expression in control mice and a significant increase in its level in DIO-mice.

**Conclusions.** The obtained data indicate that hypothalamic neurons can express TPH2, which, apparently, is a compensatory mechanism in serotonin deficiency in the brain.

The study was carried out using the equipment of the CCU of the IEPHB RAS and was supported by state state assignment No. AAAA-A18-118012290372-7 at the expense of the state budget.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ФЕРМЕНТА БИОСИНТЕЗА  
СЕРТОНИНА В НЕЙРОНАХ ГИПОТАЛАМУСА МЫШЕЙ ПРИ ДИЕТА-  
ИНДУЦИРОВАННОМ ОЖИРЕНИИ**

Свиридова Д.Л., Михайлова Е.В., Романова И.В.

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

e-mail: [dasha\\_sv@inbox.ru](mailto:dasha_sv@inbox.ru)

**Введение.** Серотонин – важнейший нейротрансмиттер, вовлеченный в мозге млекопитающих и человека в контроль различных функций. Нарушение биосинтеза серотонина в мозге является причиной различных заболеваний, в частности ожирения и метаболических расстройств. Триптофангидроксилаза-2 (ТПГ2) – скорость лимитирующий фермент биосинтеза серотонина в мозге – общепризнанный маркер серотонинергический нейронов. Основным источником серотонина в мозге являются нейроны ядер шва (*raphe nuclei* – Rn) среднего мозга, в которых происходит экспрессия ТПГ2. Нейроны Rn иннервируют, в частности, структуры гипоталамуса. **Цель исследования** – оценить экспрессию и распределение ТПГ2 в структурах среднего мозга и гипоталамуса при диета-индуцированном (ДИО) ожирении. Исследование проведено на мышах C57BL/6J, которые в течение 16-ти недель получали высококалорийную пищу с повышенным содержанием жира и сахара.

**Методы.** анализ экспрессии генов с помощью ПЦР в реальном времени, сопряженной с обратной транскрипцией, двойное флуоресцентное иммуномечение и конфокальная микроскопия. Иммуногистохимические исследования проводили на фронтальных срезах мозга (16 мкм) из области гипоталамуса, монтированных на стекла. Для реакций использовали смесь первичных антител кролика к ТПГ2 (Millipore) с антителами мыши к проопиомеланокортину (ПОМК, Abcam), или орексину-А (R&Dsystems), или вазопрессину, или ферменту биосинтеза ГАМК GAD65 (Abcam), или ферменту биосинтеза катехоламинов тирозингидроксилазе (ТГ, Sigma). Также использована смесь вторичных антител, конъюгированных с флуорохромами (Invitrogen): цыпленка против кролика-Alexa-488 и осла против мыши-Alexa-568, ядерный краситель DAPI. Анализ срезов проводили с помощью конфокального микроскопа DM16000 с лазерной установкой SP5 II (Leica Microsystems, Германия), использовали лазеры с длиной волны возбуждения 488, 568 нм и 355 нм для DAPI. Изображения анализировали с помощью пакета программ Leica LAS AF, подготовку к демонстрации проводили с помощью программы Photoshop CS3. **Результаты** ПЦР свидетельствуют об уменьшении в среднем мозге уровня мРНК ТПГ2 ( $p < 0.05$ ), однако в гипоталамусе не выявлено достоверных изменений уровня мРНК ТПГ2. Результаты конфокальной микроскопии демонстрируют в нейронах гипоталамуса различной эргичности очень незначительный уровень иммуоэкспрессии ТПГ2 у контрольных мышей и значительное увеличение ее уровня при ДИО.

**Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о том, что нейроны гипоталамуса могут экспрессировать ТПГ2, что, по-видимому, является компенсаторным механизмом при дефиците серотонина в мозге.

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН на средства государственного бюджета по госзаданию № АААА-А18-118012290372-7.

***AMITRIPTYLINE AND DESIPRAMINE MODULATE DESENSITIZATION OF  
NMDA RECEPTORS AND INTRACELLULAR CALCIUM RESPONSES OF  
CORTICAL NEURONS***

Sibarov D.A., Boikov S.I., Stepanenko Y.D., Karelina T.V., Antonov S.M.  
Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian  
Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

e-mail: dsibarov@iephb.ru

Tricyclic antidepressants like amitriptyline (ATL) or desipramine (DES) are commonly used in the clinic. However, ATL and DES have multiple molecular targets, which complicates an explanation of their therapeutic effects. Recently we have shown ATL to enhance Ca<sup>2+</sup> dependent desensitization of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) in clinically relevant concentrations (<10 μM) while direct channel block of NMDARs occurs at ten-fold higher levels.

Here in the model of primary culture of rat cortical neurons, we used Ca<sup>2+</sup>-sensitive dye and optical imaging to monitor intracellular Ca<sup>2+</sup> responses of neurons to NMDA applications alone and in the presence of different ATL and DES concentrations.

We show that both ATL and DES inhibit NMDA elicited Ca<sup>2+</sup> entry into neurons at therapeutic concentrations. We also report that ATL and DES can induce their Ca<sup>2+</sup> responses, which depend on IP<sub>3</sub>-, but not ryanodine-dependent Ca<sup>2+</sup> release from intracellular depots.

Thus, we describe here the modulation by tricyclic antidepressants of glutamate excitatory synaptic transmission and intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics, which considerably interferes with many Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanisms in neurons.

RSF 16-15-10192

**EMBEDDING AN ADENO-ASSOCIATED VIRUS IN THE CELLS OF  
CEREBELLUM OF THE JUVENILE *ONCORHYNCHUS KETA***

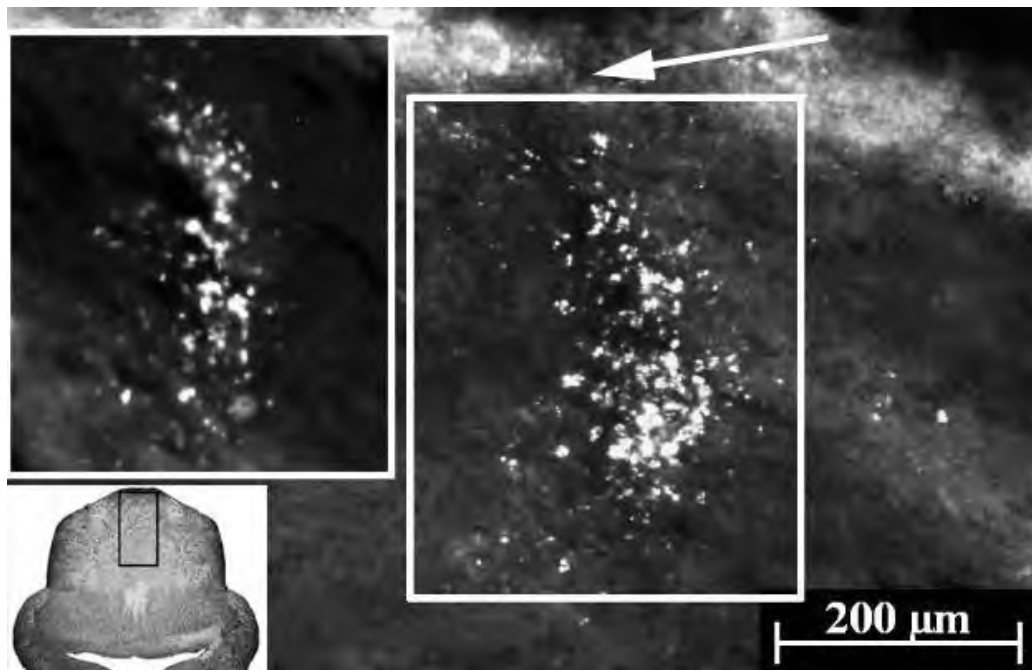
Stukaneva M.E.

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch,  
Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

e-mail: Stykanyova@mail.ru

Currently, the incorporation of specific recombinant adeno-associated virus (Ads) into the cells of the brain of mammals and birds is being actively studied, but there is little information about the possibility of infection of nerve cells in the brain of teleosts fish. The aim of this work was to study the possibility of incorporation Ads into the cerebellar cells of juvenile *Oncorhynchus keta*. For 5 juveniles *O. keta* were administered Ads by long-term exposure for a month by intracerebellar injection. Further research was performed on frozen sections of the brain. Our results demonstrate that Ads does not spread evenly throughout the cerebellum, but can penetrate areas distant from the injection. The largest number of intensive labeled cells was found in the granular layer, but individual cells were detected in the molecular layer. An extensive gradient distribution of Ads was found, in the central part of the injection there was the highest concentration of cells, as it moved away diffusely decreasing. At the periphery of the puncture, intensely labeled granules were detected in large numbers. We suggest that the virus integrates into various types of cells. In the dorsal matrix zone, Ads was embedded in cells at an early stage of proliferation. Outside the matrix zones, large cells intensively labeled were at late proliferation stage. A high concentration of labeled cells indicates that the cells of the cerebellum of juvenile *O. keta* contain receptors with a high degree of affinity for Ads and it is able to infect them.

This work was financially supported by the NSCMB FEB RAS (state contract No. 120k-19 dated 11/14/2019).



**Fig. 1.** Ads-labeled cells in the cerebellum of juvenile *O. keta* are indicated by a white inset, the arrow - zone of Ads injection

**Рис. 1.** Маркированные Ads клетки в мозжечке молоди кеты обозначены белой врезкой, стрелкой - место инъекции аденовируса.

### **ВСТРАИВАНИЕ АДЕНО-АССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА В КЛЕТКИ МОЗЖЕЧКА МОЛОДИ КЕТЫ *ONCORHYNCHUS KETA***

Стуканёва М. Е.

Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, Владивосток,  
Россия

e-mail: Stykanyova@mail.ru

В настоящее время активно исследуется встраивание специфического рекомбинантного адено-ассоциированного вируса (Ads) в клетки головного мозга млекопитающих и птиц, но существует мало сведений о возможности инфицирования нервных клеток головного мозга костистых рыб. Целью данной работы было исследование возможности встраивания Ads в клетки мозжечка молоди кеты *Oncorhynchus keta*. На 5 годовалых особей молоди кеты осуществляли введение Ads при долговременной экспозиции в течение месяца путем интрацеребеллярной инъекции. Дальнейшее исследование проводили на замороженных срезах мозга. Наши результаты показывают, что Ads не распространяется равномерно по мозжечку, но может проникать в области, удаленные от зоны инъекции. Наибольшее количество интенсивно маркированных клеток было обнаружено в гранулярном слое, но отдельные клетки были выявлены и в молекулярном слое. При встраивании Ads в структуры мозжечка было установлено обширное градиентное распределение, так наибольшая концентрация клеток была характерна для центральной части прокола и по мере удаления от него диффузно снижалась. На периферии прокола в большом количестве были выявлены гранулы. Мы предполагаем, что вирус интегрируется в различные типы клеток. В дорсальной матричной зоне Ads встраивался в клетки на ранней стадии пролиферации. Вне матричных зон, крупные клетки, интенсивно маркированные вирусом, находились на поздней стадии пролиферации. Высокая концентрация маркированных клеток свидетельствует о том, что в мозжечке молоди кеты *O. keta* клетки содержат рецепторы с высокой степенью сродства к Ads и он способен инфицировать их.

Работа выполнена при финансовой поддержке ННЦМБ ДВО РАН  
(госконтракт № 120к-19 от 14.11.2019).

***PRENATAL HYPOXIA DISTURBS THE FORMATION OF PYRAMIDAL NEURONS IN THE ENTORHINAL CORTEX OF THE RAT BRAIN, ACCORDING TO THE DATA OF CONFOCAL AND ELECTRON MICROSCOPY***

Vasil'ev D.S.<sup>1</sup>, Tumanova N.L.<sup>1</sup>, Kalinina D.S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia, <sup>2</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

e-mail: dvasilyev@bk.ru

Prenatal hypoxia disturbs the formation of the brain, which leads to the development of cognitive deficit. The probable causes of this deficiency may be associated with impaired functioning of the dorsal hippocampus as well as the cortical areas involved in its afferentation, in particular the entorhinal cortex, projection neurons of which innervate the CA1 field. This study was performed to analyze the effect of prenatal hypoxia on the population of pyramidal neurons of the entorhinal cortex in early rat ontogenesis.

**Methods:** Female Wistar rats were subjected to hypoxia on day 14 of pregnancy (7% O<sub>2</sub>, 3 hours). The neuroblasts formed in embryos at the time of hypoxia were labeled by 3'-ethynyl-5-deoxyurenedine. The number of labeled cells and their location in the entorhinal cortex was analyzed in 5-day old rat pups using a Leica DMR microscope equipped with a Leica TCS SL confocal scanner. Using the indirect immunofluorescence method, the Fox3 neuronal marker was stained, expressed only in living, normally functioning neurons. The excitation of Alexa488 and FITC fluorochromes was caused by the light of an Ar / He laser at a wavelength of 488 nm, fluorescence was observed in the range of 496-537 nm. Electron microscopy was performed on FEI Tecnai V2 (FEI, USA) transmission electron microscope.

**Results:** It was shown that hypoxia disturbed the formation and migration of neuroblasts into the lower layers of the entorhinal cortex, but did not affect the formation of a population of inhibitory interneurons. In the first month of postnatal ontogenesis in the entorhinal cortex of "hypoxic" pups, the number of Fox3-positive neurons with elongated bodies decreased, which indicates the death of projection pyramidal neurons. Electron microscopy also revealed degenerative changes in the neurons of the entorhinal cortex in rat pups during the first month after birth (lysis of organelles or hyperchromatosis).

Thus it was shown that prenatal hypoxia at E14 lead to impaired radial migration of neuroblasts in the entorhinal cortex, increased elimination of projection neurons in early postnatal ontogenesis, causing impaired afferentation of hippocampal neurons. The selective effect of prenatal hypoxia on the population of exciting neurons of the cerebral cortex can lead to some disturbance in the balance of the processes of excitation and inhibition in the further development.

Russian state budget assignment -18-118012290373-7, RFBR Grant 18-315-00239.

Confocal and electron microscopy were performed in the Center for the physiological, biochemical and molecular-biological research of IEPHB RAS. The authors thank N.M. Dubrovskaya and O.S. Alekseeva for help in creating hypoxic conditions.

**ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ ПРИВОДИТ К НАРУШЕНИЮ  
ФОРМИРОВАНИЯ ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ ЭНТОРИНАЛЬНОЙ  
КОРЫ МОЗГА КРЫС СОГЛАСНО РЕЗУЛЬТАТАМ КОНФОКАЛЬНОЙ И  
ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

Васильев Д. С.<sup>1</sup>, Туманова Н.Л.<sup>1</sup>, Калинина Д.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия, <sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

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

Пренатальная гипоксия нарушает формирование головного мозга, что приводит к развитию когнитивного дефицита. Вероятные причины такого дефицита могут быть связаны с нарушением функционирования дорсального гиппокампа и областей новой коры, участвующих в его афферентации, в частности энторинальной коры, проекционные нейроны которой иннервируют поле CA1. Целью настоящего исследования являлась оценка влияния пренатальной гипоксии на популяцию пирамидных нейронов энторинальной коры в раннем онтогенезе крыс.

**Материалы и методы:** Самок крыс линии Вистар подвергали действию гипоксии на 14 день беременности (7% O<sub>2</sub>, 3 часа). Было проведено прижизненное мечение 3'-этинил-5-дезоксиредином нейробластов, образующихся у эмбрионов в момент действия гипоксии. Количество и расположение меченых клеток в энторинальной коре 5-суточных крысят анализировали на микроскопе Leica DMR, оборудованном конфокальным сканером Leica TCS SL. При помощи непрямого иммунофлуоресцентного метода окрашивали нейрональный маркер Fox3, экспрессирующийся только в живых, нормально функционирующих нейронах. Возбуждение флюорохромов Alexa488 и FITC было вызвано светом Ar/He лазера при длине волны 488 нм, флюоресценцию наблюдали в диапазоне 496-537 нм. Электронная микроскопия выполнена на просвечивающем микроскопе FEI Tecnai V2 (FEI, USA).

**Результаты исследования:** Было показано, что гипоксия нарушала образование и миграцию нейробластов в нижние слои энторинальной коры, но не влияла на образование популяции тормозных интернейронов. В первый месяц постнатального онтогенеза в энторинальной коре у «гипоксических» крысят происходило снижение количества Fox3-позитивных нейронов с удлинёнными телами, что свидетельствует о гибели проекционных пирамидных нейронов. Электронная микроскопия выявила дегенеративные изменения нейронов энторинальной коры крысят в первый месяц после рождения (лизис органелл в цитоплазме или гиперхроматоз).

Выяснено, что пренатальная гипоксия на E14 может приводить к нарушению радиальной миграции нейробластов в энторинальной коре, усилению элиминации проекционных нейронов в раннем постнатальном онтогенезе, вызывающей нарушение афферентации гиппокампальных нейронов. Избирательное действие пренатальной гипоксии на популяцию возбуждающих нейронов коры головного мозга может приводить к нарушению баланса процессов возбуждения и торможения в ходе дальнейшего развития.

Госзадание АААА-А18-118012290373-7, РФФИ 18-315-00239.

Конфокальная и электронная микроскопия выполнены на базе Центра коллективного пользования ИЭФБ РАН. Авторы благодарят Н.М. Дубровскую и О.С. Алексееву за помощь в создании гипоксических условий.

**IDENTIFICATION OF MECHANISMS OF COGNITIVE IMPAIRMENT IN MICE IN THE MODEL OF DIABETES MELLITUS**

Yarmiev I.Z., Yakovleva O.V.  
Kazan Federal University, Kazan, Russia

e-mail: yarmiev82@gmail.com

Diabetes mellitus (DM) is an endocrine disease characterized by a lack of the hormone insulin and an increase in blood glucose levels, causing functional and morphological changes in tissues and organs.

There are more evidences of the negative effects of type 1 diabetes on the central nervous system, and cognitive functions: speed disorders in analyzing information, attention and memory. One of the pathological mechanisms of the effect of hyperglycemia on the performance of the nervous system is a violation of the antioxidant system. The aim of our project is to study the cognitive functions and oxidative stress of mice in the alloxan model of diabetes.

DM has been caused by alloxan administration (200 mg/kg), which performed by studies on the 42-45th day after injection. Cognitive functions have been evaluated using tests: New Object, T-Maze and Morris Maze. The evaluation of oxidative stress level by the concentration of Malondialdehyde and the activity of GP in the brain.

A morphological study of the pancreas showed a decrease in the number of insulin-positive cells in the Pancreatic islets to 65%.

Studying the work memory in mice with diabetes, the ratio of time an animal spends researching a new object was lower ( $1.4 \pm 0.2\%$ ,  $n = 20$ ,  $p \leq 0.05$ ) than the control ( $2.2 \pm 0.1\%$ ,  $n = 30$ ). Mice with diabetes did not show spatial memory impairment in the T-Maze test. In the Morris Maze test, the percentage of trained mice with diabetes was lower than in the control group (89%). Mice with diabetes spent more time finding a hidden platform. When studying cross sections of the lumbar spinal cord in mice with this model, a decrease in the area of both the whole section and the relationships of gray and white matter was observed.

This suggested that hyperglycemia causes a decrease in memory's work and learning ability due to neuronal death caused by oxidative stress. Indeed, mice with diabetes performed an increase in the concentration of MDA in brain homogenates to  $0.30 \pm 0.03 \mu\text{mol}$  ( $n = 12$ ,  $p < 0.05$ ) relative to the control ( $0.21 \pm 0.02 \mu\text{mol}$ ). The study of GP activity showed that the enzyme activity in the brain homogenates of control mice was  $0.47 \pm 0.07 \mu\text{M} / \text{ml} / \text{min}$  ( $n = 24$ ). In animals with a model of diabetes, a decrease in the activity of GP observed to  $0.28 \pm 0.05 \mu\text{M} / \text{ml} / \text{min}$  ( $n = 21$ ,  $p < 0.05$ ).

Studying of cross sections of the lumbar spinal cord in mice with a model of diabetes, a significant decrease in the area of both the whole section and the ratio of gray and white matter was observed.

Thus, modeling process of diabetes, there is an imbalance between prooxidants and the antioxidant system, which leads not only to disorders in the PNS, but also to a decrease in the amount of gray matter in the central nervous system and, as a result, cognitive impairment.



**ВЫЯВЛЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ НАРУШЕНИЯ КОГНИТИВНЫХ  
ФУНКЦИЙ У МЫШЕЙ В МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА**

Ярмиев И.З., Яковлева О.В.

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

e-mail: yarmiev82@gmail.com

Сахарный диабет (СД) – эндокринное заболевание, характеризуется недостатком гормона инсулина и повышением уровня глюкозы в крови, вызывающие функциональные и морфологические изменения в тканях и органах. Появляется все больше и больше доказательств неблагоприятного воздействия СД 1 типа на ЦНС и когнитивные функции: нарушение скорости обработки данных, внимания, памяти. Одним из патологических механизмов влияния гипергликемии на работоспособность нервной системы является нарушение антиоксидантной системы. Целью нашей работы было изучение когнитивных функций и исследование оксидативного стресса мышей при аллоксановой модели СД.

СД был вызван применением аллоксана (200 мг/кг), все исследования проводилина 42-45-й день после инъекции. Когнитивные функции оценивались с помощью тестов: Новый объект, Т-лабиринт и лабиринт Морриса. Уровень окислительного стресса оценивали по концентрации МДА и активности ГП в мозге. Морфологическое исследование поджелудочной железы показало снижение количества инсулин-положительных клеток в островках до 65%.

При изучении рабочей памяти у мышей с СД соотношение времени, которое животное тратит на исследование нового объекта, относительно старого было ниже ( $1.4 \pm 0.2\%$ ,  $n=20$ ,  $p \leq 0,05$ ) чем у контроля ( $2.2 \pm 0.1\%$ ,  $n=30$ ). Мыши с СД не продемонстрировали нарушения пространственной памяти в тесте Т-лабиринт. В тесте «лабиринт Морриса» процент обученных мышей с СД был ниже, чем в контрольной группе. Мыши с СД тратили больше времени на поиск скрытой платформы. При исследовании поперечных срезов поясничного отдела спинного мозга мышей с моделью СД наблюдалось уменьшение площади как целого среза, так и соотношения серого и белого вещества.

Это наводило на мысль о том, что гипергликемия вызывает снижение рабочей памяти и способности к обучению из-за гибели нейронов, вызванной окислительным стрессом. Действительно у СД мышей наблюдалось увеличение концентрации МДА в гомогенатах мозга до  $0.30 \pm 0.03$  мкмоль ( $n=12$ ,  $p < 0,05$ ) относительно контроля ( $0.21 \pm 0.02$  мкмоль). Исследование активности ГП показало, что в гомогенатах мозга животных с моделью СД наблюдалось снижение активности ГП ( $0.28 \pm 0.05$  мкМ/мл/мин,  $n=21$ ,  $p < 0,05$ ) относительно контрольных мышей ( $0.47 \pm 0.07$  мкМ/мл/мин,  $n=24$ ).

Таким образом, при моделировании СД наблюдается нарушение баланса между прооксидантами и антиоксидантной системой, что ведет к не только нарушениям в ПНС, но и снижению количества серого вещества в ЦНС и как следствие когнитивным нарушениям.

***NEURO-IMMUNE RESPONSE TO THE INJECTION ADENOVIRUS IN THE  
TELENCEPHALON OF THE JUVENILE CHUM SALMON ONCORHYNCHUS  
KETA***

Zharikova E.I.

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch,  
Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

e-mail: eva\_1213@mail.ru

A study of the properties of adenoviral vectors, in particular, the determination of the optimal time interval for creating genetic constructions in the brain of salmon fish, has not been previously conducted. The aim of this work was to study the fate of the adenovirus vector (AAV) associated with the hippocampus of mice in the chum salmon telencephalon during long-term exposure. The virus was introduced into the region of the right dorsal quadrant of the brain of a year-old chum salmon, after which the chum juveniles were kept under standard conditions for twelve weeks. As a result of the study, a group of AAV-labeled cells was identified in the ventral part of the subpallial zone of the telencephalon. In the dorsal part of the telencephalon and periventricular region, a few distinct FITS-labeled fragments were detected in severally located cells or their small clusters. In the central zone of the telencephalon, areas of hypervascularization with abundant heterogeneous cellular elements and dilated lacunae of blood vessels containing heterogeneous cellular material indicating an immune response were detected. The distribution pattern of AAV-labeled particles is heterogeneous and residual, cell labeling is weak, which differs significantly from the results of short-term incubation of the vector in chum salmon cells. No AAV-labeled cells were detected in the area of virus injection, but characteristic signs of a terminating reparative process were present. Thus, as a result of long-term incubation of an adenoviral vector in the telencephalon of chum salmon, traces of neuro-immune interactions were revealed, the results of which were the resorption of the viral labeling, with the preservation of individual subcellular FITS-labeled fragments. The data obtained indicate the presence of an immune response in the brain of chum salmon, which suppresses the spread of the adenoviral vector during long-term incubation.

This work was financially supported by the NSCMB FEB RAS (state contract № 120k-19 dated 11/14/2019).

***НЕЙРОИМУННЫЙ ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ АДЕНОВИРУСА В  
КОНЕЧНОМ МОЗГЕ МОЛОДИ КЕТЫ (ONCORHYNCHUS KETA)***

Жарикова Е. И.

Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, Владивосток,  
Россия

e-mail: eva\_1213@mail.ru

Возможность использования аденовирусов в качестве маркера нейрональных клеток для генетических манипуляций на различных моделях животных в настоящее время активно исследуется. Однако, мало известно о нейро-иммунных взаимоотношениях клеток, инфицированных аденовирусным вектором и их дальнейшей судьбе в мозге животного. Исследование свойств аденовирусных векторов, в частности определение оптимального временного интервала для создания генетических конструкций в мозге лососевых рыб ранее не проводилось. Целью настоящей работы было исследование судьбы аденовирусного вектора (AAV) ассоциированного к гиппокампу мышей в конечном мозге кеты при долгосрочной экспозиции. Вирус был введен в область правого дорсального квадранта конечного мозга годовалой кеты, после чего молодь кеты содержали в стандартных условиях в течение двенадцати недель. В результате проведенного исследования группа AAV-маркированных клеток была выявлена в вентральной части субпаллиальной зоны теленцефалона. В дорсальной части теленцефалона и перивентрикулярной области были выявлены отдельные немногочисленные FITS-маркированные фрагменты в отдельно расположенных клетках или их небольших скоплениях. В центральной зоне теленцефалона были обнаружены участки гипертангенизации с обильными гетерогенными клеточными элементами и расширенными лакунами кровеносных сосудов, содержащие гетерогенный клеточный материал, свидетельствующие об иммунном ответе. Характер распределения AAV-маркированных частиц неоднородный и остаточный, маркирование клеток слабое, что значительно отличается от результатов краткосрочного инкубирования вектора в клетках мозга кеты. В области введения вируса AAV-маркированные клетки выявлены не были, но присутствовали характерные признаки завершающегося репаративного процесса. Таким образом, результате долговременной инкубации аденовирусного вектора в конечном мозге молоди кеты были выявлены следы нейро-иммунных взаимодействий, результатами которых стало резорбция вирусной метки, с сохранением отдельных субклеточных FITS-маркированных фрагментов. Полученные данные свидетельствуют о наличии иммунного ответа в мозге кеты, подавляющего распространение аденовирусного вектора при долговременной инкубации.

Госконтракт № 120к-19 от 11/14/2019.

**ACTIVATION OF PRESYNAPTIC 2-ADRENERGIC RECEPTORS MODIFIES  
THE ENTRY OF CALCIUM IONS INTO THE MOUSE MOTOR NERVE  
ENDING IN RESPONSE TO A NERVE STIMULUS**

Zhilyakov N.V., Arkhipov A.Yu., Bukharaeva E.A.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of the Kazan Scientific Center of the  
Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

e-mail: kiosak71@gmail.com

The entry of calcium ions into the motor nerve ending is an important stage of intercellular signaling that triggers the process of exocytosis of synaptic vesicles containing neurotransmitter, and thus provides the process of signal transmission from motor neuron to the muscle. In the last decade, the number of studies demonstrating tight contacts between nerve endings of sympathetic neurons with neuromuscular synapses, as well as the effects of adrenergic agents on the secretion of acetylcholine from motor nerve endings has increased significantly. However, the mechanisms of the presynaptic action of compounds activating adrenoreceptors are still unknown. There is reason to believe that it may be associated with a functioning of calcium channels, which ensure the calcium ions entry into the nerve ending in response to a stimulus. In this regard, the aim of this study was to investigate the effect of specific agonist of  $\alpha$ 2-adrenergic receptor (A2AR), dexmedetomidine on calcium transient in the mouse motor nerve endings. Calcium transient was estimated as the change in the fluorescence intensity of specific calcium-sensitive dye Oregon Green 488 BAPTA-1, loaded into the nerve ending, in response to calcium ions influx during stimulation of the motor nerve. The study was performed on the isolated mouse neuromuscular preparations of m. Levator auris longus. The fluorescence response was recorded by a Neuro CCD SMQ (Redshirt Imaging) high-speed camera under control conditions and after adrenergic agents exposure. Activation of A2AR with dexmedetomidine at a concentration of 10  $\mu$ M caused a significant decrease in the amplitude of the calcium transient by  $12.4 \pm 2.8\%$  ( $n = 11$ ,  $p < 0.05$ , 5 animals) compared to control conditions. In contrast, the specific A2AR inhibitor SKF-86466 at concentration of 10  $\mu$ M, increased the amplitude of the calcium response by  $16.7 \pm 3.1\%$  ( $n = 24$ ,  $p < 0.05$ , 5 animals) compared to control. After the action of the inhibitor, A2AR activation with dexmedetomidine did not alter the amplitude of the calcium transient. The data obtained evidencing the changes in the fluorescence intensity of calcium dye in response to a nerve stimuli indicate that presynaptic A2ARs may affect calcium ions entry into the motor nerve ending in the mouse neuromuscular synapse.

This work was supported by a grant of Russian Science Foundation № 18-15-00046.

**АКТИВАЦИЯ ПРЕСИНАПТИЧЕСКИХ A2-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ  
ИЗМЕНЯЕТ ВХОД ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ДВИГАТЕЛЬНЫЕ НЕРВНЫЕ  
ОКОНЧАНИЯ МЫШИ В ОТВЕТ НА НЕРВНЫЙ СТИМУЛ**

Жиляков Н.В., Архипов А.Ю., Бухараева Э.А.

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия

e-mail: kiosak71@gmail.com

Вход ионов кальция в двигательное нервное окончание является важным звеном, запускающим процесс экзоцитоза синаптических везикул, содержащих нейромедиатор, и таким образом обеспечивающим процесс передачи сигнала от мотонейрона к мышце. В последнее десятилетие значительно увеличилось число исследований, демонстрирующих тесный контакт нервных окончаний симпатических нейронов с нервно-мышечными синапсами, а также влияние соединений, активирующих адренорецепторы, на процессы секреции ацетилхолина из моторных нервных окончаний. Однако, механизм пресинаптического действия адренергических агентов до сих пор остается нераскрытым. Есть основания полагать, что он может быть связан с функционированием кальциевых каналов, обеспечивающих вход ионов кальция в нервное окончание в ответ на стимул. В связи с этим целью данной работы было исследование влияния специфического активатора  $\alpha_2$ -адренорецепторов (A2AR) дексмететомидина на величину кальциевого транзientа в двигательном нервном окончании нервно-мышечного препарата мышцы. Кальциевый транзient оценивается как изменение интенсивности флуоресценции специфического кальций-чувствительного красителя Oregon Green 488 BAPTA-1, введенного в нервное окончание, в ответ на вход ионов кальция при стимуляции двигательного нерва. Исследование проводили на изолированном нервно-мышечном препарате *m. Levator auris longus* мышцы. Оценивали амплитуду флуоресцентного ответа при помощи высокоскоростной камеры Neuro CCD SMQ (Redshirt Imaging) в контрольных условиях и после действия адренергических агентов. Активация A2AR дексмететомидином в концентрации 10 мкМ вызывала достоверное уменьшение амплитуды кальциевого транзientа на  $12.4 \pm 2.8\%$  ( $n=11$ ,  $p<0.05$ , 5 животных) по сравнению с контрольными условиями. Специфический ингибитор A2AR соединение SKF-86466 в концентрации 10 мкМ, напротив, увеличивал амплитуду кальциевого ответа на  $16.7 \pm 3.1\%$  ( $n=24$ ,  $p<0.05$ , 5 животных) по сравнению с контролем. После действия ингибитора активация A2AR дексмететомидином не приводила к изменению амплитуды кальциевого транзientа. Полученные данные об изменении интенсивности флуоресценции кальциевого красителя в ответ на нервный стимул указывают на то, что пресинаптические A2AR могут оказывать влияние на вход ионов кальция в двигательное нервное окончание в нервно-мышечном синапсе мышцы.

Работа поддержана грантом РФФИ №18-15-00046.

**PHARMACOLOGICAL REGULATION OF THE AMYLOID-DEGRADING ENZYME NEPRILYSIN AFTER PRENATAL HYPOXIA: RT-PCR, IMMUNOCHEMICAL AND FLUORIMETRIC ANALYSIS**

Zhuravin I.A.<sup>1</sup>, Vasil'ev D.S.<sup>1</sup>, Dubrovskaya N.M.<sup>2</sup>, Kozlova D.I.<sup>1</sup>, Nalivaeva N.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia, <sup>2</sup> Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia

e-mail: i-zhur@mail.ru

Maternal pathologies during pregnancy increase the risk of neurodegenerative diseases in later life of the offspring due to the changes in expression of neuronal genes. A metallopeptidase neprilysin (NEP) catabolizes important neuropeptides, including amyloid A $\beta$  peptide, whose accumulation in the brain leads to Alzheimer's disease (AD), and is considered as a therapeutic target. However, age-related dynamics of NEP expression in various brain structures has been poorly studied, especially in a model of prenatal pathology. In the present study we analyzed expression and activity of NEP in brain structures of the offspring of control rats and rats subjected to prenatal hypoxia (PH).

**Methods:** Female Wistar rats were subjected to hypoxia on the 14th day of pregnancy (7% O<sub>2</sub>, 3 hours). At various postnatal stages NEP mRNA and protein expression in the olfactory bulbs (OB), hippocampus (Hip), neocortex (Cx) and striatum (Str) were analyzed by rt-PCR and Western blotting in the control and PH male offspring. NEP activity was measured by a fluorimetric assay using Suc-Ala-Ala-Phe-7-AMC (50  $\mu$ M; Bachem, UK) as a substrate (Fisk et al, 2007). We have also analyzed the efficacy of i.c. administration of a caspase inhibitor Ac-DEVD-CHO (Ac-D) and i.p. injections of a histone deacetylase inhibitor sodium valproate (VA) capable to modulate NEP gene expression.

**Results:** NEP mRNA expression in the OB and Str of rat pups was found to be at least two times higher than in the Hip and Cx with a steady increase in all studied structures during the first month after birth and a significant decline in the Cx and Hip by the age of 3 months and in the OB by nine months. Moreover, in the Cx and Hip of the PH group NEP mRNA and protein levels and activity were lower compared to the controls. PH and normal ageing also led to olfactory deficit in rat adulthood which correlated with reduced NEP expression in the OB. Administration of Ac-D, via inhibition of the caspases increased by PH, prevented degradation of a transcription regulator AICD, which controls NEP gene expression, and restored NEP mRNA and protein levels. Injections of VA, which increases AICD occupancy at the NEP gene promoter, also increased NEP expression and activity in the Cx and Hip of PH rats. In both paradigms, increased NEP expression and activity in PH rats were accompanied by improved performance in the memory tests, which correlated with the increased number of dendritic spines in the Cx or Hip.

**Conclusion:** Further studies of NEP regulation will help to design possible strategies for prevention of neurodegeneration and cognitive deficits caused by various insults and A $\beta$  accumulation.

RFBR (19-015-00232), Russian state budget (-18-118012290373-7). Fluorimetry was performed in the Center for the physiological, biochemical and molecular-biological research of IEPHB RAS.

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АМИЛОИД-ДЕГРАДИРУЮЩЕГО ФЕРМЕНТА НЕПРИЛИЗИНА ПОСЛЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ: РТ-ПЦР, ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ И ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗЫ**

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

<sup>1</sup> ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
РАН, Санкт-Петербург, Россия, <sup>2</sup> Санкт-Петербургский педиатрический  
медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: i-zhur@mail.ru

Патологически протекающая беременность повышает риск развития нейродегенеративных заболеваний у потомства за счет изменения экспрессии нейрональных генов. Металлопептидаза неприлизин (НЕП) катаболизирует важные нейропептиды, в том числе амилоидный пептид А $\beta$ , накопление которого в головном мозге приводит к болезни Альцгеймера (БА), и рассматривается в качестве терапевтической мишени. Однако возрастная динамика экспрессии НЕП в различных структурах головного мозга изучена слабо, особенно на модели пренатальной патологии. В настоящем исследовании проведен анализ экспрессии и активности НЕП в структурах головного мозга потомства контрольных крыс и крыс, подвергнутых пренатальной гипоксии (ПГ).

**Методы:** Самки крыс линии Вистар подвергались гипоксии на 14-й день беременности (7% O<sub>2</sub>, 3 часа). На различных постнатальных стадиях экспрессию НЕП на уровне мРНК и белка в обонятельных луковицах (ОБ), гиппокампе (Hip), неокортексе (Сх) и стриатуме (Str) контрольных и подвергнутых ПГ крысят мужского пола анализировали методом РТ-ПЦР и вестерн-блоттинга. Активность НЕП измеряли флуориметрическим методом с использованием Suc-Ala-Ala-Phe-7-AMC (50 мкМ; Bachem, Великобритания) в качестве субстрата (Fisk et al, 2007). Также проведен анализ эффективности i.c. введения ингибитора каспаз Ac-DEVD-CHO (Ac-D) и i.p. инъекций ингибитора деацетилаз гистонов вальпроата натрия (VA), способного модулировать экспрессию гена NEP.

**Результаты:** Установлено, что экспрессия НЕП-мРНК в ОБ и Str детенышей крыс была по меньшей мере в два раза выше, чем в Hip и Сх с устойчивым увеличением во всех исследуемых структурах в течение первого месяца после рождения и значительным снижением в Сх и Hip к 3-х месячному возрасту и в ОБ к девяти месяцам. Кроме того, в Сх и Hip крыс ПГ-группы уровни мРНК, белка и активности НЕП были ниже по сравнению с контролем. ПГ и нормальное старение также приводили к обонятельному дефициту в зрелом возрасте крыс, что коррелировало со снижением экспрессии НЕП в ОБ. Введение Ac-D путем ингибирования каспаз, активированных ПГ, предотвращало деградацию транскрипционного регулятора AICD, который контролирует экспрессию гена NEP, и восстанавливало уровни мРНК и белка НЕП. Инъекции VA, повышающего связывание AICD с промотором гена NEP, также увеличивали экспрессию и активность НЕП в Сх и Hip крыс, перенесших ПГ. В обеих парадигмах повышение экспрессии и активности НЕП у таких крыс сопровождалось улучшением показателей в тестах на память, что коррелировало с увеличением количества дендритных шипиков в Сх или Hip.

**Заключение:** Дальнейшие исследования регуляции НЕП будут способствовать разработке возможных стратегий профилактики нейродегенерации и когнитивного дефицита, вызванного различными патологиями и накоплением А $\beta$ .

РФФИ (19-015-00232), государственным бюджетом РФ (АААА -1818-118012290373-7).  
Флуориметрический анализ проводился в с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ. РАН.

**AUTHOR'S INDEX**

- Al'bova P.E., 9
- Alekseev A.A., 11, 26
- Alexandrova Y.N., 89
- Ankudinov A.V., 83
- Anokhin K.V., 23, 28, 41, 47
- Antonov S.M., 70, 98
- Arkhipov A.Yu., 107
- Arzhevikina P.A., 11
- Balaban P.M., 31, 35
- Bannova A.V., 21
- Belan D.V., 71
- Belousov V.V., 35
- Belozor O.S., 13
- Bezprozvanny I., 79
- Blohin S.A., 94
- Bobkov D.E., 77
- Boikov S.I., 98
- Borodinova A.A., 52
- Boytsova E.B., 55
- Bratanov D., 26
- Bregestovski P.D., 44, 63
- Bukharaeva E.A., 107
- Chebotarev A.S., 35
- Chechevatova V.V., 56
- Chistyakova O.V., 77
- Chizhov A.V., 16
- Churilova A.V., 74
- Dmitrieva E.A., 18
- Dobretsov M.G., 77
- Drozd U.S., 19, 21
- Dubrovskaya N.M., 109
- Dygalo N.N., 19, 21
- Efremov A.A., 23
- Ekimova I.V., 71
- Ermakova E.V., 22
- Ermakova Y.G., 35
- Erofeev A.I., 79
- Fedorenko S.V., 94
- Fedotov I.V., 28, 47
- Firsov M.L., 49, 69
- Gerasimov E.I., 79
- Gordeliy V.I., 11, 26
- Ivashkina O. I., 28
- Ivashkina O.I., 23, 41, 47
- Kalinina D.S., 101
- Kalinina T.S., 21
- Kapustyanov I.A., 46
- Karelina T.V., 98



- Kelmanson I.V., 35  
Khalisov M.M., 83  
Kirov V.N., 56  
Kolotova D.E., 31  
Komarevcev I.M., 34  
Komleva Yu.K., 55  
Komysheva N.P., 21  
Koroleva K.S., 22  
Kosicin Yu.M., 85  
Kovalev K.V., 26  
Kozlova D.I., 109  
Krasnoschekova E.I., 82  
Krylov B.V., 83  
Kubasov I.V., 77  
Kuleshova E.P., 52  
Lanin A.A., 35  
Lanshakov D.A., 19, 21  
Makarov D.A., 34  
Maliar N.L., 11  
Malkov A.E., 18  
Malyshev A.Yu., 31, 58, 64  
Matukhno A.E., 56  
Mikhailova N.V., 44  
Mikhaylova E.V., 85, 92, 96  
Mikhrina A.L., 92  
Morgun A.V., 55  
Morina I.Yu., 87  
Muslimov A.R., 49  
Mustafina A.R., 94  
Nalivaeva N.N., 33, 68, 109  
Nasyrov R.A., 82  
Nekrasov A.P., 34  
Nikitin E.S., 35  
Nikolaev D.M., 54  
Nikolaev M.V., 37  
Nomerovskaya A.Yu., 38  
Obukhov D.K., 89  
Osipova E.D., 55  
Panov M.S., 54  
Pchitskaya E.I., 90  
Penniyaynen V.A., 83  
Petrenko V.I., 38, 61  
Petrov K.A., 94  
Petrovskaya L.E., 31, 40  
Petukhova E.O., 44  
Plakhova V.B., 83  
Plusnin V.V., 28  
Plyusnin V.V., 41  
Podolyak E.Y., 11  
Podzorova S.A., 83  
Polonik S.G., 71  
Poloskin E. D., 42

Ponomareva D.N., 44

Pozhilenkova E.A., 55

Puschina E.V., 46, 89

Pushkareva S.A., 79

Rogozhnikova O.S., 23, 28, 47

Romanova I.V., 96

Romanova I.V., 85, 87, 92

Roshchin M., 35

Roshchin M.V., 31, 35

Rotov A.Yu., 49

Ryazantsev M.N., 37, 54

Rysakova M.P., 52

Salmina A.B., 55

Samigullin D.V., 94

Semynina V.G., 56

Shaburova E.V., 19

Shamshurina E.V., 46

Shevandova A.A., 38

Shevchenko V.A., 11, 26

Shishkina G.T., 21

Shtyrov A.A., 54

Shuvaev A.N., 13, 55

Sibarov D.A., 98

Sibgatullina G.V., 94

Sidorina V.V., 52

Sitdikova G.F., 22

Sitnikova V.S., 49

Smirnov I.V., 58

Smirnova E.Yu., 16, 60

Smirnova G.R., 31

Solotyonkov M.A., 47

Sorokina L.E., 61

Sorokina L.Ye., 38

Sotskov V.P., 28

Stepanenko Y.D., 98

Stepanov A.S., 94

Strashkov D.M., 37

Stukaneva M.E., 99

Suhov I.B., 77

Sukhareva E.V., 21

Sviridova D.L., 96

Tarakanchikova Y.V., 49

Tikhonov D.B., 37

Tkachenko L.A., 82

Toropova K.A., 23, 28, 41, 47

Tsybrov F.M., 11

Tsytsarev V.Yu., 65

Tumanova N.L., 101

Turner A.J., 33, 68

Varaksin A.A., 46, 89

Vasil'ev D.S., 101, 109

Vlasova O.L., 34, 79

***APRIL 22-26, 2020***

***OPTOGENETICS+ 2020***

Yakimov A.S., 55

Zharikova E.I., 105

Yakovleva O.V., 9, 103

Zheltikov A.M., 35

Yarmiev I.Z., 9, 103

Zhilyakov N.V., 107

Zabelskii D., 26

Zhuravin I.A., 33, 109

Zaitsev A.V., 16, 60

Zykin P.A., 82

Утверждено Федеральным государственным бюджетным учреждением науки  
Институтом эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
Российской академии наук

194223, Санкт-Петербург, пр. Гореза, 44.

Сборник научных трудов. ГОСТ 7.60–003 СИБИД

Оригинал-макет **О.В. Кручинина**

Корректурa **О.С. Алексеева**

Дизайн обложки **В.Д. Каюмова**

Подписано к печати 14.04.2020. Формат 60 Ч 84 1/8.

Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать цифровая.

Усл. печ. л. 5,81. Тираж **400** экз. Заказ № **468**.

---

Отпечатано в Издательстве ВВМ.

198095, Санкт-Петербург, ул. Швецова, 41.