

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Российский национальный исследовательский медицинский
университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации» (ФГАОУ
ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России)

НЕЙРОКАМПУС 2023: ЭВОЛЮЦИЯ. НЕЙРОТЕХНОЛОГИИ БУДУЩЕГО

Тезисы участников конференции
(19-24 августа 2023г.)

Текстовое электронное издание

Москва
Квант Медиа
2023

УДК 004.032.26
ББК 16.632
Н46

Нейрокампус 2023: эволюция. Нейротехнологии будущего: тезисы участников конференции (19-24 августа 2023г.); ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова – Москва: Квант Медиа, 2023. – 188 с. – Загл. с титул. экрана. – Текст: электронный.

ISBN 978-5-6047449-4-9.

Продолжается работа над повесткой исследований в области медицинских нейротехнологий, и во второй раз ведущие исследователи мозга собрались на био-станции Иркутского государственного Университета, чтобы представить результаты своих экспериментов и обсудить актуальные проблемы нейронаук. На прошедшей 19-24 августа 2023 года конференции собрались представители университетов и научных организаций Казани, Орла, Москвы, Санкт-Петербурга, Калининграда и Нижнего Новгорода. Собранные в этом издании материалы освещают проблемы использования генетических подходов для регуляции работы нейронных сетей, вопросы функциональных характеристик нейронов и синапсов, стратегии регенеративной терапии травм головного и спинного мозга, модели восстановления структуры и функции нервной ткани после ишемии и другие. Ознакомиться с материалами конференции будет важно интересующимся сферой медицинских нейротехнологий: студентам, исследователям и клиницистам.

УДК 004.032.26
ББК 16.632

*Системные требования:
Internet Explorer 7, 8, 9 или 10; Firefox Extended Support Release; Chrome.*

ISBN 978-5-6047449-4-9

© Коллектив авторов, 2023
© ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 2023
© Оформление. ООО «Квант Медиа», 2023

Содержание

Гайдуков А. Е., Молчанова А. И.

СОПРЯЖЕНИЕ ПРЕСИНАПТИЧЕСКИХ МЕТАБОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ GIRK ПРИ РЕГУЛЯЦИИ КВАНТОВОЙ СЕКРЕЦИИ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРА ПРОДОМЕНОМ BDNF В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ 9

Закирьянова Г. Ф., Гиниатуллин А. Р.,
Ценцевицкий А. Н., Гафурова Ч. Р., Петров А. М.

ОКИСЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА МЕМБРАН РЕГУЛИРУЕТ МОБИЛИЗАЦИЮ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ В НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ СОЕДИНЕНИЯХ 16

Сысоев Ю. И., Баженова Е. Ю., Шкорбатова П. Ю., Ковалев Г. В.,
Лабетов И. А., Горский О. В., Шкарупа Д. Д., Мусиенко П. Е.

РАЗРАБОТКА НЕЙРОМОДУЛЯЦИОННЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ РАБОТЫ НИЖНИХ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ 21

Седов А. С., Томский А. А.

НЕЙРОННЫЕ СИГНАТУРЫ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАЗАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ У ПАЦИЕНТОВ С ДВИГАТЕЛЬНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ 23

Клеева Д. Ф., Григорьева О. А., Гуценко Д. Д.,
Пигарев И. Н., Осадчий А. Е.

ЗАВИСИМОСТЬ КОРТИКАЛЬНЫХ ОТВЕТОВ НА СТИМУЛЯЦИЮ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ОТ СОСТОЯНИЙ БОДРСТВОВАНИЯ И СНА: МЭГ-ИССЛЕДОВАНИЕ 26

Подгорный О. В., Мухаметшина Л. Ф., Солотёнков М. А., Джэппи Д., Калининченко А. Л., Цопина А. С., Мальцев Д. И., Ланин А. А., Круть В. Г., Федотов И. В., Солюс Г. М., Елесина Е. А., Федотов А. Б., Вагабов М. М., Соколов Р. А., Петухова Е. О., Ахмедова М. А., Пурик А. А., Мощенко А. А., Розов А. В., Жёлтиков А. М., Белоусов В. В.

ХЕМО- И ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ И ТЕРАПИИ ПАТОЛОГИЙ МОЗГА 29

Пеков С. И., Сорокин А. А., Деркач М. М., Елиферов В. А., Попов И. А. ВЫЯВЛЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ В ЗОНЕ ИНФИЛЬТРАЦИИ АНАПЛАСТИЧЕСКИХ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА.....	33	Серебряная Д. В., Дя Г. А., Гущеваров Д. А., Воловиков Е. А., Беликова Л. Д., Постников А. Б., Артемьева М. М., Медведева Н. А., Лебедева О. С., Лагарькова М. А., Катруха А. Г. ПРОТЕОЛИЗ IGFBR-4 ПОД ДЕЙСТВИЕМ RAPP-A В НЕРВНОЙ ТКАНИ И ЕГО ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА.....	59
Винокуров А. Ю., Серегина Е. С., Камынина А. В., Абрамов А. Ю. РОЛЬ СЕЛЕКТИВНОЙ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ В ИЗМЕНЕНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО БАЛАНСА И ОБЕСПЕЧЕНИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА.....	36	Травникова Д. Ю., Кордюкова М. Ю., Котелевцев Ю. В., Абакумова Т. О МАЛЫЕ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ РНК КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ТЕРАПИИ ГЛИОБЛАСТОМ	62
Костюк А. И., Иванова А. Д., Сергеева А. Д., Раевский Р. И., Котова Д. А., Кельмансон И. В., Панова А. С., Храмова Ю. В., Катруха В. А., Трифонова А. П., Судоплатов М. А., Чебаненко В. В., Почечуев М. С., Чеботарев А. С., Ланин А. А., Федотов И. В., Тяглик А. Б., Федотова А. А., Морозова К. И., Семьянов А. В., Браже Н. А., Федотов А. Б., Белоусов В. В., Билан Д. С. ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ IN VIVO ИССЛЕДОВАНИЙ	41	Герасимова Е. В., Богатова К. С., Еникеев Д. Р., Кочнева А. А., Коновалова С. П., Мусиенко П. Е., Яковлева О. В., Ситдикова Г. Ф. СЕНСОРНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ КРЫС В МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МИГРЕНИ IN VIVO	64
Мальцев Д. И., Солотёнков М. А., Мухаметшина Л. Ф., Цопина А. С., Ланин А. А., Федотов И. В., Солюс Г. М., Федотов А. Б., Мощенко А. А., Жёлтиков А. М., Подгорный О. В., Белоусов В. В. ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ ЛОКОМОТОРНОЙ ФУНКЦИИ СВОБОДНОПОДВИЖНЫХ МЫШЕЙ	43	Степаничев М. Ю., Недогреева О. А., Мамедова Д. И., Новикова М. Р., Лазарева Н. А., Онуфриев М. В., Моисеева Ю. В., Манолова А. О., Овчинникова В. О., Кострюков П. А., Гуляева Н. В. ПОСЛЕДСТВИЯ ДЛИТЕЛЬНОЙ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ У СТАРЕЮЩИХ КРЫС ГЕНОТИПОВ WKY И SHR	70
Николаев М. В. КОНТРОЛЬ ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОТОПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕЙ.....	47	Шалагинова И. Г., Вылегжанина А. Э., Зачепило Т. Г., Дюжикова Н. А. ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННАЯ ВОЗБУДИМОСТЬ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ ПОСТСТРЕССОРНЫХ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ: ИССЛЕДОВАНИЕ НА МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ.....	76
Багаева Д. Ф., Носов Г. А., Власова А. Д., Бухалович С. М., Ильинский Н. С., Горделий В. И. РАЗРАБОТКА ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИНСТРУМЕНТА ДЛЯ КОНТРОЛЯ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ	53	Баклаушев В. П. СОВРЕМЕННЫЕ СТРАТЕГИИ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ ТЕРАПИИ СПИНАЛЬНОЙ ТРАВМЫ.....	82
Лунев Е. А., Клементьева Н. В., Васильева С. Г., Поликарпова А. В., Шмидт А. А., Воловиков Е. А., Егорова Т. В., Дейкин А. В., Бардина М. В. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ НА ОСНОВЕ AAV-RNAi ДЛЯ GNAO1-ЭНЦЕФАЛОПАТИИ ВЫЗВАННОЙ ДОМИНАНТНОЙ МУТАЦИЕЙ с.607 G>A.....	55	Шумкова В. В., Ситдикова В. Р., Силаева В. М., Логашкин А. Е., Мамлеев А. Р., Минлебаев М. Г. РАСПРОСТРАНЕНИЕ ФОКАЛЬНОЙ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ IN VIVO.....	84

Добрякова Ю. В., Герасимов К. А., Короткова Т. А., Корягина А. А., Маркевич В. А., Большаков А. П. АКТИВАЦИЯ WNT КАСКАДА ПРИВОДИТ К ЧАСТИЧНОЙ КОМПЕНСАЦИИ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ ДИСФУНКЦИЕЙ У КРЫС 86	Матвеева М. В., Федулина А. А., Мальцева К. Е., Лебедева А. В. ДИСФУНКЦИИ НЕЙРОН-ГЛИАЛЬНЫХ СЕТЕЙ В РАННЕМ ПЕРИОДЕ У МЫШЕЙ С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА 113
Корженевский Д. А., Кудряшова О. М. ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МАСС—СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ФАСИЛИТИ ФЕДЕРАЛЬНОГО ЦЕНТРА МОЗГА И НЕЙРОТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ 93	Мальцева К. Е., Джэппи Д. Д., Соколов Р. А., Круть В. Г., Федулина А. А., Розов А. В. ВЛИЯНИЕ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ АСТРОГЛИИ НА МОДУЛЯЦИЮ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ В ГИППОКАМПЕ 117
Шевцова Ю. А., Эльдаров Ч. М., Горюнов К. В., Чаговец В. В., Стародубцева Н. Л., Ионов О. В., Силачев Д. Н. ПОИСК МЕТАБОЛОМНЫХ МАРКЕРОВ ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ НОВОРОЖДЕННЫХ 96	Карань А. А., Сулейманова Е. М., Борисова М. А., Волобуева М. Н., Большаков А. П. ЭКСПРЕССИЯ ЦИТОКИНОВ В ГИППОКАМПЕ И КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОГО СТАТУСА И РОЛЬ МОДУЛЯЦИИ ЭНДОКАННАБИНОИДНОЙ СИСТЕМЫ 120
Елесина Е. А., Цопина А. С., Мальцев Д. И., Солотенков М. А., Калиниченко А. Л., Ланин А. А., Федотов И. В., Федотов А. Б., Мощенко А. А., Подгорный О. В., Белоусов В. В. ГЕНЕРАЦИЯ ВНУТРИНЕЙРОНАЛЬНОГО ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА IN VIVO ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ 100	Ковалева П. А., Каршиева С. Ш., Зеленова Э. Д., Сенатов Ф. С. ЭЛЕКТРОСПИННИНГ С БИОКОМПОНЕНТАМИ КАК МЕТОД СОЗДАНИЯ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ 123
Филюшкина В. И., Белова Е. М., Гамалея А. А., Томский А. А., Седов А. С. НЕЙРОННАЯ АКТИВНОСТЬ СУБТАЛАМИЧЕСКОГО ЯДРА У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМ НАЧАЛОМ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА 104	Мишина Н. М., Берестовой М. А., Усатова В. С., Иваненко А. В. Джэппи Д., Круть В. Г., Соколов Р. А., Розов А. В., Белоусов В. В. НЕЙРАЛЬНЫЕ СФЕРОИДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ 126
Соколов Р. А., Круть В. Г., Мухина И. В. ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНАЛЬНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В ОСТРОЙ ФАЗЕ ГИАЛУРОНИДАЗА-ЗАВИСИМОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ 106	Зеленова Э. Д., Каршиева С. Ш., Ковалева П. А., Фурса Г. А., Сенатов Ф. С. РАЗРАБОТКА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ СПИННОГО МОЗГА..... 129
Смирнов И. В., Осипова А. А., Смирнова М. П., Бородинова А. А., Малышев А. Ю. ВЫСОКОЧАСТОТНЫЕ ПАЧКИ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ МЕНЯЮТ СВОЙСТВА ЗРИТЕЛЬНЫХ ОТВЕТОВ НЕЙРОНОВ НЕОКОРТЕКСА МЫШИ ПО МЕХАНИЗМУ ГЕТЕРОСИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ 109	Кондакова Е. В., Тарабыкин В. С., Newman A. G. DE NOVO МУТАЦИЯ SEMA4D ВЫЗЫВАЕТ ТОНИКО-КЛОНИЧЕСКУЮ ЭПИЛЕПСИЮ У ЧЕЛОВЕКА 134
	Рыбакова В. П., Митина Н. Н., Бабаев А. А., Тарабыкин В. С. ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ENU-МУТАНТНЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ, ПРОЯВЛЯЮЩИХ ЭПИЛЕПТИФОРМНУЮ АКТИВНОСТЬ 140

Шувалова М. Л., Носов Г. А., Белоусов В. В. РОЛЬ РЕДОКС-ЗАВИСИМОГО РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ В НАРУШЕНИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА.....	148
Пурик А. А., Калининченко А. Л., Мухаметшина Л. Ф., Круть В. Г., Мальцев Д. И., Подгорный О. В., Белоусов В. В. ДОСТАВКА КАНАЛА TRPV1 ЧЕЛОВЕКА В ТОРМОЗНЫЕ НЕЙРОНЫ ДЛЯ ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЭПИЛЕПСИИ.....	159
Жирнов С. В., Каршиева С. Ш., Тунеков Т. А., Илясов А. Р. ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПРОТОТИПА БИОГИБРИДНОГО НЕЙРОИНТЕРФЕЙСА НА ОСНОВЕ КОМПОЗИЦИОННОГО ПОЛИМЕРА И КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ	164
Джэппи Д., Калининченко А. Л., Солюс Г. М., Мальцев Д. И., Богданова Ю. А., Мухаметшина Л. Ф., Петрухова Е. О., Соколов Р. А., Мощенко А. А., Шайдуров В. А., Розов А. В., Подгорный О. В., Белоусов В. В. ХЕМОГЕНЕТИЧЕСКИ ВЫЗВАННЫЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ВЛИЯЕТ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ В ПИРАМИДАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ CA1.....	168
Молодцова А. А., Носов Г. А. ИНДУЦИРОВАННЫЙ СИНАПТОГЕНЕЗ В ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНАПТИЧЕСКИХ АДГЕЗИВНЫХ БЕЛКОВ	172
Дунаев А. В. БИОФОТОНИКА В РЕШЕНИИ ЗАДАЧ НЕВРОЛОГИИ	175
Кордюкова М. Ю., Мещерякова В. И., Пешкова Е. С., Абакумова Т. О., Белоусов В. В. ПОВЫШЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОРЕДОКСИНРЕДУКТАЗНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КАК ФАКТОР УСТОЙЧИВОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ К ХИМИОТЕРАПИИ	180
Ледяева В. С., Сулягин В. К., Корженевский Д. А., Кудряшова О. М., Шохина А. Г. МУЛЬТИОМИКСНЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ФЕРРОПТОЗА	184

УДК 612.816.7

СОПРЯЖЕНИЕ ПРЕСИНАПТИЧЕСКИХ МЕТАБОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ GIRK ПРИ РЕГУЛЯЦИИ КВАНТОВОЙ СЕКРЕЦИИ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРА ПРОДОМЕНОМ BDNF В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-9-15

Гайдуков А. Е.¹, Молчанова А. И.¹

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
gaydukovae@my.msu.ru

Аннотация. Эндогенная активация пресинаптических аденозиновых A1-рецепторов, но не P2Y13-рецепторов или M2-холинорецепторов, необходима для стимуляции каналов GIRK под действием продомена BDNF в моторных синапсах, приводя к комплексному торможению квантовой секреции ацетилхолина.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, продомен BDNF, GIRK, паннексин, аденозин.

Нейротрофин мозга (BDNF) — хорошо известный регулятор нейрогенеза модулятор передачи сигнала в синапсах ЦНС. Присутствие зрелого BDNF и мембранных рецепторов (TrkB и p75), действуя на которые, нейротрофин может запускать комплекс сигнальных путей, было выявлено во всех компонентах моторных синапсов млекопитающих — нервном окончании, постсинаптической мембране мышечных волокон и перисинаптических Шванновских клетках [1]. В настоящее время BDNF рассматривается как один из представителей разнообразного по составу семейства миокинов, который способен высвобождаться из мышечных волокон и функционировать как ретроградный мессенджер [2]. При этом трактовка синаптических модуляторных воздействий BDNF in vivo требует учета возможного одновременного действия побочного продукта его созревания из проBDNF — продомена BDNF, чья сигнальная роль которого только начала изучаться в моторных синапсах. В ЦНС продомен BDNF может играть независимую регуляторную

роль, влияя на проявления долговременной синаптической пластичности [3]. Недавно мы установили, что продомен BDNF оказывает на синаптическую передачу в моторных синапсах действие, полностью противоположное эффектам зрелого нейротрофина — снижает частоту одноквантовых миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и уменьшает амплитуду постсинаптических потенциалов, как миниатюрных, так и многоквантовых ПКП, возникающих в результате быстрой синхронной секреции квантов ацетилхолина при приходе пресинаптического ПД. Снижение амплитуды многоквантовых ПКП под действием продомена BDNF реализуется не только за счет уменьшения амплитуд отдельных квантов в составе вызванных ПКП, но и за счет понижения их квантового состава [4]. Негативное влияние на частоту МПКП и квантовый состав ПКП, во-первых, свидетельствует о наличии пресинаптической компоненты у тормозного действия продомена BDNF на квантовую секрецию ацетилхолина, а, во-вторых, могло быть связано с уменьшением пресинаптического входа ионов Ca^{2+} за счет возрастания активности пресинаптических K^{+} -каналов. Мы установили, что тормозное действие продомена BDNF в наномолярной концентрации реализуется за счет активации им рецепторного комплекса $\rho 75$ /сортилин и запуска Rho-киназного сигнального каскада, направленного на стимулирование (за счет активности риаодиновых рецепторов пресинаптических Ca^{2+} -депо) Ca^{2+} -активируемых K^{+} -каналов низкой проводимости (SK) и G-белок сцепленных калиевых каналов входящего выпрямления (GIRK) [4]. GIRK требуют дуальной активации — за счет их взаимодействия с мембранным фосфолипидом PIP2 (на увеличение его уровня, вероятно, направлен запускаемый продоменом BDNF Rho-киназный сигнальный путь) и $\beta\gamma$ -субъединицами G_i -белков [5]. В моторных синапсах млекопитающих наличествует целый ансамбль пресинаптических метаболитных рецепторов, сопряженных с G_i -белками. К числу наиболее вероятных кандидатов можно отнести мускариновые M2-холинорецепторы, аденозиновые A_1 -рецепторы и P2Y13-пуринорецепторы. Необходимо было установить, какие именно из них вовлечены в реализацию негативного действия продомена BDNF на нервно-мышечную передачу?

Объектом исследования были нервно-мышечные препараты диафрагмы взрослых мышей линии C57/Bl6 обоих полов. Регистрацию спонтанной секреции квантов ацетилхолина (МПКП) и быстрой синхронной многоквантовой секреции (ПКП) проводили

с помощью внутриклеточных микроэлектродов. Перед регистрацией вызванной активности (при стимуляции нерва с частотой 50 Гц в течение 1 с стимулами длительностью 0.08—0.1 мс) для предотвращения сокращения мышечных волокон их частично рассекали. Данный паттерн стимуляции (короткие высокочастотные залпы) использовали, потому что это напоминает паттерн разрядки мотонейронов, иннервирующих дыхательную мускулатуру, и квантовая секреция в данном случае проявляет характерные компоненты кратковременной синаптической пластичности. Регистрацию синаптической активности проводили с использованием усилителя Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems) и аналого-цифровой преобразователя E-154 (L—Card) с интерфейсом PowerGraph 6.0. Для анализа данных использовали программное обеспечение MiniAnalysis (Synaptosoft), последующую статистическую обработку проводили в GraphPad Prism 8. В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов. В контроле регистрировали активность не менее 5 разных синапсов. Затем в перфузионный раствор добавляли определенные фармакологические препараты и регистрировали активность разных синапсов на протяжении 40—60 мин. Анализировали изменения мембранного потенциала мышечных волокон, амплитудно-временные характеристики МПКП и ПКП. Проводили расчёт квантового состава ПКП с использованием коррективы амплитуд ПКП на нелинейную суммацию. Нормальность распределения значений параметров в выборках оценивали с использованием критерия Д’Агостино-Пирсона. Применяли t-критерий Стьюдента при сравнении нормально распределенных величин параметров МПКП и ПКП, в ином случае — критерий Манна-Уитни. Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки использовали при сравнении изменений амплитуд и квантового состава ПКП в коротких залпах. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, уровень значимости $p = 0.05$.

Сначала мы проверяли возможную роль активности мускариновых M2-холинорецепторов в качестве коактиватора GIRK при действии продомена BDNF. Ингибитор M2-холинорецепторов метоктрамин (0.1 мкМ) вызывал равномерное увеличение амплитуд и квантового состава каждого ПКП в коротком высокочастотном залпе по сравнению с контролем, не оказывая влияния на амплитудно-временные характеристики МПКП. Данные изменения могли свидетельствовать о вовлечении в регуляцию выброса квантов

ацетилхолина Ca^{2+} -каналов L-типа [6]. Действительно, метоктрамин-индуцированное усиление вызванного выброса ацетилхолина полностью предотвращалось под действием нитрендипина (1 мкМ) -блокатора этого типа Ca^{2+} -каналов, который сам по себе не влияет на амплитуду и квантовый состав ПКП в залпах. При этом в присутствии метоктрамина и нитрендипина продомен BDNF полностью сохранил способность угнетать квантовую секрецию ацетилхолина.

Совокупность полученных данных свидетельствует, во-первых, о том, что мускариновые M2-холинорецепторы вовлечены в негативную регуляцию активности пресинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа, обеспечивая их «замаскированное» состояние в нормальных условиях работы моторных синапсов, а во-вторых, M2-холинорецепторы не сопряжены с GIRK и не участвуют в их стимуляции под действием продомена BDNF.

Ранее мы показали, что тормозное влияние на вызванный выброс ацетилхолина со стороны пуринорецепторов (A_1 и P2Y13) требует функционирования каналов, образованных паннексином 1 (паннексон), в качестве дополнительному к везикулярному источнику синаптической АТФ [7]. Кроме того, в моторных синапсах мышей, нокаутных по гену паннексина1, и имеющих нормальные характеристики квантовой секреции АХ [8], продомен BDNF утрачивал способность ее угнетать [4]. Недавно мы выявили, что фармакологическое блокирование паннексон пробенецидом (1 мМ) не приводит к изменениям параметров вызванной многоквантовой секреции ацетилхолина в моторных синапсах мышей дикого типа [8]. Однако, как и в нервно-мышечных синапсах мышей, нокаутных по гену паннексина1, при заблокированных пробенецидом паннексонах в моторных синапсах мышей дикого типа продомен BDNF полностью утрачивал способность уменьшать амплитуды МПКП и ПКП и снижать квантовый состав ПКП в коротких ритмических залпах.

Эти данные говорят о том, что для вовлечения GIRK в регуляцию квантовой секреции ацетилхолина в моторных синапсах под действием продомена BDNF необходимо адекватное функционирование компонентов пуринергической модулирующей системы. Нам оставалось выяснить, эндогенная активация каких пуринорецепторов — P2Y13 или A_1 — в условиях залповой активности моторных синапсов будет обеспечивать GIRK-опосредованное тормозное действия продомена BDNF? Нами было установлено ранее, что ингибирование P2Y13-рецепторов MRS2211 (10 мкМ) приводит к равномерному увеличению амплитуд ПКП по всему ходу коротких

залпов — за счет возрастания квантового состава ПКП [6]. В ходе текущего исследования мы установили, что активность P2Y13-рецепторов, как и мускариновых M2-холинорецепторов, направлена на предотвращение вовлечения в регуляцию квантовой секреции АХ Ca^{2+} -каналов L-типа — потенцирующее действие MRS2211 в отношении вызванного выброса ацетилхолина предотвращалось нитрендипином. Однако продомен BDNF при ингибировании P2Y13-рецепторов MRS2211 и заблокированных нитрендипином Ca^{2+} -каналах L-типа эффективно проявлял свое тормозное влияние на квантовую секрецию АХ — угнетал как амплитуду постсинаптических потенциалов, так и квантовый состав ПКП. Таким образом, мы убедились, что, несмотря на присутствие в моторных синапсах мыши P2Y13-рецепторов, их активность и физиологическую значимость как негативных регуляторов выброса ацетилхолина, они не сопряжены с активацией GIRK и комплексным торможением секреции ацетилхолина под влиянием продомена BDNF.

Уже известно, что A_1 -рецепторы, благодаря их активации эндогенным аденозином, тормозят квантовую секрецию АХ и препятствуют вовлечению Ca^{2+} -каналов L-типа [6,7]. В данной работе негативное действие продомена BDNF в отношении квантовой секреции АХ полностью предотвращалось при блокировании A_1 -рецепторов DPCPX (100 нМ) в присутствии нитрендипина (1 мкМ) — значения амплитуд МПКП и ПКП и квантового состава ПКП в коротких залпах статистически значимо не отличались от таковых в контроле.

Таким образом, проведенные нами исследования впервые показали, что эндогенная активация именно пресинаптических аденозиновых A_1 -рецепторов, давно известных в качестве тормозящих нервно-мышечную передачу в моторных синапсах млекопитающих, необходима для реализации комплексного механизма угнетения квантовой секреции ацетилхолина под действием продомена BDNF. Предотвращение активации только этих пуринорецепторов — за счет их прямого ингибирования или непрямого снижения их активности (за счет фармакологического или генетического «выключения» паннексинового источника синаптических пуринов) — устраняет негативное влияние продомена BDNF на параметры квантовой секреции ацетилхолина в моторных синапсах мыши.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 22—25—00111.

Список литературы

1. Garcia N, Tomàs M, Santafe MM, Lanuza MA, Besalduch N, Tomàs J. Localization of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-4, tropomyosin-related kinase b receptor, and p75 NTR receptor by high-resolution immunohistochemistry on the adult mouse neuromuscular junction. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 2010;15 (1):40—49.
2. Gaydukov A, Bogacheva P, Tarasova E, Molchanova A, Miteva A, Pravdivceva E, Balezina O. Regulation of Acetylcholine Quantal Release by Coupled Thrombin/BDNF Signaling in Mouse Motor Synapses. *Cells.* 2019;8 (7):762.
3. Kojima M, Matsui K, Mizui T. BDNF pro-peptide: physiological mechanisms and implications for depression. *Cell Tissue Res.* 2019;377 (1):73—79.
4. Bogacheva PO, Molchanova AI, Pravdivceva ES, Miteva AS, Balezina OP, Gaydukov AE. ProBDNF and Brain-Derived Neurotrophic Factor Prodomain Differently Modulate Acetylcholine Release in Regenerating and Mature Mouse Motor Synapses. *Front. Cell. Neurosci.* 2022;16:866802.
5. Luo H, Marron Fernandez de Velasco E, Wickman K. Neuronal G protein-gated K⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022; 323 (2): 439—460.
6. Tarasova E, Miteva A, Gaydukov A, Balezina O. The role of adenosine receptors and L-type calcium channels in the regulation of the mediator secretion in mouse motor synapses. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2015;15:318—328.
7. Miteva AS, Gaydukov AE, Shestopalov VI, Balezina OP. The role of pannexin 1 in the purinergic regulation of synaptic transmission in mouse motor synapses. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2017;11:311—320.
8. Miteva AS, Gaydukov AE, Balezina OP. Acetylcholine release in mouse motor synapses. Changes of purinergic regulation under conditions of pharmacological blockade of pannexin 1 and its genetic knockout. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2021;15:378—386.

COUPLING OF PRESYNAPTIC METABOTROPIC RECEPTORS AND GIRK POTASSIUM CHANNELS DURING REGULATION OF QUANTAL NEUROTRANSMITTER RELEASE BY BDNF PRODOMAIN IN MOUSE MOTOR SYNAPSES

Gaydukov A. E. ¹, Molchanova A. I. ¹

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract: Endogenous activation of presynaptic adenosine A1 receptors, but not P2Y13 receptors or M2 cholinergic receptors, is necessary for stimulation of GIRK channels under the action of the BDNF prodomain in motor synapses, leading to complex inhibition of acetylcholine quantal release.

Key words: neuromuscular junction, BDNF prodomain, GIRK, pannexin, adenosine.

ОКИСЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА МЕМБРАН РЕГУЛИРУЕТ МОБИЛИЗАЦИЮ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ В НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ СОЕДИНЕНИЯХ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-16-20

Закирьянова Г. Ф.^{1,2}, Гиниатуллин А. Р.^{1,2},
Ценцевицкий А. Н.¹, Гафурова Ч. Р.^{1,2}, Петров А. М.^{1,2}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия,

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия
gffysiology@gmail.com

Аннотация. Окисление мембранного холестерина является признаком окислительно-восстановительного дисбаланса и может сопровождать нейродегенеративные заболевания. Применение электрофизиологических и оптических подходов показало, что ферментативное окисление холестерина способно влиять на нервно-мышечную передачу.

Ключевые слова: холестериноксидаза, синапс, везикулярный цикл, липидные рафты, скелетная мышца.

Холестерин является важной составляющей клеточных мембран. Его высокое содержание в мембранах синаптических везикул обеспечивает способность данных мембран быстро деформироваться [1, 2, 3]. Также холестерин является ключевым компонентом липидных рафтов, которые, вероятно, концентрируют некоторые экзцитозные и регуляторные белки [4, 5, 6]. Помимо своей роли в поддержании структуры и функционировании мембран, холестерин посредством ферментативных и окислительных реакций преобразуется в различные оксистерины с гидроксильрованием в боковой цепи или в стероидных кольцах; последние могут нарушать упаковку липидов. Одним из таких оксистеринов является 4-холестен-3-он (холестенон), высокая концентрация которого обнаружена у пациентов с болезнью Альцгеймера и церебротендинозным ксантоматозом. Этот плохо разлагаемый оксистерин является продуктом реакции, катализируемый холестериноксидазой (ХО), которая является бак-

териальным ферментом, необходимым для вирулентности. У млекопитающих амилоидный пептид β и его агрегат в комплексе с Cu^{2+} могут превращать холестерин в холестенон. Усиленное образование амилоидного пептида β происходит в синапсах, в том числе в нервно-мышечном соединении, при старении и болезни Альцгеймера [7, 8]. Вместе с Cu^{2+} амилоидный пептид β может концентрироваться в пресинаптических везикулах, мембраны которых богаты холестерином [8—11]. Соответственно, окисление холестерина плазмалеммы и мембраны синаптических везикул может быть важным фактором синаптической дисфункции из-за накопления амилоидного пептида β . В данной работе мы изучили действие ферментативного окисления мембранного холестерина с использованием холестериноксидазы на синаптическую передачу в диафрагме мыши.

Превращение холестерина в холестенон сопровождается эквивалентным увеличением продукции перекиси водорода. Набор Amplex Red показал увеличение флуоресценции резорурфина (продукт окисления реагента Amplex Red за счет H_2O_2) при аппликации ХО. Окисление холестерина может влиять на свойства мембраны, а именно на формирование липидных рафтов и упаковку липидного бислоя. С применением различных флуоресцентных меток (субъединица В холерного токсина, F2N12S, Image-iT BODIPY 581/591 C11, 22NBD-холестерин) было показано, что ХО в низких концентрациях (0,2 ед/мл) может действовать преимущественно на синаптические мембраны, вызывая нарушение упорядоченности липидов. В более высокой концентрации (2 ед/мл) ХО также влияет и на внесинаптическую мембрану и приводит к перекисному окислению липидов.

Результаты электрофизиологических экспериментов показали, что ХО в низких концентрациях оказывал незначительное влияние на спонтанное и вызванное высвобождение нейромедиатора (в условиях низкочастотной активности), тогда как более высокие концентрации ХО усиливали спонтанный выброс и, вероятно, имели эффект на постсинаптические процессы. Умеренно- и высокочастотная активность вызывает массивную мобилизацию синаптических пузырьков в активные зоны. Эти везикулы относятся к «быстро» и «медленно» мобилизуемым пулам [12]. Как умеренно-, так и высокочастотная стимуляция приводила к двухфазному снижению квантового состава: выделение нейромедиатора быстро снижалось в течение первых секунд, а затем стабилизировалось при частоте 20 Гц или постепенно снижалось при частоте стимуляции 70 Гц. Если сравнивать выделение квантов нейромедиатора при

20 и 70 Гц стимуляции в условиях инкубирования с низкой концентрацией ХО, то при выделяется больше квантов после воздействия ХО. Этот эффект сильнее выражен при 70 Гц активности. ХО в высокой концентрации оказывал одинаковое усиливающее влияние на высвобождение нейромедиатора как при 20 Гц активности, так и при 70 Гц. Следовательно, окисление плазмалеммального холестерина может потенцировать квантовое высвобождение нейромедиатора во время интенсивной активности. Вероятно, в этих условиях усиливается мобилизация синаптических везикул.

Наблюдение за динамикой выгрузки экзоцитозного маркера FM1—43 выявило, что обработка ХО в обеих концентрациях усиливает высвобождение красителя при 20 Гц активности, что указывает на усиление рекрутирования синаптических везикул в экзоцитоз в результате окисления мембранного холестерина. Интересно, что при стимуляции с частотой 70 Гц превалирует экзоцитоз по типу «kiss-and-run». Использование SR101, гидрофильного проникающего через поры слияния тушителя флуоресценции FM1—43, показало, что ХО увеличивает выгрузку красителя FM1—43 при высокочастотной стимуляции (70 Гц), в том числе, за счет переключения режима экзоцитоза с «kiss-and-run» на «full-fusion».

Чтобы проверить влияние окисления холестерина мембран синаптических везикул на нейротрансдукцию, аппликация ХО сочеталась со стимуляцией двигательного нерва с частотой 20 Гц в течение 3-х минут (в данных условиях фермент получает доступ к мембранам синаптических везикул, встроенных в пресинаптическую мембрану в ходе экзоцитоза везикул и до их эндоцитоза). В результате мы наблюдали угнетение высвобождения нейромедиатора и снижение выгрузки красителя FM1—43 при высокочастотной активности при аппликации обеих концентраций, что свидетельствует о том, что окисление специфически везикулярного холестерина ингибирует участие синаптических везикул в вызванном экзоцитозе.

Таким образом, окисление холестерина плазматической мембраны увеличивает мобилизацию синаптических везикул во время умеренной и высокочастотной активности, однако наблюдается противоположный эффект при окислении холестерина мембраны синаптических везикул. Следовательно, окислительно-восстановительный статус холестерина, вероятно, имеет важное значение для регуляции синаптической передачи на пресинаптическом уровне.

Работа поддержана грантом РФ № 23-75-10022.

Список литературы

1. B. Binotti, R. Jahn, A. Perez-Lara, An overview of the synaptic vesicle lipid composition, *Arch Biochem Biophys*, 709 (2021) 108966.
2. S. Takamori, M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S. A. Muller, B. Rammner, F. Gräter, J. S. Hub, B. L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmuller, J. Heuser, F. Wieland, R. Jahn, Molecular anatomy of a trafficking organelle, *Cell*, 127 (2006) 831—846.
3. E. Lauwers, R. Goodchild, P. Verstreken, Membrane Lipids in Presynaptic Function and Disease, *Neuron*, 90 (2016) 11—25.
4. Krivoi, II, A. M. Petrov, Cholesterol and the Safety Factor for Neuromuscular Transmission, *Int J Mol Sci*, 20 (2019).
5. C. Gil, A. Soler-Jover, J. Blasi, J. Aguilera, Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes, *Biochem Biophys Res Commun*, 329 (2005) 117—124.
6. J. Egawa, M. L. Pearn, B. P. Lemkuil, P. M. Patel, B. P. Head, Membrane lipid rafts and neurobiology: age-related changes in membrane lipids and loss of neuronal function, *J Physiol*, 594 (2016) 4565—4579.
7. M. Y. Wu, W. J. Zou, D. Lee, L. Mei, W. C. Xiong, APP in the Neuromuscular Junction for the Development of Sarcopenia and Alzheimer's Disease, *Int J Mol Sci*, 24 (2023).
8. S. V. Ovsepian, V. B. O'Leary, L. Zaborszky, V. Ntziachristos, J. O. Dolly, Synaptic vesicle cycle and amyloid beta: Biting the hand that feeds, *Alzheimers Dement*, 14 (2018) 502—513.
9. A. M. Petrov, M. R. Kasimov, A. L. Zefirov, Cholesterol in the Pathogenesis of Alzheimer's, Parkinson's Diseases and Autism: Link to Synaptic Dysfunction, *Acta Naturae*, 9 (2017) 26—37.
10. Y. Yu, D. C. Jans, B. Winblad, L. O. Tjernberg, S. Schedin-Weiss, Neuronal Abeta42 is enriched in small vesicles at the presynaptic side of synapses, *Life Sci Alliance*, 1 (2018) e201800028.
11. N. D'Ambrosi, L. Rossi, Copper at synapse: Release, binding and modulation of neurotransmission, *Neurochem Int*, 90 (2015) 36—45.
12. C. R. Gafurova, A. N. Tsentssevitsky, A. M. Petrov, Frequency-Dependent Engagement of Synaptic Vesicle Pools in the Mice Motor Nerve Terminals, *Cell Mol Neurobiol*, (2022).

OXIDATION OF MEMBRANE CHOLESTEROL REGULATES MOBILIZATION OF SYNAPTIC VESICLES IN NEUROMUSCULAR JUNCTION

Zakryjanova G. F.^{1,2}, Giniatullin A. R.^{1,2}, Tsentsevitsky A. N.¹,
Gafurova C. R.^{1,2}, Petrov A. M.^{1,2}

¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center "Kazan
Scientific Center of RAS", Kazan, Russia,

² Kazan State Medial University, Kazan, Russia

Annotation. Membrane oxidation of cholesterol is a sign of redox imbalance and may accompany neurodegenerative disorders. Using of electrophysiological and optical approaches has shown that the enzymatic oxidation of cholesterol can affect neuromuscular transmission.

Key words: cholesterol oxidase, synapse, vesicular cycle, lipid rafts, skeletal muscle.

УДК- 612.831

РАЗРАБОТКА НЕЙРОМОДУЛЯЦИОННЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ РАБОТЫ НИЖНИХ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-21-22

Сысоев Ю. И.^{1,2,3}, Баженова Е. Ю.^{1,2}, Шкорбатова П. Ю.^{1,2},
Ковалев Г. В.¹, Лабетов И. А.¹, Горский О. В.^{1,2},
Шкарупа Д. Д.¹, Мусиенко П.Е.^{1,2,4}.

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет

³ Санкт-Петербургский Государственный Химико-Фармацевтический Университет

⁴ Центр Life Improvement by Future Technologies "LIFT", Москва, Россия

e-mail: susoyev92@mail.com

В экспериментах с использованием хронической модели крысы и острой децеребрированной кошки была изучена сайт-специфичность нейромодуляции детрузора и наружного уретрального сфинктера при эпидуральной электрической стимуляции (ЭЭС) спинного мозга. Полученные результаты могут быть использованы для разработки новых нейромодуляционных подходов для коррекции нарушений работы нижних мочевыводящих путей.

Ключевые слова: нейромодуляция, нижние мочевыводящие пути, травма спинного мозга, уродинамика

Нарушения функции нижних мочевыводящих путей, включая детрузорно-сфинктерную диссинергию и синдром гиперактивного мочевого пузыря, широко распространены среди пациентов с неврологическими заболеваниями. Для ведения таких пациентов предложены хирургические и фармакологические подходы, которые снижают выраженность симптомов и вероятность возникновения осложнений. Однако на сегодняшний день не существует эффективного лечения нейрогенного мочевого пузыря и восстановления нормальной функции мочеиспускания. В нескольких экспериментальных сериях с использованием хронической модели крысы и острой децеребрированной кошки была изучена сайт-специфичность нейромодуляции детрузора и наружного уретрального сфинктера при эпидуральной

электрической стимуляции (ЭЭС) спинного мозга. На обеих экспериментальных моделях было получено, что активация детрузора возникает при стимуляции нижних грудных и верхних поясничных сегментов спинного мозга. Наиболее высокая амплитуда рефлекторных ответов наружного уретрального сфинктера была характерна при стимуляции сакральных отделов. Полученные результаты могут быть использованы для разработки алгоритмов нейромодуляции (например, при использовании нейропротезов) пациентов с урологическими нарушениями после ТСМ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование было выполнено в рамках проектов NRB-RND-2115 (Университет Сириус), 3022925/94030803 (СПбГУ), при поддержке Госпрограммы ГП-47 «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019—2030), тема 0113—2019—0006, а также гранта 22—15—00092 Российского Научного Фонда.

DEVELOPMENT OF NEUROMODULATION STRATEGIES FOR CORRECTION OF LOWER URINARY TRACT DISTURBANCES.

Sysoev Y. I.^{1,2,3}, Bazhenova E. Y.^{1,2}, Shkorbatova P. Y.^{1,2}, Kovalev G. V.¹, Labetov I. A.¹, Gorskii O. V.^{1,2}, Shkarupa D. D.¹, Musienko P. E.^{1,2,4}

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 199034 St. Petersburg, Russia,

² Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University Hospital, St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia

³ Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 197022 St. Petersburg, Russia

⁴ Life Improvement by Future Technologies Center “LIFT”, 143025 Moscow, Russia
e-mail: susoyev92@mail.com

In experiments using a rat chronic model and an acute decerebrated cat, the site-specificity of neuromodulation of the detrusor and external urethral sphincter was studied during epidural electrical stimulation (EES) of the spinal cord. The obtained results can be used to develop new neuromodulation approaches for the correction of disorders of the lower urinary tract.

Key words: neuromodulation, lower urinary tract, spinal cord injury, urodynamics

УДК-612.82

НЕЙРОННЫЕ СИГНАТУРЫ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАЗАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ У ПАЦИЕНТОВ С ДВИГАТЕЛЬНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-23-25

Седов А. С.¹, Томский А. А.²

¹ ФГБУН Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва, Россия.

² ФГАУ “Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н. Н. Бурденко” Минздрава России, Москва, Россия.
e-mail: AlexeyS.Sedov@gmail.com

Аннотация. В докладе будут освещены результаты фундаментальных исследований нейронной активности ядерных структур базальных ганглиев у пациентов с болезнью Паркинсона и дистонией и перспективы их использования для повышения эффективности глубокой стимуляции мозга (DBS).

Ключевые слова: активность одиночных нейронов, локальные потенциалы, базальные ганглии, двигательные нарушения, глубокая стимуляция мозга

Двигательные расстройства представляют собой сложную группу неврологических состояний, характеризующихся избыточными (гиперкинетическими) или ослабленными (гипокинетическими) движениями. Несмотря на широкую распространенность двигательных расстройств, нейрофизиологические механизмы этих болезней остаются неизвестными. В случае неэффективности консервативной терапии наиболее успешным методом лечения являются нейрохирургические операции по имплантации электродов для хронической стимуляции глубоких структур мозга (Deep Brain Stimulation, DBS). Наиболее распространенной хирургической мишенью для лечения болезни Паркинсона является субтламическое ядро (STN). Кроме того, эмпирически установлено, что стимуляция внутреннего сегмента бледного шара (GPi) помогает как при гипокинетическом расстройстве (Болезнь Паркинсона), так и при гиперкинетическом заболевании (дистония). Этот парадокс оста-

ется до сих пор не объясненным в рамках существующих моделей двигательного контроля.

Электрофизиологические микро- и макроэлектродные исследования позволяют не только визуализировать подкорковые структуры мозга, но и изучать патологические паттерны нейронной активности. Эти исследования позволили показать, что повышенная бета активность является электрофизиологическим “биомаркером” болезни Паркинсона [1], а тета-альфа активность — “биомаркером” дистонии [2].

В наших работах мы исследовали сигнатуры патологической активности бледного шара от отдельных нейронов до нейронных популяций. Мы показали, что помимо бета пиков в локальных потенциалах некоторых пациентов обнаруживаются дополнительно спектральные моды в альфа диапазоне. Оказалось, что эти пациенты имели значимо большее значение брадикинезии и имели значимо более низкий клинический эффект от DBS стимуляции [3]. Кроме того, мы обнаружили, что параметры паузно-пачечного типа нейронов, расположенных преимущественно в дорсальных отделах субталамического ядра, показали выраженную корреляцию с тяжестью клинических симптомов болезни Паркинсона [4]. Исследование пациентов с цервикальной дистонией позволило выявить корреляцию параметров нейронной активности бледного шара с клиническим эффектом от DBS стимуляции [5]. Кроме того, мы показали, что у пациентов с выраженной асимметрией активности бледного шара может быть эффективна односторонняя DBS стимуляция [6]. Исследование нейронных реакций интерстициального ядра Кахала и бледного шара позволили получить экспериментальное доказательство интегративной модели цервикальной дистонии, согласно которой происходит дисфункция обратной связи нейронного интегратора, регулирующего положение головы в пространстве [7].

В целом результаты наших исследований показали, что для персонификации и повышения эффективности DBS стимуляции необходимо учитывать электрофизиологические особенности активности мозга пациентов с двигательными нарушениями с учетом их индивидуальной клинической картины.

Список литературы

1. Neumann, W.J., Köhler, R.M., & Kühn, A.A. (2022). A practical guide to invasive neurophysiology in patients with deep brain stimulation. *Clinical Neurophysiology*, 140, 171—180.

2. Piña-Fuentes, D., van Zijl, J. C., van Dijk, J. M. C., Little, S., Tinkhauser, G., Oterdoom, D. M., ... & Beudel, M. (2019). The characteristics of pallidal low-frequency and beta bursts could help implementing adaptive brain stimulation in the parkinsonian and dystonic internal globus pallidus. *Neurobiology of disease*, 121, 47—57.
3. Belova, E., Semenova, U., Gamaleya, A., Tomskiy, A., & Sedov, A. (2023). Excessive α - β Oscillations Mark Enlarged Motor Sign Severity and Parkinson's Disease Duration. *Movement Disorders*.
4. Belova, E. M., Filyushkina, V. I., Dzhhalagoniia, I., Gamaleya, A. A., Tomskiy, A. A., Neumann, W. J., & Sedov, A. (2022). Oscillations of pause-burst neurons in the STN correlate with the severity of motor signs in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 356, 114155.
5. Sedov, A., Popov, V., Gamaleya, A., Semenova, U., Tomskiy, A., Jinnah, H. A., & Shaikh, A. G. (2021). Pallidal neuron activity determines responsiveness to deep brain stimulation in cervical dystonia. *Clinical Neurophysiology*, 132 (12), 3190—3196.
6. Sedov, A., Gamaleya, A., Semenova, U., Medvednik, R., Tomskiy, A., Jinnah, H. A., & Shaikh, A. (2023). Does Pallidal Physiology Determine the Success of Unilateral Deep Brain Stimulation in Cervical Dystonia?. In *Basic and Translational Applications of the Network Theory for Dystonia* (pp. 211—221). Cham: Springer International Publishing.
7. Sedov, A., Usova, S., Semenova, U., Gamaleya, A., Tomskiy, A., Crawford, J. D., ... & Shaikh, A. G. (2019). The role of pallidum in the neural integrator model of cervical dystonia. *Neurobiology of disease*, 125, 45—54.

NEURONAL SIGNATURES OF PATHOLOGICAL BASAL GANGLIA ACTIVITY IN MOVEMENT DISORDERS

Sedov A. S.¹, Tomskiy A. A.²

¹ Semenov Research Center of Chemical Physics Russian Academy of Sciences, Moscow,

² N. N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow, Russia

e-mail: AlexeyS.Sedov@gmail.com

Annotation. The report will highlight the results of fundamental studies of the neuronal activity of the basal ganglia nuclei in patients with Parkinson's disease and dystonia and the prospects for their use to increase the effectiveness of deep brain stimulation (DBS).

Key words: single unit activity, local field potentials, basal ganglia, movement disorders, deep brain stimulation

ЗАВИСИМОСТЬ КОРТИКАЛЬНЫХ ОТВЕТОВ НА СТИМУЛЯЦИЮ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ОТ СОСТОЯНИЙ БОДРСТВОВАНИЯ И СНА: МЭГ-ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-26-28

Клеева Д. Ф.^{1,2}, Григорьева О. А.¹, Гуценко Д. Д.³,
Пигарев И. Н.³, Осадчий А. Е.^{1,2}

¹ Центр биоэлектрических интерфейсов НИУ ВШЭ, Россия,

² Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА РФ, Россия,

³ Институт проблем передачи информации имени А. А. Харкевича РАН, Россия,

⁴ Исследовательский институт искусственного интеллекта (AIRI), Россия

e-mail: dkleeva@gmail.com

Аннотация. Описываемое исследование явилось первым подтверждением висцеральной теории сна И. Н. Пигарева с участием людей. В соответствии с теорией наблюдалась характерная с точки зрения локализации активация коры в ответ на электрическую стимуляцию ЖКТ в глубокой стадии сна, но не в бодрствовании.

Ключевые слова: сон, МЭГ, висцеральная теория сна, стимуляция, interoцепция

Текст:

В последние десятилетия взаимодействие между мозгом и внутренними органами стало предметом усиленного изучения. Исследования показали, что внутренние органы, являясь электрически пейсмейкерами, могут влиять на активность мозга [1, 2]. Предполагается, что эта связь между мозгом и внутренними органами играет важную роль в гомеостатической и аллостатической регуляции организма. Важным наблюдением оказалось то, что вызванные ответы коры на стимуляцию внутренних органов наблюдались исключительно в глубокой стадии сна, что заложило основу для формулировки висцеральной теории сна И. Н. Пигарева [3]. Теория предполагает, что нейроны коры, в состоянии бодрствования обрабатывающие сигналы от внешней среды, в состоянии глубокого сна переключаются на обработку сигналов от внутренних органов, что

обеспечивает стабилизацию их функционирования. Описываемое исследование было призвано впервые изучить активность мозга людей во время стимуляции внутренних органов в различных стадиях сна и бодрствования.

В рамках эксперимента осуществлялась регистрация магнитоэнцефалографии (МЭГ) трех здоровых участниц во время сна. Перед экспериментом они принимали таблетку автономного электростимулятора ЖКТ «Sibirium-Fe», обеспечивающую периодическую стимуляцию кишечника. Регистрация МЭГ проводилась в состоянии бодрствования перед приемом таблетки и в течение нескольких часов в состоянии сна после приема. Стадии сна определялись с помощью автоматизированного классификатора [4]. После выделения эпох, связанных со стимуляцией, был проведен анализ вызванной активности и реконструкция этой активности в пространстве источников с использованием статистической обработки на основе пермутационных тестов. В результате исследования была выявлена значимая вызванная активность, возникающая в ответ на стимуляцию, в трех стадиях сна (N1, N2, N3), но не в состоянии бодрствования. Эта активность включала ранние ответы в течение 0.5 секунды после окончания стимуляции, поздние ответы за 1—0.5 секунд до начала стимуляции, а также медленные ответы, напоминающие SCP (slow cortical potentials). Основные области вызванных ответов находились в височных, теменных и центральных сенсорных зонах. Наиболее выраженные вызванные ответы были обнаружены в стадии медленного сна (N3). Они характеризовались большей латерализованностью в сравнении с ответами, наблюдавшимися в более ранних стадиях сна и локализуемых в субпаритетальных регионах.

В рамках исследования были обнаружены свидетельства кортикальной обработки висцеральных сигналов ЖКТ человека во время глубокого сна. Активация обнаруженных областей мозга, включая островок, среднюю фронтальную извилину и предклинье, может свидетельствовать о перераспределении функций во сне. Также динамика обнаруженных ответов может свидетельствовать о том, что медленные волны, характерные для глубокого сна, могут модулироваться висцеральной стимуляцией и участвовать в гомеостатической обработке. Несмотря на то что полученные результаты находятся в соответствии с висцеральной теорией сна, ряд методических ограничений (среди которых возможность наличия вторичных медленноволновых артефактов на МЭГ, порождаемых меха-

ническим перемещением таблетки и др.) требует дополнительной валидации экспериментального дизайна, чему и будут посвящены дальнейшие исследования.

Список литературы

1. *Azzalini D., Rebollo I., Tallon-Baudry C.* Visceral signals shape brain dynamics and cognition//Trends in cognitive sciences. — 2019. — Т. 23. — №. 6. — С. 488—509.
2. *Levichkina E. V. et al.* The mysterious island: insula and its dual function in sleep and wakefulness//Frontiers in systems neuroscience. — 2021. — Т. 14. — С. 592660.
3. *Pigarev I. N. et al.* Cortical visual areas process intestinal information during slow-wave sleep//Neurogastroenterology & motility. — 2013. — Т. 25. — №. 3. — С. 268-e169.
4. *Vallat R., Walker M. P.* An open-source, high-performance tool for automated sleep staging//Elife. — 2021. — Т. 10. — С. e70092.

DEPENDENCE OF CORTICAL RESPONSES TO VISCERAL STIMULATION ON WAKEFULNESS AND SLEEP STAGES: MEG STUDY

Kleeva D. F.^{1,2}, Grigoreva O. A.¹, Gutsenko D. D.³,
Pigarev I. N.³, Ossadtchi A. E.^{1,2,4}

¹ Center for Bioelectric interfaces, HSE, Russia,

² FMBA Center for brain and neurotechnology, Russia,³ The Institute for Information Transmission Problems of Russian Academy of Sciences, Russia,⁴ Artificial intelligence research institute, Russia

Annotation. The described study became the first confirmation of I. N. Pigarev's visceral theory of sleep involving human participants. In line with the theory, a distinct cortical activation pattern was observed in response to electrical stimulation of the gastrointestinal tract during deep sleep but not during wakefulness.

Key words: sleep, MEG, visceral theory of sleep, stimulation, interoception

ХЕМО- И ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ И ТЕРАПИИ ПАТОЛОГИЙ МОЗГА

DOI 10.24412/CL-37124-2023-29-32

Подгорный О. В.^{1,2,3}, Мухаметшина Л. Ф.^{1,4},
Солотёнков М. А.⁴, Джэппи Д.³, Калиниченко А. Л.¹,
Цопина А. С.⁴, Мальцев Д. И.^{1,3}, Ланин А. А.^{4,5},
Круть В. Г.³, Федотов И. В.^{4,5}, Солюс Г. М.¹,
Елесина Е. А.^{1,4}, Федотов А. Б.^{4,5}, Вагабов М. М.^{1,4},
Соколов Р. А.², Петухова Е. О.¹, Ахмедова М. А.²,
Пурик А. А.² Мощенко А. А.³, Розов А. В.³,
Жёлтиков А. М.⁶, Белоусов В. В.^{1,2,3,7}

¹ Институт биоорганической химии им. ак. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия,

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия,

³ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва, Россия,

⁴ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия,

⁵ Российский квантовый центр, Сколково, Россия,

⁶ Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station TX, USA,

⁷ Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center, Skolkovo, Moscow, Russia

e-mail: olegpodgorny@inbox.ru

Аннотация. Исследование демонстрирует разработку и применение инструментов хемо- и термогенетики для воссоздания нейропатологических состояний и неинвазивного управления активностью нервных клеток.

Ключевые слова: синтетические нейротехнологии, хемогенетика, термогенетика, окислительный стресс, TRP каналы.

Благодаря развитию генно-инженерных подходов появились синтетические нейротехнологии. К таким технологиям относятся молекулярные инструменты на основе природных или генно-инженерных белков с уникальными свойствами, которых в норме нет в клетках мозга. Доставив такие белки в мозг и используя их уникальные свойства, мы можем управлять работой мозга посредством манипулирования функциями и метаболизмом отдельных клеток.

Наиболее яркими примерами таких синтетических нейротехнологий являются опто-, хемо- и термогенетика. Эти технологии объединены общим принципом. Сначала в целевые клетки доставляется природный или генно-инженерный белок-актуатор, который в отсутствие специфического для него внешнего воздействия не проявляет своих свойств. Затем при приложении внешнего воздействия этот белок активируется, в результате чего в клетках запускаются определенные процессы, проводящие к изменению в функционировании клеток мозга. Внешним воздействием в случае оптогенетики является свет, в случае хемогенетики — биологически инертный лиганд, а в случае термогенетики — изменение температуры. Высокая пространственная и временная избирательность синтетических нейротехнологий делает их перспективными инструментами для терапии и моделирования патологий мозга.

Мы используем хемогенетический инструмент на основе оксидазы D-аминокислот (DAAO) для моделирования таких патологических состояний мозга, как возрастная деменция, а также болезни Альцгеймера и Паркинсона. DAAO является стереоспецифическим ферментом, катализирующим реакцию окислительного дезаминирования D-аминокислот. В результате этой реакции в качестве побочного продукта образуется пероксид водорода, одна из самых стабильных молекул, относящихся к активным формам кислорода. Экспрессируя DAAO в определенных популяциях клеток мозга экспериментальных животных с использованием рекомбинантных аденоассоциированных вирусов и доставляя в ткани мозга субстрат DAAA В-аминокислоту, мы создаем избыток пероксида водорода в клетках, воссоздавая условия изолированного окислительного стресса. Наши исследования с использованием DAAO показывают, что хемогенетически вызванный окислительный стресс влияет на синаптические функции нервных клеток и кальциевую активность в астроцитах. Полученные нами результаты позволяют в дальнейшем использовать инструмент на основе DAAO для выяснения роли окислительного стресса клеток мозга в патогенезе ненаследственных форм болезней Альцгеймера и Паркинсона, а разработанные на основе этого фермента модели на животных могут быть применены для тестирования новых терапевтических подходов, замедляющих или предотвращающих нейродегенерацию при этих заболеваниях.

Возможность быстро и неинвазивно модулировать активность определенных групп нейронов мозга является перспективным те-

рапевтическим подходом при таких нейропатологиях, как болезнь Паркинсона и эпилепсия. В этой связи термогенетика на основе термочувствительного катионного канала TRPV1 человека является многообещающей технологией, транслируемой легко в медицину. По нашим данным этот канал может быть активирован быстрыми нагревами клеток в диапазоне температур ниже 43 град С. Проведенные нами эксперименты также показали, что нагрев нейронов мозга экспериментальных животных, которым был введен аденоассоциированный вирус с последовательностью ДНК, кодирующей TRPV1 человека, излучением инфракрасного лазера запускает двигательную активность. Применение в будущем фокусного ультразвука высокой интенсивности сделает термогенетику неинвазивным методом модуляции активности нервных клеток. Нами проводятся исследования, направленные на демонстрацию принципиальной возможности подавления эпилептиформной активности путем термогенетической стимуляции интернейронов, в которые была доставлена последовательность ДНК, кодирующая канал TRPV1 человека.

Проект поддержан Программой развития генетических технологий на 2019—2027 годы Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075—15—2019—1789, а также грантами РНФ №№ 23—15—00295, 23—75—30023, № 22—22—00590.

CHEMO- AND THERMOGENETIC TOOLS FOR MODELING AND THERAPY OF BRAIN DISEASES

Podgorny O. V.^{1,2,3}, Mukhametshina L. F.^{1,4},
Solotnikov M. A.⁴, Jappy D.⁴, Kalinichenko A. L.¹,
Tsopina A. S.⁴, Maltsev D. I.^{1,3}, Lanin A. A.^{4,5}, Krut V. G.³,
Fedotov I. V.^{4,5}, Solius G. M.¹, Elesina E. A.^{1,4}, Fedotov A. B.^{4,5},
Vagabov M. M.^{1,4}, Sokolov R. A.², Petukhova E. O.¹,
Akhmedova M. A.², Purik A. A.², Moschenko A. A.³,
Rozov A. V.³, Zheltikov A. M.⁶, Belousov V. V.^{1,2,3,7}

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia,

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia,

³ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies FMBA, Moscow, Russia,

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia,

⁵ Russian Quantum Center, Skolkovo, Russia,

⁶ Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station TX, USA,

⁷ Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center, Skolkovo, Moscow, Russia
e-mail: olegpodgorny@inbox.ru

Abstract: The study demonstrates the development and application of chemo- and thermogenetic tools for modelling neuropathological states and non-invasive control of neuronal activity.

Key words: synthetic neurotechnologies, chemogenetics, thermogenetics, oxidative stress, TRP channels.

УДК 543.51

ВЫЯВЛЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ В ЗОНЕ ИНФИЛЬТРАЦИИ АНАПЛАСТИЧЕСКИХ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

DOI 10.24412/CL-37124-2023-33-35

Пеков С. И.^{1,2,3}, Сорокин А. А.², Деркач М. М.²,
Елиферов В. А.², Попов И. А.^{2,3}

¹ Сколковский институт науки и технологии, Москва, Россия,

² Московский физико-технический институт, Москва, Россия,

³ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия.

e-mail: stanislav.pekov@forwe.ru

Аннотация. Масс-спектрометрическая визуализация является критически важной технологией, позволяющей анализировать образцы высокогетерогенных тканей, получаемых из зоны инфильтрации глиальной опухоли, и получать метаболический портрет клеток различных типов внутри одного образца.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, глиома, молекулярное профилирование, липидный метаболизм.

Существенную роль в процессе инфильтрации опухолевых клеток в процессе их инфильтрации играют изменения метаболизма, отличающие опухолевую клетку от здоровой. Хотя общие мотивы этих изменений, получившие название эффекта Варбурга, хорошо известны, большая часть исследований проводится использованием клеточных культур, либо модельных животных. Такой подход не позволит исследовать реальный метаболический и липидный профиль опухолей, растущих в физиологическом окружении и отличающихся широкой генетической вариабельностью, характеризующей опухоли человека. В свою очередь, анализ клинического материала позволяет получать данные о метаболическом портрете опухолевых тканей с учетом их естественной биологической вариабельности. Однако, для анализа большого объема разнообразных данных требуется разработка высокопроизводительных методов исследования образца, что становится возможным, в частности,

с применением подходов прямой масс-спектрометрии. В данной работе рассматривается совместное применение различных масс-спектрометрических подходов к задаче исследования трансформации липидного состава клеточных мембран в зоне инфильтрации на границе глиальных опухолей человека.

В работе проводилось исследование образцов опухолевых тканей, иссеченных в процессе планового нейрохирургического вмешательства по резекции глиальных опухолей III и IV степеней злокачественности в НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко. Образцы тканей подвергались высокопроизводительному молекулярному профилированию с использованием метода прямой масс-спектрометрии ICE-MS, пространственно-разрешенной масс-спектрометрической визуализации, а также анализировались с использованием тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Полученные данные обрабатывались при помощи ряда математических моделей, включая построенные с использованием методов интерпретируемого машинного обучения с целью выявления молекулярных сигнатур, характеризующих изменения в липидном составе глиальных опухолей.

Полученные результаты показывают, что в процессе малигнизации в тканях снижается содержание полиненасыщенных фосфатидилхолинов. Кроме того, обнаруживается снижение содержания полностью насыщенных фосфатидилхолинов и одновременное снижение доли фосфатидилэтаноламинов. Фосфолипиды, содержание которых значимо увеличивается в процессе малигнизации, представлены моно- и диненасыщенными липидами с относительно короткими жирнокислотными остатками, что подтверждает и расширяет предположения об изменении липидного метаболизма в процессе роста и развития глиальных опухолей, выявляемые при анализе клеточных культур. Наблюдаемые отличия оказываются связаны как непосредственно с сокращением поступления полиненасыщенных жирных кислот, так и с перераспределением доступных жирных кислот между фосфолипидами и триглицеридами в целях обеспечения опухолевых клеток энергией посредством бета-окисления липидов. Изучение пространственного распределения различных липидных маркеров позволяет глубже понять метаболические процессы, происходящие в процессе инфильтрации опухоли в окружающие ткани.

Исследование выполнено за счёт средств гранта Российского научного фонда (проект № 23—69—10035).

METABOLIC ALTERATIONS DISCOVERY WITHIN ANAPLASTIC GLIAL TUMORS INFILTRATION REGIONS

Pekov S. I.^{1,2,3}, Sorokin A. A.², Derkach M. M.²,
Elifirov V. A.², Popov I. A.^{2,3}

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia,

² Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia,

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia.

Annotation. Mass spectrometry imaging is a crucial technology for investigating samples of highly heterogeneous tissues from the infiltration regions of glial tumors, which allows for determining the metabolic portrait of cells of various types within a single sample.

Key words: mass spectrometry, glioma, molecular profiling, lipid metabolism

РОЛЬ СЕЛЕКТИВНОЙ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ В ИЗМЕНЕНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНО- ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО БАЛАНСА И ОБЕСПЕЧЕНИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА

DOI 10.24412/CL-37124-2023-36-40

Винокуров А. Ю.¹, Серегина Е. С.¹,
Камынина А. В.², Абрамов А. Ю.^{1,3}

¹ Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева, Орел, Россия,

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва, Россия,

³UCL Queen Square Institute of Neurology, London, UK
e-mail: vinokurovayu@oreluniver.ru

Аннотация. селективно связывающиеся с RAGE фрагменты V-домена рецептора увеличивают производство активных форм кислорода за счет прямой активации НАДФН-оксидаз, которая не вызывает снижения жизнеспособности клеток первичной смешанной культуры коры головного мозга, но снижают токсический эффект бета-амилоида.

Ключевые слова: фрагменты RAGE, активные формы кислорода, НАДФН-оксидаза, бета-амилоид.

RAGE — это преимущественно трансмембранный гликопротеин типа I, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов [1]. Рецептор может существовать в виде нескольких изоформ, наиболее изученным из которых является полноразмерная молекула, состоящая из трех доменов: внеклеточного лигандсвязывающего, одинарной трансмембранной спирали и С-терминального короткого домена, при этом последний не обладает ферментативной активностью, но играет важную роль для передачи сигналов. Известны другие мембранные формы, отличающиеся той или иной степенью деградации цитоплазматического С-концевого фрагмента. Деградация связанного с мембраной участка обуславливает существование растворимой формы RAGE [2].

Увеличение экспрессии RAGE выявлено при различных патологиях, включая болезнь Альцгеймера (БА), ишемические повреждения мозга, системный амилоидоз, развитие опухолей и ряда других [1, 3, 4]. В то же время отмечается, что RAGE является регулятором ряда процессов, обуславливающих выживаемость клеток, в частности, рост нейронов, воспалительные реакции, элиминации апоптотических клеток [5]. Помимо этого показано, что активация рецептора может регулировать развитие кальциевых сигналов в нейронах посредством обеспечения высвобождения глутамата из астроцитов и последующего стимулирования NMDA и AMPA/каинатных рецепторов [6]. Исследованиями показано, что при БА уровень экспрессии гена RAGE положительно коррелирует со степенью тяжести заболевания [7]. Однако при этом остается вопросом, является ли это составляющей патологического процесса или же инструментом, обеспечивающим снижение уровня повреждений структур головного мозга. Отчасти это связано с мультилигандным характером RAGE. Его активация может происходить в результате связывания с широким набором лигандов, включая конечные продукты гликирования белков (AGEs), белок HMGB1, бета-амилоид (β A), молекулы ДНК, лизофосфатидную кислоту, молекулы семейства S100 [1, 2]. Для последних, в частности, известны такие эффекты в отношении астроцитов, олигодендроцитов и нейронов как стимулирование роста, пролиферации, защиты от повреждения активными формами кислорода (АФК) и ряд других [8]. Кроме того защитный эффект в моделях БА, который является результатом связывания с β A, показан для пептидов — полученных синтетическим путем фрагментов RAGE [9, 10]. Затруднения в поиске ответа на вопрос о роли RAGE в физиологии и патологии во многом связано с мультифункциональностью и, соответственно, различными механизмами воздействия его лигандов на внутриклеточные процессы. В частности, β A способен вызывать токсический эффект и в результате неспецифического связывания с клеточной мембраной или проникновения внутрь клетки [6].

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение действия ряда синтетических пептидов разной длины — фрагментов участка V-домена RAGE, для некоторых из которых уже показана специфическая способность к связыванию с рецептором [6] с тем, чтобы определить соединения с наиболее высокой агонистической активностью, а также выявить характер воздействия на клетки посредством одного из показанного для RAGE механизма — стимулирования продукции АФК.

Исследования влияния пептидов на образование АФК выполнены как на переживающих срезах, так и первичных смешанных нейроглиальных культурах коры головного мозга методом конфокальной микроскопии (ZEISS LSM 900) с использованием окисляющегося преимущественно супероксид-анионом и приобретающего в результате этого способность к флуоресценции зонда дигидроэтидий (HEt) (максимум поглощения 530 нм). Показано, что одинаковые по длине, но отличающиеся наличием/отсутствием защитных групп соединения (60—76) (пептид 1) и Ac- (60—76)-NH₂ (пептид 6) способны к значительному увеличению скорости образования АФК относительно базового уровня, взятого за 100 % (220 % и 480 % соответственно). При этом более короткий фрагмент (60—62) не оказал никакого влияния и был использован в последующих экспериментах в качестве контроля.

Нивелирование стимулирующего эффекта в присутствии хлорида дифенилгидония (DPI) (0,5 мкМ), ингибирующего НАДФН-оксидазы, и отсутствие влияния оксипуринола (20 мкМ), блокирующего ксантиноксидазу, свидетельствует о том, наиболее вероятной причиной увеличения скорости окисления HEt является активация первой группы ферментов.

С учетом того, что наблюдаемый эффект увеличения продукции АФК может быть обусловлен как прямым влиянием активированного RAGE, так и опосредован более сложными сигнальными механизмами с альтернативными путями запуска, были выполнены исследования с применением селективного антагониста RAGE FPS-ZM1 (1 мкМ), а также CNQX (10 мкМ) и МК-801 (10 мкМ), блокирующих AMPA/каинатные и NMDA рецепторы соответственно. Присутствие двух последних соединений не оказывало снижающего эффекта на способность пептидов 1 и 7 к ускорению окисления HEt. В то же время под влиянием FPS-ZM1 происходило полное исключение гиперпродукции АФК при сохранении способности НАДФ-оксидазы к активации при последующем добавлении форболового эфира.

Анализ скорости перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также сравнительная оценка уровня восстановленного глутатиона (GSH) с применением зондов C-11 BODIPY 581/591 и монохлорбиман соответственно не обнаружил признаков окислительного стресса в случае пептида 6, а также выявил ускорение ПОЛ (187 % от базового уровня) и снижение содержания GSH (75 % от контроля) после воздействия пептида 1. Однако отсутствие статистически значимых отличий изменения содержания некротических клеток,

выявленное с помощью двойного окрашивания йодидом пропидия и Hoechst 33342, свидетельствует о том, что активация продукции АФК под влиянием исследуемых фрагментов RAGE не приводит к ассоциированным с клеточной гибелью повреждениям.

С учетом того, что обусловленная βА токсичность части связана с гиперпродукцией АФК и развитием окислительного стресса, были проведены исследования влияния активации RAGE на жизнеспособность клеток смешанной нейроглиальной культуры при инкубировании в присутствии βА 1—40 (10 мкМ). На фоне значительного увеличения доли окрашенных йодидом пропидия клеток в присутствии только βА (26 % некротических клеток) дополнительная обработка пептидом 1 приводила к снижению этого параметра до уровня 15 %, сопоставимого с контрольной культурой без какого-либо воздействия.

Таким образом, синтетические пептиды (60—76) и Ac- (60—76)-NH₂ — фрагменты V-домена RAGE выступают селективными агонистами данного рецептора, вызывающими непосредственную активацию НАДФН-оксидазы. Происходящие при этом изменения уровня продукции АФК не приводят к патологическим для клеток последствиям и, вероятно, являются элементом физиологических процессов, обуславливающих жизнеспособность клеток головного мозга в условиях стресса.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075—15—2022—1095.

Список литературы

1. Успенская, Ю.А. и др. Лиганды RAGE-белков: роль в межклеточной коммуникации и патогенеза воспаления. Вестник РАМН **70**, 694—703 (2015).
2. Ding, Q. & Keller, J.N. Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain. *Biochim. Biophys. Acta — Mol. Cell Res.* **1746**, 18—27 (2005).
3. Askarova, S., Yang, X., Sheng, W., Sun, G. Y. & Lee, J. C. Role of AB-RAGE Interaction in Oxidative Stress and cPLA2 Activation in Astrocytes and Cerebral Endothelial Cells. 375—385 (2011).
4. Muhammad, S. *et al.* The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage. *J. Neurosci.* **28**, 12023—12031 (2008).
5. Kierdorf, K. & Fritz, G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 55—68 (2013).

6. Kamynina, A. *et al.* Activation of RAGE leads to the release of glutamate from astrocytes and stimulates calcium signal in neurons. *J. Cell. Physiol.* **236**, 6496—6506 (2021).
7. Leclerc, E., Sturchler, E. & Vetter, S. W. The S100B/RAGE axis in Alzheimer's disease. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* **2010**, (2010).
8. Donato, R. *et al.* Functions of S100 Proteins. *Curr. Mol. Med.* **13**, 24—57 (2012).
9. Volpina, O. M. *et al.* Synthetic Fragment of Receptor for Advanced Glycation End Products Prevents Memory Loss and Protects Brain Neurons in Olfactory Bulbectomized Mice. *J. Alzheimer's Dis.* **61**, 1061—1076 (2018).
10. Kamynina, A. V. *et al.* Synthetic Fragments of Receptor for Advanced Glycation End Products Bind Beta-Amyloid 1—40 and Protect Primary Brain Cells From Beta-Amyloid Toxicity. *Front. Neurosci.* **12**, 1—9 (2018).

THE ROLE OF SELECTIVE ACTIVATION OF RECEPTOR FOR ADVANCED GLUCATION ENDPRODUCTS IN REDOX BALANCE AND VIABILITY OF BRAIN CELLS

Vinokurov A. Y.¹, Seryogina E. S.¹,
Kamynina A. V.², Abramov A. Y.^{1,3}

¹ Orel State University, Orel, Russia,

² Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia,

³ UCL Queen Square Institute of Neurology, London, UK

Annotation. fragments of the RAGE V-domain selectively bind to the receptor and increase the production of reactive oxygen species due to direct activation of NADPH oxidases, which does not lead to a decrease in the viability of the primary cortical co-culture, but reduces the toxic effect of beta-amyloid.

Key words: RAGE fragments, reactive oxygen species, NADPH-oxidase, beta-amyloid.

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ IN VIVO ИССЛЕДОВАНИЙ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-41-42

Костюк А. И.^{1,2}, Иванова А. Д.¹, Сергеева А. Д.^{1,3},
Раевский Р. И.^{1,2}, Котова Д. А.¹, Кельмансон И. В.¹,
Панова А. С.¹, Храмова Ю. В.^{3,1}, Катруха В. А.^{1,3},
Трифонов А. П.¹, Судоплатов М. А.¹, Чебаненко В. В.^{3,1},
Почечуев М. С.³, Чеботарев А. С.^{3,4}, Ланин А. А.^{3,4},
Федотов И. В.^{3,4}, Тяглик А. Б.^{1,3}, Федотова А. А.^{3,1},
Морозова К. И.³, Семьянов А. В.^{1,3}, Браже Н. А.^{3,1},
Федотов А. Б.^{3,4}, Белоусов В. В.^{1,2,5}, Билан Д. С.^{1,2}

¹ Институт биоорганической химии. им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва,

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва,

³ Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Москва,

⁴ Российский Квантовый Центр, Сколково, Москва,

⁵ Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Федеральное медико-биологическое Агентство, Москва.

e-mail: d. s.bilan@gmail.com

Генетически кодируемые биосенсоры на основе флуоресцентных белков представляют мощный инструментарий для исследования биологических процессов в норме и патологии в системах различного уровня сложности: от единичных клеток и их компартов до органов трансгенных организмов.

В докладе представлены некоторые новинки, недавно пополнившие коллекцию биосенсоров. Биосенсоры семейства Нурocrates (от Нурochlorite Ratiometric Sensors) были разработаны для визуализации таких важных маркеров воспаления, как хлорноватистая кислота, бромноватистая и гипотиоциановая, которые образуются в результате пероксидазных реакций в иммунных клетках, например, нейтрофилах и базофилах, а также некоторых тканевых макрофагах. Данные реакции протекают и в микроглии, что делает биосенсоры данного типа интересными для исследователей воспалительных механизмов в тканях нервной системы. Биосенсоры

Нурократы успешно зарекомендовали себя как в культурах фагоцитирующих клеток, так и в моделях *in vivo*, например, в тканях рыб *Danio rerio* при воспалительных реакциях, вызванных механическим повреждением или бактериальной инфекцией. Другой биосенсор, разработанный нашей командой, позволяет регистрировать в живых системах динамику ацил-КоА — важного метаболита жирных кислот. По аналогичному принципу, основанному на подборе белкового домена, выступающего в роли природного сенсора в определенных микроорганизмах, и интегрировании в такую структуру флуоресцентного белка, нам удалось разработать биосенсор для оценки в живых системах динамики полисульфидов.

Генетически кодируемые биосенсоры открывают широкие возможности для исследования сложных биологических процессов с использованием различных моделей, позволяя установить, какая из этих моделей лучше отражает реальную картину происходящего. Например, при использовании соответствующих биосенсоров *SypHer3s* и *HyPer7* мы сравнили, как условия гипоксии влияют на динамику ацидоза и продукции пероксида водорода в нейрональной культуре, в тканях нервной системы рыб *Danio rerio*, а также в центральной зоне ишемического инсульта у крыс. Во всех моделях ограничение кислорода вызывало динамичное закисление клеток. Однако незначительная продукция пероксида водорода в острой фазе гипоксии или ишемии была зарегистрирована лишь в моделях *in vivo*. Мы также показали, что гипергликемический статус не влияет на динамику пероксида водорода при ишемическом инсульте как в острой фазе, так и в последующие сутки, при этом высокий уровень глюкозы значительно усугубляет последствия этого патологического процесса. Кроме того, описываемые подходы позволяют сравнивать динамику наблюдаемых процессов в разных типах клеток исследуемой ткани.

Таким образом, благодаря гибкости в применении генетически кодируемых инструментов (выбор модельного организма, типа клеток и их компартментов) подобные платформы исследований позволяют реализовывать широчайший спектр задач.

При поддержке грантов РФФИ 22—15—00299, 23—75—30023

УДК 612.8, 57.084, 576.3

ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ ЛОКОМОТОРНОЙ ФУНКЦИИ СВОБОДНОПОДВИЖНЫХ МЫШЕЙ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-43-46

Мальцев Д. И.^{1,2,3}, Солотёнков М. А.⁴, Мухаметшина Л. Ф.^{1,4}, Цопина А. С.⁴, Ланин А. А.^{4,5}, Федотов И. В.^{4,5}, Солюс Г. М.¹, Федотов А. Б.^{4,5}, Мощенко А. А.³, Жёлтиков А. М.⁶, Подгорный О. В.^{1,2,3}, Белоусов В. В.^{1,2,3,7}

¹ Институт биоорганической химии им. ак. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия,

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия,

³ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва, Россия,

⁴ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия,

⁵ Российский квантовый центр, Сколково, Россия,

⁶ Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station TX, USA,

⁷ Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center, Skolkovo, Moscow, Russia

e-mail: maltsev.d@fccps.ru

Аннотация.

В своей работе мы проверяем возможность использования TRPV1 человека для термогенетической модуляции локомоторной активности мышей. Доставку генетических конструкций с TRPV1 и GCamp6s в cuneiform nucleus и установку ферулы с оптоволокном выполняли с помощью стереотаксической операции. Нагрев с помощью ИК-лазера вызывал достоверное увеличение локомоторной активности у животных. При этом заметный эффект достигается при температурах в физиологическом диапазоне значений.

Ключевые слова: термогенетика, катионные TRP-каналы, нейрональная активность

Белки надсемейства TRP (transient receptor potential channel) представляют собой консервативные мембранные катионные каналы, которые могут менять мембранный потенциал или концентрацию внутриклеточного кальция в ответ на внешнее воздействие [1]. Семейство TRPV было выделено на основе чувствительности к молекулам ваннилоидного типа, а TRPV1 был определен как рецептор

капсаицина [2]. Температурная чувствительность канала TRPV1 человека позволяет использовать его для управления активностью нейронов мозга теплокровных животных, используя ИК-излучение или сфокусированный ультразвук [3]. В сочетании с адресной доставкой в определенные группы клеток или области мозга с помощью аденоассоциированных векторов такой подход выглядит многообещающим по сравнению со ставшими уже традиционными методами оптогенетики.

В своей работе мы оценили возможности термогенетической стимуляции повлиять на локомоторные функции мышей. Для этого мы стереотаксически вводили аденоассоциированные векторы, содержавшие TRPV1 и GCaMP6s в область cuneiform nucleus мышей и устанавливали керамический коннектор с оптоволоконном для проведения ИК-излучения в область стимуляции и оценки сигнала кальциевого сенсора в ответ на активацию TRPV1. Через две недели после операции измеряли флуоресцентный ответ кальциевого сенсора GCaMP6s на нагрев в находящейся под оптоволоконном области мозга, а так же оценивали изменение температуры тканей в зависимости от используемой мощности ИК-лазера. Для этого мы провели серию отдельных экспериментов с использованием модифицированных оптоволокон, на конце которых находились микроалмазы с NV-центрами, способные выполнять роль датчиков изменения температуры [4]. Нагрев проводили ИК-лазером 1348 нм и регистрировали изменения температуры нагреваемой области мозга в реальном времени с использованием температурно-зависимого сдвига частоты оптически обнаруженного магнитного резонанса, вызванного связью микроволнового поля с NV-центрами в алмазе на конце оптоволоконного зонда [4,5]. Мы определили совпадение теоретических расчетов подаваемой мощности лазерного излучения с реальным изменением температуры в области нагрева. Статистически достоверные отличия в повышении уровня кальция возникали при изменении температуры на 3 градуса, в то время как у контрольных животных без индуцированной экспрессии TRPV1 флуоресцентный сигнал от GCaMP6s не менялся даже при нагреве ткани мозга на 12 градусов. Чтобы оценить влияние термогенетической стимуляции на активность нейронов, измеряли скорость движения мышей в свободном поле. Индукцию проводили трехкратным включением ИК-лазера на 20 секунд с периодами релаксации по 30 секунд. Измерения проводили в различных режимах изменения температуры — на 3 градуса, на 7 градусов

и на 12 градусов. Скорость движения мышей при нагреве на 3 градуса не менялась по сравнению с контрольной группой, в то время как нагрев на 7 или 12 градусов менял скорость мышей с 2—3 см/сек до 10—15 см/сек.

Таким образом, мы демонстрировали возможности термогенетической стимуляции активности нейронов и влияние на локомоторную функцию свободноподвижных мышей. Полученные данные указывают на перспективность такого рода исследований.

Проект поддержан Программой развития генетических технологий на 2019—2027 годы Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075—15—2019—1789, грантами РНФ №№ 23—15—00295 и 22—22—00590.

Список литературы

1. Samanta A., Hughes T. E. T., Moiseenkova-Bell V. Y. Transient Receptor Potential (TRP) Channels//Subcell Biochem. 2018. Vol. 87. P. 141—165.
2. Caterina M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway//Nature. 1997. Vol. 389, № 6653. P. 816—824.
3. Bernstein J. G., Garrity P. A., Boyden E. S. Optogenetics and thermogenetics: technologies for controlling the activity of targeted cells within intact neural circuits//Current Opinion in Neurobiology. 2012. Vol. 22, № 1. P. 61—71.
4. Fedotov I. V. et al. Fiber-optic control and thermometry of single-cell thermosensation logic: 1//Sci Rep. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 5, № 1. P. 15737.
5. Lanin A. A. et al. Fiber-optic electron-spin-resonance thermometry of single laser-activated neurons//Opt. Lett., OL. Optica Publishing Group, 2016. Vol. 41, № 23. P. 5563—5566.

THE APPLICATION OF THERMOGENETICS TO INDUCE LOCOMOTOR ACTIVITY IN MICE

Maltsev D. I. ^{1,2,3}, Solotenkov M. A. ⁴, Mukhametshina L. F. ^{1,4}, Tsopina A. S. ⁴, Lanin A. A. ^{4,5}, Fedotov I. V. ^{4,5}, Solius G. M. ¹, Fedotov A. B. ^{4,5}, Moschenko A. A. ³, Zheltikov A. M. ⁶, Belousov V. V. ^{1,2,3,7}

- ¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia,
² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia,
³ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies FMBA, Moscow, Russia,
⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia,
⁵ Russian Quantum Center, Skolkovo, Russia,
⁶ Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station TX, USA,
⁷ Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center, Skolkovo, Moscow, Russia
e-mail: maltsev.d@fccps.ru

Annotation. In our work we test the possibility of using human TRPV1 for thermogenetic modulation of locomotor activity in mice. Delivery of genetic constructs with TRPV1 and GCamp6s into the cuneiform nucleus and installation of a ferrule with optical fiber was performed using stereotactic surgery. Heating with an IR laser caused a significant increase in locomotor activity in animals. At the same time, a noticeable effect was achieved at temperatures in the physiological range of values.

Key words: thermogenetic, TRP-channels, neuronal activity

УДК 577.25; 591.181; 611.018.8

КОНТРОЛЬ ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОТОПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕЙ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-47-52

Николаев М. В.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия
e-mail: fmedfstud@gmail.com

Аннотация. Ионные каналы — мембранные белки, которые играют ключевую роль в процессах передачи и обработки информации в нервной системе. Молекулярные фотопереклюатели — это современные инструменты в арсенале экспериментальной нейрофизиологии для быстрого локального контроля активности ионных каналов. Мы разработали серию фотопереклюателей лиганд-управляемых ионных каналов, рецепторов глутамата. Вещества представляют собой производные четвертичного аммония, содержащие в качестве светочувствительного элемента группу азобензола. Действие соединений охарактеризовано на нативных глутаматных рецепторах пирамидных клеток гиппокампа и гигантских интернейронов стриатума (метод пэтч-кламп, конфигурация «целая клетка», режим фиксации потенциала). В присутствии веществ в условиях комнатного освещения токи через ионные каналы угнетаются, но при облучении препарата монохроматическим светом (420—460 нм) активность соединений резко снижается. Фотопереключение быстрое и полностью обратимое. Непременным условием высокой антагонистической активности соединений является наличие одного или нескольких положительно заряженных атомов азота.

Вещества обладают различной избирательностью в отношении типа глутаматных рецепторов и молекулярным механизмом действия. Наиболее перспективные фотопереклюатели NMDA рецепторов являются аллостерическими модуляторами, а в случае AMPA рецепторов (кальций-проницаемый подтип) наблюдается светозависимый блок открытого ионного канала. Существование различных мод действия азобензол-содержащих аминов открывает возможность разработки фотопереклюателей, нацеленных на конкретную популяцию рецепторов глутамата. Использование таких веществ позволит ввести на новый уровень изучение синаптической передачи и пластичности, и позволит лучше понять механизмы развития заболеваний нервной системы, сопровождающихся нарушением глутаматергической передачи.

Ключевые слова: ионный канал, фотопереключател, азобензол, синапс, нейрон

Введение.

Оптический контроль ионных каналов с помощью молекулярных фотопереключател — это современный экспериментальный подход для изучения физиологии нервной системы в норме и патологии. Эти вещества изменяют химические свойства и сродство к ионному каналу при освещении светом определенной длины волны, за счет чего достигается эффект «переключения». Важное преимущество фотопереключател перед традиционными лигандами-модуляторами ионных каналов состоит в том, что их активность может быть изменена локально, быстро и полностью обратимо [1]. Недавно мы обнаружили, что известные фотопереключател потенциалозависимых ионных каналов, азобензол-содержащие производные лидокаина, проявляют активность в отношении ионотропного рецептора глутамата. Одно из таких соединений, DENAQ (diethylamine-azobenzene-quaternary ammonium), оказалось селективным светочувствительным антагонистом NMDA рецепторов. Эта находка послужила отправной точкой проекта, посвященного разработке фотохромных модуляторов глутаматных рецепторов.

Результаты исследования.

DENAQ — это производное азобензола, содержащее диэтиламиновую группу и четвертичную триэтиламиновую группу. Мы синтезировали серии соединений, в которых варьировали конкретные структурные компоненты DENAQ и изучили влияние таких изменений на эффективность и светозависимость угнетения глутаматных рецепторов. Действие веществ исследовали в электрофизиологических экспериментах пэтч кламп на нативных глутаматных рецепторах нейронов мозга крысы трех типов: NMDA, AMPA кальций-проницаемые и AMPA кальций-непроницаемые рецепторы.

Экстраклеточная подача веществ (30μM) вызывала быстрое светозависимое угнетение токов через глутаматные рецепторы в большинстве случаев. Вещества с высокой активностью преимущественно угнетали NMDA тип глутаматных рецепторов [2, 3]. При этом незначительные изменения в структуре, например, при замене диэтиламиногруппы DENAQ на диметиламиногруппу, вещество DMNAQ (dimethyl-azobenzene-quaternary ammonium) или на пирролидиновое кольцо, вещество PyrAQ (pyrrolidine-azobenzene-

quaternary ammonium), активность возрастала в 2 и 5 раз, соответственно. В случае AMPA рецепторов отдельного внимания заслуживает пара соединений, содержащих акриламидную группу, вещество AAQ (acrylamide-azobenzene-quaternary ammonium), и дополнительную четвертичную аминогруппу, вещество QAQ (quaternary ammonium-azobenzene-quaternary ammonium). Только эти вещества оказывали избирательное действие в отношении кальций-проницаемого подтипа рецепторов.

DMNAQ, PyrAQ, AAQ и QAQ обладают постоянным положительным зарядом при физиологических значениях pH. Поэтому в качестве возможного механизма угнетающего действия соединений можно предположить блокаду ионного канала. Характеристическим свойством блокаторов является зависимость их активности от мембранного потенциала. Измеряя активность соединений при фиксации мембранного потенциала в широком диапазоне (от -140 до +40 мВ, шаг 20 мВ) мы экспериментально проверили эту возможность.

Активность DMNAQ и PyrAQ не изменялась при варьировании мембранного потенциала фиксации как на NMDA, так и на AMPA рецепторах. Напротив, угнетение глутаматных рецепторов веществами AAQ и QAQ зависела от величины мембранного потенциала. В случае NMDA рецепторов активность веществ монотонно увеличивалась при гиперполяризации мембраны. Потенциалозависимость хорошо аппроксимировалась классической математической моделью, описывающей действие непроницающего блокатора ионного канала. На AMPA кальций-проницаемых рецепторах вещества проявляли потенциалозависимость действия, характерную для блокаторов, способных проникать через ионный канал в цитоплазму (феномен «проваливания»). Сравнение величин δ , отражающих относительную глубину залегания участка связывания в полости канала, хорошо соотносится с современными представлениями о механизмах блокады глутаматных рецепторов. В случае NMDA рецепторов вещества QAQ и AAQ взаимодействуют с поверхностным участком связывания. В AMPA рецепторах связывание происходит глубоко в полости канала. Молекулярное моделирование с помощью метода Монте-Карло с минимизацией энергии полностью соотносится с экспериментальными данными.

Интересно, что при сильной деполяризации мембраны наблюдалось потенциал независимое угнетение AMPA рецепторов на уровне, которое может быть опосредовано дополнительным

участком вне полости канала. Это подтверждается хорошей аппроксимацией данных формулой, учитывающей независимое связывание QAQ и AAQ с потенциалозависимым и потенциалонезависимым участками связывания.

Для определения внеканального участка (-ов) связывания были проведены дополнительные эксперименты (зависимость действия от концентрации агониста, внеклеточного кальция, pH внеклеточной среды). В модельных экспериментах были получены наборы устойчивых комплексов с различными экстраклеточными частями рецепторов. Однако, ни один из найденных путем расчёта потенциальных сайтов связывания не соотносился полностью с набором экспериментальных данных.

Заключение.

Разработка фотопереключател для ионных каналов является актуальной проблемой современной нейрофизиологии, однако набора специфических фотопереключател для разных подтипов глутаматных рецепторов до сих пор не существует. В данном проекте мы представляем несколько высокоактивных фотуправляемых антагонистов рецепторов глутамата, обладающих различной избирательностью и молекулярным механизмом действия. Вещества PyrAQ и DMNAQ являются селективными неконкурентными антагонистами NMDA рецепторов, их действие не связано с блокадой ионного канала. Напротив, экспериментальные данные о действии веществ QAQ и AAQ хорошо соотносятся с современными представлениями о блокаде ионных каналов глутаматных рецепторов. Дополнительные потенциалонезависимые эффекты AAQ и QAQ могут быть обусловлены наличием второго участка, расположенного в экстраклеточной части рецептора. Определение этого участка связывания и структурных детерминант, ответственных за развитие потенциалонезависимого угнетения рецепторов, требует отдельного исследования с привлечением методов направленного мутагенеза рецепторов.

В целом, существование различных участков связывания, обеспечивающих угнетение глутаматных рецепторов, открывает возможность разработки новых фотопереключател, нацеленных на конкретную популяцию рецепторов глутамата. Использование таких веществ позволит контролировать синаптическую передачу с высоким пространственным и временным разрешением, и позволит вывести на новый уровень возможности современной экспери-

ментальной нейрофизиологии в изучении функций нервной системы в норме и при патологических расстройствах.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского
научного фонда № 23—24—00481.*

Список литературы

1. A. Mourot, C. Herold, M. A. Kienzler, R. H. Kramer, Understanding and improving photo-control of ion channels in nociceptors with azobenzene photo-switches, *Br J Pharmacol*, 175 (2018) 2296—2311.
2. M. V. Nikolaev, D. M. Strashkov, M. N. Ryazantsev, D. B. Tikhonov, Optical Control of N-Methyl-d-aspartate Receptors by Azobenzene Quaternary Ammonium Compounds, *ACS Chem Neurosci*, 12 (2021) 3347—3357.
3. M. V. Nikolaev, D. M. Strashkov, M. N. Ryazantsev, D. B. Tikhonov, Development of a quaternary ammonium photoswitchable antagonist of NMDA receptors, *European journal of pharmacology*, 938 (2023) 175448.

CONTROL OF IONOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS WITH MOLECULAR PHOTOSWITCHES

Nikolaev M. V.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia
e-mail: fmedfstud@gmail.com

Annotation. Ion channels are membrane proteins that play a major role in the regulation of cellular excitability and in the processes of transmission and processing of information in the nervous system. Molecular photoswitches are novel pharmacological tools for rapid, local, and reversible control of ion channels. We have developed a series of photoswitches for ligand-gated glutamate ion channels. The substances are quaternary ammonium derivatives containing an azobenzene group. The action of the compounds was characterized on native glutamate receptors of pyramidal cells of the hippocampus and giant striatal interneurons (whole-cell patch clamp, voltage clamp mode). In the presence of substances in the dark, the currents through the ion channels suppressed, but upon irradiation with monochromatic light (420—460 nm), the activity decreased. The photoswitch

effect was fast and completely reversible. High antagonistic activity requires the presence of one or more positively charged nitrogen atoms. Substances have different selectivity in relation to the type of glutamate receptors and the molecular mechanism of action. The most promising photoswitches of NMDA receptors are allosteric modulators, and in the case of AMPA receptors, a light-dependent open channel block may be present. The existence of different modes of action of azobenzene-containing amines opens the possibility for developing photoswitches for a specific population of glutamate receptors. The use of such substances is important for studying the functions of the glutamatergic system in normal conditions and in neurological diseases.

Key words: ion channel, photoswitch, azobenzene, synapse, neuron

УДК 577.25

РАЗРАБОТКА ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИНСТРУМЕНТА ДЛЯ КОНТРОЛЯ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-53-54

Багаева Д. Ф.¹, Носов Г. А.^{2,3}, Власова А. Д.¹,
Бухалович С. М.¹, Ильинский Н. С.¹, Горделий В. И.^{1,4}

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

² ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства России

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова Минздрава России

⁴ Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Université Grenoble Alpes–Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives–CNRS

email: bagaeva.df@phystech.edu

Ключевые слова: Оптогенетика, родопсины, синаптические везикулы

Оптогенетика базируется на экспрессии светочувствительных белков в определенных клеточных популяциях, что позволяет использовать свет для управления клеточной физиологией [1]. Долгое время оптогенетика была сосредоточена на световом контроле функций мозга посредством экспрессии родопсинов на поверхности плазматической мембраны нейронов. Последние годы в области оптогенетики развивается новое направление, основанное на доставке родопсинов в органеллы клетки.

В настоящее время существует стратегия, основанная на направленной экспрессии белка Arch3 в синаптических везикулах [2]. Данный инструмент может функционально заменить вакуолярную АТФ-азу, обеспечивая оптогенетическое закисление везикул и накопление нейромедиаторов. Однако данный инструмент позволяет осуществлять только односторонний контроль.

В данной работе показана разработка оптогенетического подхода для контроля синаптических везикул. С помощью флуоресцентной микроскопии мы оценили доставку белка в синаптические везикулы, и показали некоторые физиологические эффекты.

Список литературы

- [1] Roy DS, Arons A, Mitchell TI, Pignatelli M, Ryan TJ, Tonegawa S. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature*. 2016 Mar;531 (7595):508—12.
- [2] Rost BR, Schneider F, Grauel MK, Wozny C, Bentz CG, Blessing A, et al. Optogenetic acidification of synaptic vesicles and lysosomes. *Nat Neurosci*. 2015 Dec;18 (12):1845—52.

DEVELOPMENT OF OPTOGENETIC INSTRUMENT FOR SYNAPTIC VESICLES CONTROL

Bagaeva D. F.¹, Nosov G. A.^{2,3}, Vlasova A. D.¹,
Bukhalovich S. M.¹, Ilyinsky N. S.¹, Gordely V. I.^{1,4}

¹ Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)

² Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the FMBA of Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov Medical University)

⁴ Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Université Grenoble

Alpes–Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives–CNRS

email: bagaeva.df@phystech.edu

Key words: Optogenetics, rhodopsins, synaptic vesicles

Optogenetics is based on the expression of light-sensitive proteins in certain cell populations, which makes it possible to use light to control cell physiology [1]. For a long time, optogenetics has been focused on light control of brain functions through the expression of rhodopsins on the surface of the plasma membrane of neurons. In recent years, a new direction has been developing in the field of optogenetics. It is based on the delivery of rhodopsins to cell organelles.

Currently, there is a strategy based on targeted expression of the Arch3 protein in synaptic vesicles [2]. This tool can functionally replace vacuolar ATPase, providing optogenetic acidification of vesicles and accumulation of neurotransmitters. However, this tool allows only one-sided control.

This paper shows the development of an optogenetic approach for the control of synaptic vesicles. Using fluorescence microscopy, we assessed protein delivery to synaptic vesicles and showed some physiological effects.

УДК 616.8—056.7

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ НА ОСНОВЕ AAV-RNAI ДЛЯ GNAO1-ЭНЦЕФАЛОПАТИИ ВЫЗВАННОЙ ДОМИНАНТНОЙ МУТАЦИЕЙ C.607 G>A

DOI 10.24412/CL-37124-2023-55-58

Лунев Е. А.^{1,2,3}, Клементьева Н. В.^{1,2}, Васильева С. Г.^{1,2},
Поликарпова А. В.^{1,2}, Шмидт А. А.^{1,2,3}, Воловиков Е. А.^{1,4},
Егорова Т. В.^{1,2}, Дейкин А. В.⁵, Бардина М. В.^{1,2,3}

¹ Лаборатория моделирования и терапии наследственных заболеваний, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

² ООО “Marlin Biotech”, Сочи, Россия

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю. М. Лопухина, Москва, Россия

⁵ Лаборатория генетических технологий и редактирования генома для биомедицины и ветеринарии Объединенного центра генетических технологий Белгородского национального исследовательского университета, Белгород, Россия

e.lunev.marlin@gmail.com

Ключевые слова: GNAO1-энцефалопатия, G-белки, генная терапия

GNAO1-энцефалопатия является орфанным неврологическим заболеванием, вызванным de novo мутациями в гене GNAO1 и проявляется в виде эпилепсии и/или двигательной дисфункции с задержкой развития. На данный момент не существует лечения данного заболевания, а механизм слабо изучен. Один из наиболее распространенных и тяжелых вариантов GNAO1-энцефалопатии вызывается гетерозиготной мутацией GNAO1 c.607 G>A (G203R). Ранее для этого варианта мы разработали подход генной терапии основанный на селективном подавлении мутантного аллеля с помощью РНК-интерференции. В настоящей работе мы уточнили фенотипическое проявление мутантного белка Gao-G203R в клеточной культуре, а также провели оптимизацию и оценку биобезопасности потенциального препарата генной терапии in vitro и in vivo. Мы обнаружили, что сверхэкспрессия Gao в клетках

HEK293T, усиливает индуцируемый форсколином синтез цАМФ, в то время как мутантный Gao-G203R терял это свойство. Кроме того, нарушение этой функции проявлял устойчивый к коклюшному токсину белок Gao-C351G, используемый в ранних *in vitro* исследованиях GNAO1-энцефалопатии. Мы оценили токсичность короткой шпилечной РНК, специфичной для варианта GNAO1 c.607 G>A, на нейронах полученных из ИПСК пациента. По результатам транскриптомного исследования мы не выявили критических нарушений в экспрессии генов. Для оптимизации доставки терапевтического вектора мы протестировали нейротропные серотипы AAV1, 2, 5, 6, 8, 9, DJ, PHP.B и rh10, а также различные пути введения для таргетирования богатых Gnao1 областей в мозге мыши. Внутривенное введение серотипа AAV9 обеспечивало наиболее равномерную трансдукцию Gnao1-позитивных клеток. Затем мы усовершенствовали геннотерапевтическую конструкцию, клонировав эффектор РНК-интерференции в виде искусственной miR30 под контроль нейроспецифического промотора hSyn1. Полученный вектор был упакован в серотип AAV9 выбранный по результатам скрининга. Наличие шпилечной структуры в векторе не повлияло на продукцию вируса. Оценка безопасности препарата *in vivo* была проведена на гуманизированной линии мышей Gnao1-GGA. Проведенные поведенческие тесты и анализ биохимии крови не выявил патологических отклонений у испытуемых животных. Таким образом, наши результаты *in vitro* и *in vivo* подчеркивают потенциал AAV-RNAi терапии для лечения GNAO1 c.607 G>A энцефалопатии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда No 23—25—00323, <https://rscf.ru/project/23—25—00323/>

AAV-RNAI-BASED GENE THERAPY FOR GNAO1-ENCEPHALOPATHY CAUSED BY DOMINANT MUTATION C.607 G>A

Lunev E. A.^{1,2,3}, Klementieva N. V.^{1,2}, Vassilieva S. G.^{1,2}, Polikarpova A. V.^{1,2}, Shmidt A. A.^{1,2,3}, Volovikov E. A.^{1,4}, Egorova T. V.^{1,2}, Deykin A. V.⁵, Bardina M. V.^{1,2,3}

¹ Laboratory of Modeling and Gene Therapy of Hereditary Diseases, Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Marlin Biotech, Sochi, Russia

³ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

⁵ Laboratory of Genetic Technologies and Genome editing for Biomedicine and Animal Health, Joint Center for Genetic Technologies, Belgorod National Research University, Belgorod, Russia

e.lunev.marlin@gmail.com

Key words: GNAO1 encephalopathy, G proteins, gene therapy

GNAO1 encephalopathy is an orphan neurological disease caused by *de novo* mutations in the GNAO1 gene and manifests as epilepsy and/or motor dysfunction with developmental delay. Currently, this disease has no treatment, and the mechanism is poorly understood. One of the most common and severe variants of GNAO1 encephalopathy is caused by the heterozygous mutation GNAO1 c.607 G>A (G203R). Previously, for this variant, we developed a gene therapy approach based on the selective suppression of the mutant allele by RNA interference. In the present study, we clarified the phenotypic manifestation of the Gao-G203R mutant protein in cell culture and optimized and assessed the biosafety of a potential gene therapy drug *in vitro* and *in vivo*. We found that overexpression of Gao in HEK293T cells enhanced forskolin-induced cAMP synthesis, while the mutant Gao-G203R lost this property. In addition, PTX-resistant protein Gao-C351G, used in early *in vitro* studies of GNAO1 encephalopathy, exhibited impairment of this function. We evaluated the toxicity of the shRNA specific for the GNAO1 c.607 G>A variant on patient-specific iPSC-derived neurons. RNAseq analysis did not reveal critical abnormalities in gene expression. To optimize therapeu-

tic vector delivery, we tested the neurotrophic serotypes AAV1, 2, 5, 6, 8, 9, DJ, PHP.B, and rh10, as well as different routes of administration to target Gnao1-rich regions in the mouse brain. Intravenous administration of the AAV9 serotype provided the most uniform transduction of Gnao1-positive cells. Then we improved the gene therapy vector by cloning the RNAi effector in the form of artificial miR30 under the control of the neurospecific hSyn1 promoter. The resulting vector was packaged in the AAV9 serotype selected based on the screening results. The presence of the hairpin structure in the vector did not affect the production of the virus. The drug's in vivo safety assessment was carried out on a humanized Gnao1-GGA mice. Conducted behavioral tests and biochemical blood analysis did not reveal pathological abnormalities in experimental animals. Thus, our in vitro and in vivo results highlight the potential of AAV-RNAi therapy for treating GNAO1 c.607 G>A encephalopathy.

The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23—25—00323, <https://rscf.ru/project/23—25—00323/>

УДК 577.17.05

ПРОТЕОЛИЗ IGFBR-4 ПОД ДЕЙСТВИЕМ RAPP-A В НЕРВНОЙ ТКАНИ И ЕГО ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА

DOI 10.24412/CL-37124-2023-59-61

Серебряная Д. В.¹, Дя Г. А.¹, Гущеваров Д. А.¹,
Воловиков Е. А.², Беликова Л. Д.², Постников А. Б.³,
Артемьева М. М.⁴, Медведева Н. А.⁴, Лебедева О. С.²,
Лагарькова М. А.², Катруха А. Г.^{1,3}

¹ кафедра биохимии, биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФНКЦ ФХМ ФМБА имени Ю. Б. Лопухина, Москва, Россия

³ ОАО “Хайтест”, Турку, Финляндия

⁴ кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: dariaserebryanaya@gmail.com

Аннотация. В работе исследуется протеолиз белка IGFBR-4, под действием протеазы RAPP-A в нейронах и астроцитах, в результате которого образуется свободный IGF, оказывающий нейропротекторное действие на клетки. Представлены данные о клеточной специфичности протеолиза, а также о его возрастной динамике в нервной ткани.

Ключевые слова: нейроны, астроциты, инсулиноподобный фактор роста, IGFBR-4, RAPP-A

Основной текст: Поддержание жизнеспособности нейронов и астроцитов необходимо для правильного функционирования нервной системы в течение всего жизненного периода. Инсулиноподобные факторы роста, IGF-1 и IGF-2, играют важную роль в развитии и функционировании нервной системы, обеспечивая пролиферацию и жизнеспособность нейронов и астроцитов, входящих в ее состав. Нейропротекторное действие IGF-1 и IGF-2 на клетки нервной ткани реализуется через взаимодействие со специфическими рецепторами, основными из которых являются IGF1R и IGF2R. В нервной ткани IGF-1 и IGF-2 преимущественно находятся в комплексе с IGF-связывающими белками (Insulin-like Growth Factor

Binding Proteins, IGFBPs). Биодоступность IGF для клеток регулируется путем протеолиза комплекса различных IGFBP с IGF под действием специфических протеаз. В нервной ткани IGF высвобождается в результате протеолиза белков IGFBP-2, IGFBP-3 и IGFBP-5. Однако на сегодняшний день неизвестно, подвергается ли специфическому протеолизу в нервной ткани IGFBP-4. Единственной известной на сегодняшний день протеазой, расщепляющей IGFBP-4, является PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A). Протеолиз IGFBP-4 под действием PAPP-A происходит по специфическому участку, и в результате расщепления образуются два протеолитических фрагмента: N-концевой (NT-IGFBP-4) и C-концевой (CT-IGFBP-4). С возрастом процессы нарушения функционирования нейронов и астроцитов в головном мозге интенсифицируются, и может возрастать потребность в активации нейропротекторных механизмов. Таким образом, целью нашей работы является исследование возможности протекания PAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 в нервной ткани и анализ его возрастной динамики.

В настоящей работе были разработаны модели нейронов и астроцитов, дифференцированных из двух независимых линий, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) здоровых доноров FF1S и FD5S, а также модель первичной культуры нервной ткани, полученной из головного мозга крыс. В кондиционированной среде всех исследуемых культур была измерена концентрация PAPP-A. Впервые было продемонстрировано протекание PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4, определенного как концентрация протеолитического фрагмента NT-IGFBP-4 методом неопитоп-специфичного ФИА “сэндвич”-типа. Концентрации PAPP-A и NT-IGFBP-4, измеренные в кондиционированной среде астроцитов, в 7 и 5 раз превышали таковые в нейронах. Было показано, что уровень протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A, измеренный в первичных культурах клеток головного мозга крыс, а также в астроцитах и нейронах, дифференцированных из ИПСК, увеличивается с возрастом. При моделировании возрастных изменений в клетках нервной ткани под действием 25 мкМ этопозиды продемонстрировано, что уровень PAPP-A-опосредованного протеолиза IGFBP-4 также возрастает в 10 раз. Таким образом, результаты настоящей работы позволяют предположить, что PAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4 протекает в нервной ткани преимущественно в астроцитах, и его интенсивность увеличивается с возрастом. Это может говорить об усилении высвобождения IGF в ре-

зультате протеолиза IGFBP-4, как нейропротекторного механизма, активирующегося при возрастных изменениях в мозге.

PAPP-A-MEDIATED IGFBP-4 PROTEOLYSIS IN NERVOUS TISSUE AND ITS AGING DYNAMICS

D. V. Serebryanaya¹, G. A. Dya¹, D. A. Gushchevarov¹,
E. A. Volovikov², L. D. Belikova², A. B. Postnikov³,
M. M. Artemieva⁴, N. A. Medvedeva⁴, O. S. Lebedeva²,
M. A. Lagarkova², A. G. Katrukha^{1,3}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

³ Hytest LTD, Turku, Finland

⁴ Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

e-mail: dariaserebryanaya@gmail.com

Abstract: In the present study we investigated the proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-4 via PAPP-A protease in neurons and astrocytes, that leads to formation of free IGF and manifestation of its neuroprotective effect. Data on the cellular specificity of proteolysis, as well as its aging dynamics are presented.

Key words: neurons, astrocytes, insulin-like growth factor, IGFBP-4, PAPP-A

МАЛЫЕ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ РНК КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ТЕРАПИИ ГЛИОБЛАСТОМ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-62-63

Травникова Д. Ю.^{1,2}, Кордюкова М. Ю.²,
Котелевцев Ю. В.¹, Абакумова Т. О.²

¹ Сколковский институт наук и технологий, 2 РНИМУ им. Н. И. Пирогова
e-mail: darija-travnikova@yandex.ru

Аннотация. Применение малых интерферирующих РНК (миРНК) является перспективным подходом для повышения чувствительности глиом к химиотерапии. В данной работе был выполнен поиск потенциальных генов-мишеней, проанализирована эффективность различных миРНК, показан синергетический эффект миРНК и химиотерапевтических препаратов на клетках глиомы.

Ключевые слова: глиома, химиотерапия, миРНК, ганкирин

Текст сообщения: Опухолевые клетки при рецидиве глиобластомы отличаются повышенной химиорезистентностью, в связи с чем необходима разработка новых подходов в терапии, в том числе на основе РНК-интерференции [1]. Основной целью данной работы являлся поиск перспективной мишени для терапии с помощью миРНК и изучение взаимодействия миРНК и химиопрепаратов на пролиферацию клеток глиом.

На первом этапе работы была проанализирована экспрессия мРНК потенциальных генов-мишеней на различных человеческих линиях глиом. Среди них были отобраны две мишени — онкогенные протеины PSMD10 и EZH2, повышенная экспрессия которых отвечает за изменения в регуляции клеточного цикла. Было показано, что уровень мРНК PSMD10 в 3 раза выше в линиях LN18 и U87, и в 1,5 раз активнее в большинстве первичных линий глиом, чем в контроле (астроциты, фиброласты). Для EZH2 увеличенная экспрессия наблюдается во всех линиях глиобластом (первичных импортированных), что делает ее перспективной мишенью для терапии с помощью миРНК.

На следующем этапе нами были синтезированы и проанализированы различные миРНК для подавления экспрессии PSMD10. Было показано, что миРНК-1 и миРНК-3 подавляют экспрессию на 95%. Выбранные миРНК были отобраны для дальнейшего изучения их эффективности в комбинированной терапии глиом. Оценка цитотоксичности миРНК была проанализирована методом МТТ теста на линии U-87, где было показано, что при ингибировании PSMD10 их выживаемость снижается более 30% в случае терапии цисплатином и более 50% при использовании доксорубицина в концентрациях 5 мкМ.

Таким образом, мы показали, что PSMD10 и EZH2 являются перспективными мишенями для терапии глиом, а ингибирование PSMD10 позволяет увеличить эффективность химиопрепаратов доксорубицина и цисплатина.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ грант № 22—75—10151.

Список литературы

1. Cao, et al. “CDK4/6 inhibition suppresses tumor growth and enhances the effect of temozolomide in glioma cells” *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24.9 (2020): 5135—5145.

SMALL INTERFERING RNA AS A TOOL FOR OVERCOMING TUMOR CELL CHEMIORESISTANCE IN GLIOBLAST THERAPY

Travnikova D.^{1,2}, Kordyukova M.²,
Kotelevtsev Y.¹, Abakumova T.²

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology,

² RNIMU named after Pirogov N.

e-mail: darija-travnikova@yandex.ru

Annotation. Gliomas are highly resistant to chemotherapy. Small interfering RNAs are able to increase the sensitivity of gliomas to drugs by changing the genetic profile of the cell. In this work, we analyzed 10 potential target genes and demonstrated the synergistic effect of siRNA and chemotherapy.

Key words: glioma, chemotherapy, siRNA, gankyrin

СЕНСОРНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ КРЫС В МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МИГРЕНИ IN VIVO

DOI 10.24412/CL-37124-2023-64-69

Герасимова Е. В.¹, Богатова К. С.³, Еникеев Д. Р.²,
Кочнева А. А.², Коновалова С. П.², Мусиенко П. Е.^{1,2},
Яковлева О. В.³, Ситдикова Г. Ф.³,

¹ «Научно-технологический университет «Сириус», пгт Сириус, Россия

² Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

e-mail: gerasimova.el.2011@yandex.ru

Аннотация. Мигрень — это пароксизмальное состояние нервной системы, наиболее частым и характерным симптомом которого являются эпизодические или регулярные сильные и мучительные приступы головной боли. Распространяющаяся кортикальная депрессия (РКД) представляет собой распространяющуюся волну деполяризации нейронных и глиальных клеток, которая вызывает головную боль в результате активации менингеальных ноцицептивных окончаний и рассматривается как электрофизиологический коррелят мигрени с аурой. В данном исследовании оценивали изменение ноцицептивной чувствительности и развитие фотофобии в экспериментальной КС1 индуцируемой модели мигрени с развитием РКД. Было показано, что РКД вызывает снижение ноцицептивных порогов, развитие фотофобии и увеличение тревожности у крыс.

Ключевые слова: мигрень, распространяющаяся кортикальная депрессия, сенсорная чувствительность

Введение

Головная цефалгия является одной из распространенных проблем у современного трудоспособного населения. Одним из видов таких цефалгий является мигрень. Мигрень — это пароксизмальное состояние нервной системы, наиболее частым и характерным симптомом которого являются эпизодические или регулярные сильные и мучительные приступы головной боли [1].

Согласно международной оценке Global Burden of Disease (2015) мигрень признана третьим наиболее распространенным за-

болеванием и седьмой по величине причиной инвалидности в мире [2]. Из шести форм клинической мигрени, безусловно, преобладающими являются мигрень без ауры (около 70 % случаев) и мигрень с аурой (около 30 %) [3]. Мигрень с ее сложным патогенезом, включающим изменения со стороны нервной, иммунной и сердечно-сосудистой систем и ограниченной эффективностью медикаментозного лечения, представляет собой одну из актуальнейших проблем современной медицины.

Механизмы мигрени изучаются с помощью различных экспериментальных моделей, основанных на сенсibilизации или стимуляции тригеминальной системы [4]. Распространяющаяся кортикальная депрессия (РКД) представляет собой распространяющуюся волну деполяризации нейронных и глиальных клеток, которая вызывает головную боль в результате активации менингеальных ноцицептивных окончаний и рассматривается как электрофизиологический коррелят мигрени с аурой [5]. РКД также оказывает влияние на корковый кровоток, первоначально увеличивая его преимущественно за счет высвобождения оксида азота (NO), а затем вызывая длительную олигемию [6].

В данном исследовании проанализировали влияние РКД на изменение сенсорной чувствительности у крыс in vivo.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на самцах крысах линии Wistar (2—3 мес) (n=18). Хирургия животных проводилась под изофлурановой анестезией (5 % индукция и 1,5—2 % поддержание). В стереотаксисе на термоковрике (37—38 °С) под наркозом отрезалась кожа на поверхности головы, убирались мягкие ткани с поверхности черепной кости, поверхность черепной кости обрабатывалась препаратом «Гемостаб». Животным проводили «распил» кости (L3, AP 7 от брегмы, d=2 мм) и формировали «ванночку» из зубного акрила вокруг отверстия. Для предотвращения высыхания твердой мозговой оболочки в «ванночку» помещали несколько капель искусственной цереброспинальной жидкости и закрывали специальной резиновым колпачком. Через сутки проводили поведенческое тестирование животных до и после возникновения РКД. РКД инициировали внесением в «ванночку» KCl в концентрации 1 М. Через 30 минут после аппликации KCl в «ванночку» проводили оценку ноцицептивной чувствительности и развития фотофобии у животных

Тест «фон Фрея»

Ноцептивную чувствительность оценивали серией калиброванных нитей фон Фрея (Ugo Basile, Италия) с целевой силой от 0,008 до 8 г, что соответствует давлению 2,53—61,7 г/мм². За 30 минут до теста крысу помещали в индивидуальный прозрачный бокс с сетчатым полом. Пороги механической чувствительности определяли по методу «up-and-down» [7] в зонах подошвенной поверхности лапы и надглазничной областях головы. Эксперимент начинали с тестирования филаментом 0,4 г (3,61 г/мм²).

В случае, когда кончик нити прижимали к подошвенной поверхности задней лапы на 1—3 секунды, ответ определяется как отдергивание, встряхивание или облизывание лапы. При воздействии на зону над глазом за ответ принимали резкое отдергивание головы при воздействии или сразу после удаления нити, а также различные способы уклонения от воздействия.

Тест «темно-светлая камера»

Для оценки тревожно-фобического состояния животного использовали тест «темно-светлая камера» [8]. Темно-светлая камера состоит из двух одинаковых камер — освещенной (150 лк) и затемненной (1—2 лк) 40×20×40 см/каждая, соединенных проходом 7×7 см (Open Science, Москва, Россия), оснащенных видеосистемой Sony SSC-G118 (Япония). Крыс помещали в светлый отсек спиной к отверстию в темный отсек и оценивали ее поведение в течение 3 минут. Регистрировали задержку входа в темную камеру и время, проведенное в светлой камере.

Статистическую обработку проводили при помощи методов непараметрической статистики для сравнения количественных признаков с использованием Вилкоксона — для исследования различий между двумя связными выборками. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Все результаты представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее значение, m — ошибка среднего.

Результаты

Определение порогов ноцептивной чувствительности задних лап животных в модели острой мигрени

Фоновые показатели ноцептивной чувствительности правой и левой лап составили 7.13 ± 0.58 г/мм² и $7.13 \pm 0,78$ г/мм², соответственно ($p > 0.05$).

Фоновые показатели правой надглазничной области составили 3.96 ± 0.34 г/мм², а левой надглазничной области 4.00 ± 0.35 г/мм² ($p > 0.05$).

Аппликация КС1 приводила к снижению порогов чувствительности обеих лап по сравнению с фоновыми показателями у 11 из 18 крыс до $61.2 \pm 5.4\%$ (левая лапа) и $57.9 \pm 1.7\%$ (правая лапа). Достоверной асимметрии в чувствительности лап выявлено не было.

Пороги ноцицептивной чувствительности надглазничной области после аппликации КС1 снизились у 12 крыс из 18 до $71.65 \pm 5.65\%$ (левая сторона) и $70.23 \pm 6.70\%$ (правая сторона.ст) и были достоверно ниже фоновых значений, не значимы между собой.

Таким образом, генерация РКД в коре головного мозга левого полушария вызывала достоверные изменения в ноцицептивной чувствительности в области головы и задних лап, при этом достоверной асимметрии в развитии подобных эффектов не наблюдалось.

Оценка развития фотофобии и тревожно-фобического состояния животных в модели острой мигрени

Анализ эмоционального состояния животных в тесте «Темно-светлая камера» выявил изменение в поведении животных после индуцирования РКД.

После аппликации КС1 показатели времени первого захода в темную камеру снижались, а время пребывания в темной камере увеличилось по сравнению с фоновыми показателями.

Время первого захода и нахождение в темной камере до аппликации КС1 составили 9.7 ± 2.31 с и 127.7 ± 7.4 с, а после — 6 ± 1.2 с и 151.2 ± 5.1 ($p < 0.05$). Таким образом, КС1- индуцированная РКД приводит к развитию фотофобии и повышению тревожно-фобического состояния животных.

Заключение

Мигрень с аурой характерна для 30 % пациентов и характеризуется сенсорными нарушениями перед приступами головной боли. РКД, предполагаемый механизм мигренозной ауры, является кратковременным, но приводит к длительным изменениям кортикальной перфузии, метаболизма и изменениям в сенсорном восприятии [9,10 11]. В модели экспериментальной мигрени с аурой РКД сопровождалось сенсорными нарушениями, что может объяснить развитие таких сенсорных симптомов как фотофобия и механическая аллодиния во время приступа мигрени.

Список литературы

1. Zed PJ, Loewen PS, Robinson G. Medication-induced headache: overview and systematic review of therapeutic approaches. *Ann Pharmacother.* 1999 Jan;33 (1):61—72. doi: 10.1345/aph.18184. PMID: 9972386.
2. Steiner TJ, Stovner LJ, Vos T. GBD 2015: migraine is the third cause of disability in under 50s. *J Headache Pain.* 2016 Dec;17 (1):104. doi: 10.1186/s10194—016—0699—5. Epub 2016 Nov 14. PMID: 27844455; PMCID: PMC5108738..
3. Rasmussen BK, Olesen J. Migraine with aura and migraine without aura: an epidemiological study. *Cephalalgia.* 1992 Aug;12 (4):221—8; discussion 186. doi: 10.1046/j.1468—2982.1992.1204221.x. PMID: 1525797.
4. Jansen-Olesen I, Tfelt-Hansen P, Olesen J. Animal migraine models for drug development: status and future perspectives. *CNS Drugs.* 2013 Dec;27 (12):1049—68. doi: 10.1007/s40263—013—0121—7. PMID: 24234657.
5. Ayata C. Cortical spreading depression triggers migraine attack: pro. *Headache.* 2010 Apr;50 (4):725—30. doi: 10.1111/j.1526—4610.2010.01647.x. PMID: 20456160.
6. Colonna DM, Meng W, Deal DD, Busija DW. Nitric oxide promotes arteriolar dilation during cortical spreading depression in rabbits. *Stroke.* 1994 Dec;25 (12):2463—70. doi: 10.1161/01.str.25.12.2463. PMID: 7526490.
7. Moye LS, Pradhan AAA. Animal Model of Chronic Migraine-Associated Pain. *Curr Protoc Neurosci.* 2017 Jul 5;80:9.60.1—9.60.9. doi: 10.1002/cpns.33. PMID: 28678396; PMCID: PMC5558838.
8. Bourin M, Hascoët M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol.* 2003 Feb 28;463 (1—3):55—65. doi: 10.1016/s0014—2999 (03)01274—3. PMID: 12600702.
9. Piilgaard H, Lauritzen M. Persistent increase in oxygen consumption and impaired neurovascular coupling after spreading depression in rat neocortex. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009 Sep;29 (9):1517—27. doi: 10.1038/jcbfm.2009.73. Epub 2009 Jun 10. PMID: 19513087.
10. Chang JC, Shook LL, Biag J, Nguyen EN, Toga AW, Charles AC, Brennan KC. Biphasic direct current shift, haemoglobin desaturation and neurovascular uncoupling in cortical spreading depression.

- Brain. 2010 Apr;133 (Pt 4):996—1012. doi: 10.1093/brain/awp338. Epub 2010 Mar 25. PMID: 20348134; PMCID: PMC2850576.
11. Gerasimova, E.; Burkhanova, G.; Chernova, K.; Zakharov, A.; Enikeev, D.; Khaertdinov, N.; Giniatullin, R.; Sitdikova, G. Hyperhomocysteinemia increases susceptibility to cortical spreading depression associated with photophobia, mechanical allodynia, and anxiety in rats. *Behav Brain Res.* 2021, 409:113324. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113324.

SENSORY SENSITIVITY AND LEVEL OF ANXIETY IN RATS IN THE IN VIVO EXPERIMENTAL MIGRAINE MODEL

Gerasimova E. V.¹, Enikeev D. R.², Bogatova K. S.³, Musienko P. E.^{1,2}, Yakovleva O. V.³, Sitdikova G. F.³

¹ Sirius University of Science and Technology, Sirius, Russia

² Institute of Physiology I. P. Pavlova RAS, St. Petersburg, Russia

³ Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

e-mail: gerasimova.el.2011@yandex.ru

Abstract:

Migraine is a paroxysmal condition of the nervous system, the most frequent and characteristic symptom of which is episodic or regular severe and painful attacks of headache. Spreading cortical depression (CSD) is a propagating wave of depolarization of neuronal and glial cells that causes headache as a result of activation of meningeal nociceptive endings and is considered as the electrophysiological correlate of migraine with aura. This study assessed the change in nociceptive sensitivity and the development of photophobia in an experimental KCl-induced model of migraine with the development of CSD. It has been shown that CSD causes a decrease in nociceptive thresholds, the development of photophobia and an increase in anxiety in rats.

Key words: migraine, spreading cortical depression, sensory sensitivity

ПОСЛЕДСТВИЯ ДЛИТЕЛЬНОЙ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ У СТАРЕЮЩИХ КРЫС ГЕНОТИПОВ WKY И SHR

DOI 10.24412/CL-37124-2023-70-75

Степаничев М. Ю., Недогреева О.А, Мамедова Д. И.,
Новикова М. Р., Лазарева Н. А., Онуфриев М. В.,
Моисеева Ю. В., Манолова А. О., Овчинникова В. О.,
Кострюков П. А., Гуляева Н. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва
e-mail: m_stepanichev@ihna.ru

Ключевые слова: мозг, старение, социальная изоляция, когнитивные функции, спонтанно гипертензивные крысы

Старение связано с существенными изменениями характера нейро-иммуно-эндокринных взаимодействий. В настоящей работе было исследовано влияние длительной социальной изоляции у стареющих крыс линии Wistar-Kyoto (WKY) и спонтанно-гипертензивных животных (SHR) на показатели поведения, содержание кортикостерона и провоспалительных факторов в крови.

Ощущение одиночества является одним из часто встречающихся спутников старения человека. Возникновение этого чувства обусловлено потерей близких, отсутствием социальной поддержки, трудностью установления и поддержания качественных новых социальных связей и взаимодействий. Такие жизненные ситуации сопровождаются негативными переживаниями и приводят к активации механизмов стресса. Стресс может быть дополнительно усилен внезапными внешними факторами, например, такими как режим социальной изоляции, который был использован многими государствами для борьбы с пандемией COVID-19. Социальная изоляция и одиночество являются стрессорными воздействиями, которые могут приводить к нарушению нейро-иммуно-эндокринной регуляции и, как следствие, к возникновению патологий. Старение

связано с увеличением риска возникновения различных патологий, которые снижают адаптивные возможности организма. Среди наиболее распространенных возрастных патологий отмечают нарушения когнитивной сферы, мозгового кровообращения, сердечно-сосудистой системы. Результатом этого является ухудшение качества и сокращение продолжительности жизни. Поскольку жизнь в группе важна для выживания видов, которые имеют развитую систему социальных взаимодействий, исследование последствий социальной изоляции представляется крайне значимым.

Стареющие грызуны представляют удобную модель для исследования механизмов нейро-иммуно-эндокринной регуляции при стрессе. Спонтанно гипертензивные крысы линии SHR позволяют исследовать возможный вклад гипертензии в возрастные изменения высших функций и мозга и механизмы, лежащие в их основе. Эта модель интересна тем, что гипертензия является одним из наиболее распространенных возрастных нарушений функции сердечно-сосудистой системы.

Целью настоящей работы было исследование поведения и некоторых показателей иммунной эндокринной регуляции в крови стареющих крыс линий WKY и SHR, перенесших длительную социальную изоляцию.

Самцы крыс линий WKY и SHR были получены из питомника «Пушино» (Филиал ФГБУН ИБХ РАН) в возрасте 4 мес. и содержались в группах по 5—6 особей в виварии ИВНД и НФ РАН до достижения возраста 10 мес. в условиях 12-ч светового дня и при свободном доступе к воде и пище. До начала периода изоляции у всех крыс измеряли массу тела и артериальное давление (АД). Животных делили на группы таким образом, чтобы группы в среднем не отличались по массе и величине АД. Часть животных каждого генотипа помещали в индивидуальные непрозрачные клетки, другую половину крыс содержали в прозрачных клетках по 2—3 особи на протяжении всего периода изоляции. Таким образом были сформированы четыре группы животных: WKYsoc (n = 9), WKYiso (n = 9), SHRsoc (n = 17) и SHRiso (n = 12). Содержание животных в условиях изоляции продолжалось в течение 3-х мес. По истечении этого периода исследовали поведение животных в тестах «предпочтение сахарозы», «открытое поле» (ОП), «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), «социальное взаимодействие/предпочтение» (СВП) и обучали поиску скрытого убежища в лабиринте Барнс.

До начала изоляции, в середине этого периода и по окончании его у крыс отбирали кровь из хвостовой вены для оценки содержания кортикостерона. По окончании экспериментов животных подвергали эвтаназии путем декапитации под анестезией. Кровь собирали и в сыворотке измеряли содержание С-реактивного белка (СРБ), провоспалительных интерлейкинов (ИЛ) –1-бета и –6, фактора некроза опухолей-альфа (ФНО α) и трансформирующего фактора роста-бета (ТФР β).

Было установлено, что крысы SHR демонстрировали более высокую активность в тестах ОП и ПКЛ, проходя большую дистанцию в ОП, совершая большее число переходов между рукавами ПКЛ. Самцы крыс WKY демонстрировали более выраженную тревожность по сравнению с крысами SHR, реже выходя в открытые рукава ПКЛ и проводя там меньшее время. При этом длительная изоляция не вызывала существенных изменений в поведении крыс в тестах ОП и ПКЛ. Нам не удалось выявить явных различий между крысами разных генотипов по величине предпочтения раствора сахарозы (ангедонии). Социальная изоляция также не усиливала ангедонии у крыс обоих генотипов. Таким образом, длительная изоляция не приводила к большей выраженности признаков тревожности и депрессивно-подобного поведения у стареющих крыс линий WKY и SHR.

Исследование СВП в трехкамерном тесте не выявило значимых различий в социализации у крыс разных линий. При этом максимальную тенденцию к социализации демонстрировали контрольные самцы крыс SHR, а у крыс, содержащихся в условиях изоляции стремление к социальным взаимодействиям было снижено. Склонность к социальной новизне была слабее выражена у крыс WKY независимо от условий содержания и у перенесших длительную изоляцию крыс SHR. В то же время статистически значимых различий по этому показателю выявлено не было.

Состояние долговременной памяти проверяли, изучая габитуацию к окружающим стимулам при двукратном тестировании в ОП с интервалом в 3 дня. При анализе горизонтальной активности не удалось выявить признаков габитуации ни в одной из исследованных групп крыс. Число вертикальных стоек снижалось у крыс линии SHR независимо от перенесенной изоляции, а у крыс линии WKY — только у изолированных животных. Таким образом, формирование привыкания к стимулам окружающей среды было нарушено, по крайней мере частично, у крыс обеих исследованных линий.

Обучение решению пространственной задачи проводили в лабиринте Барнс. Контрольные крысы обоих генотипов демонстрировали способность к улучшению поиска скрытого убежища в процессе обучения. Это проявлялось в постепенном уменьшении времени поиска. Изолированные крысы WKY также справлялись с этой задачей на уровне контрольных, в то время как крысы SHR демонстрировали некоторый прогресс только на начальном этапе обучения. Проверка способности воспроизведения информации о месте нахождения скрытого убежища в тестовой попытке показала, что контрольные крысы WKY и SHR предпочитали находиться в целевом квадранте лабиринта. Такого предпочтения практически не было у изолированных крыс WKY, а изолированные крысы SHR предпочитали находиться в противоположном целевому квадранте лабиринта.

Для анализа подвижности когнитивных процессов в последующие дни скрытое убежище перемещали в квадрант, противоположный исходному. Только крысы WKY демонстрировали показатели поведения, которые свидетельствовали о переучивании этих крыс, поскольку только в этих группах происходило снижение времени поиска убежища, расположенного в новом участке лабиринта. У крыс SHR снижение времени поиска было весьма небольшим, и эффект переучивания не был значимым. По окончании второго этапа обучения в лабиринте Барнс проводили второй тест без убежища для проверки вновь сформированной памяти. Как и в предыдущем тесте, проверка памяти после переучивания у крыс WKY выявила предпочтение целевого квадранта лабиринта у животных группы WKY_{soc}, хотя и на уровне тенденции. Предпочтение целевого квадранта не наблюдалось у изолированных крыс WKY. Крысы линии SHR демонстрировали лишь незначительное снижение времени поиска убежища в процессе переучивания, но в группе SHR_{iso} уровень предпочтения целевого квадранта в тестовой попытке был ниже по сравнению с соответствующим контролем.

Оценку состояния кратковременной (рабочей) памяти проводили также по числу ошибок (ОП), под которыми понимали каждое повторное посещение отверстия, под которым не было убежища в ходе одной попытки. Было установлено, что у крыс группы WKY_{soc} происходило статистически значимое снижение числа ОП в ходе обучения. У крыс группы WKY_{iso} такое снижение не было статистически значимым. В ходе переучивания не удалось увидеть существенного снижения числа ОП у обеих групп крыс WKY. Среди крыс линии SHR наблюдали снижение числа ОП в процессе об-

учения в группе SHR_{soc}. В группе SHR_{iso} этот эффект не был статистически значимым. Более того, в последний день обучения число ОРП у крыс SHR_{iso} было все еще выше, хотя и на уровне тенденции, по сравнению с соответствующим контролем. В процессе переучивания крысы SHR_{soc} практически не демонстрировали признаков снижения числа ОРП, в отличие от крыс группы SHR_{iso}. По всей видимости, это было обусловлено тем, что число ОРП, которое эти крысы демонстрировали в первый день переучивания было существенно выше по сравнению с крысами групп SHR_{soc}, хотя эта разница не была статистически значимой.

Таким образом, у животных обеих линий, перенесших хроническую социальную изоляцию, наблюдались нарушения когнитивных функций, по всей видимости обусловленные возрастными изменениями функций мозга. Нарушения наблюдались как в состоянии долговременной памяти, так и кратковременной (рабочей) памяти.

Мы предполагали, что такие изменения могут быть связаны с нарушениями иммунной и эндокринной систем при старении. Для того, чтобы оценить это мы проанализировали содержание кортикостерона в крови крыс. Мы не выявили значимых различий между крысами разных генотипов по этому показателю, что соответствует данным литературы. Хроническая изоляция не приводила к длительным изменениям в содержании этого гормона в крови животных. Это согласовалось с отсутствием изменений в массе надпочечников у крыс разных линий. При этом важно отметить, что у крыс SHR была существенно снижена масса тимуса — важнейшего органа иммунной защиты. Интересно, что нам не удалось выявить значимых различий в содержании СРБ, ИЛ-1-бета, ФНО α , ТФР β . В то же время наблюдались значительные различия в содержании ИЛ-6, обусловленные генотипом и условиями содержания. Уровень ИЛ-6 был выше у контрольных крыс SHR по сравнению с WKY, а изоляция приводила к значимому снижению содержания ИЛ-6 в крови крыс SHR, но не у крыс WKY.

Таким образом, поведение стареющих крыс SHR и WKY существенно различалось в тех тестах, где локомоторная активность является важной для проявления тех или иных характеристик работы нервной системы. Крысы SHR практически всегда были более активными и перемещались с большей скоростью. Крысы SHR слегка превосходили крыс WKY в тесте на неассоциативное обучение, но в тесте на ассоциативное обучение эти различия не проявлялись. Изоляция в течение 3 мес. не приводила к усилению тревожно-де-

прессивных характеристик поведения. В то же время у крыс SHR в результате изоляции возникали проблемы с обучением и формированием долговременной памяти. Нам не удалось выявить различий в исследованных гормональных показателях. Не было установлено значительных межлинейных различий в большинстве исследованных показателей воспаления. Исключение составил ИЛ-6, уровень которого был существенно выше у крыс SHR, а длительная изоляция снижала его содержание у этих животных.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 22—15—00132

CONSEQUENCES OF LONG-TERM SOCIAL ISOLATION IN AGING WKY AND SHR RATS

Stepanichev M. Yu., Nedogreeva O. A., Mamedova D. I.,
Novikova M. R., Lazareva N. A., Onufriev M. V.,
Moiseeva Yu. V., Manolova A. O., Ovchinnikova V. O.,
Kostruykov P. A., Gulyaeva N. V.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
e-mail: m_stepanichev@ihna.ru

Aging is associated with alterations of neuro-immune-endocrine interactions. In the present study, we investigated the effects of long-term social isolation on the behavior and contents of corticosterone and proinflammatory factors in aging Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR).

Key words: brain, aging, social isolation, cognitive functions, spontaneously hypertensive rats

ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННАЯ ВОЗБУДИМОСТЬ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ ПОСТСТРЕССОРНЫХ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ: ИССЛЕДОВАНИЕ НА МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-76-81

Шалагинова И. Г.¹, Вылегжанина А. Э.¹,
Зачепило Т. Г.², Дюжикова Н. А.²

¹ Балтийский федеральный университет им. И. Канта
236041, г. Калининград, ул. Александра Невского, д. 14

² Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН
199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.б.

e-mail: shalaginova_i@mail.ru

Аннотация. Обсуждается возможная роль возбудимости нервной системы в патогенезе постстрессорных расстройств. Животные с контрастной генетически детерминированной возбудимостью нервной системы имеют различную динамику и выраженность поведенческих нарушений в ответ на стресс, процессов нейровоспаления и показателей разнообразия микробиоты ЖКТ.

Ключевые слова: возбудимость нервной системы, стресс, постстрессорные расстройства, нейровоспаление, ось «микробиота-кишечник-мозг»

Распространенность психопатологий, таких как депрессия и тревожные расстройства, растет во всем мире. Нейробиологическая основа этих психопатологий остается неясной, а объективные маркеры для диагностики и оценки риска отсутствуют. Гипотеза «стресс-диатез» [1] предполагает, что к их манифестации приводит взаимодействие двух факторов: генетической уязвимости и воздействия стрессоров. Высокая генетическая уязвимость с большей вероятностью приведет к развитию психопатологии в ответ на стресс. И наоборот, организмы с низкой генетической уязвимостью могут быть относительно устойчивы к стрессу и менее склонны к развитию психопатологических симптомов, даже в неблагоприятных условиях.

Наше понимание генетической уязвимости в отношении психических расстройств сегодня не является исчерпывающим и многое остается неизвестным. Необходимо выявить конкретные генетические факторы риска, понять их взаимодействие с факторами окружающей среды и только после этого результаты исследований можно будет воплотить в индивидуальные подходы к профилактике и лечению психических расстройств.

Мы предполагаем, что использование с этой целью в качестве моделей линейных животных с высокой и низкой возбудимостью нервной системы является перспективным, поскольку позволяет выявлять генетические факторы риска развития симптомов психопатологии при действии стресса, связанные с основными свойствами нервных процессов. Возбудимость, являясь важнейшей характеристикой функционального состояния нервной системы, доступна для объективного измерения и является более простым признаком для искусственного отбора, чем поведенческие характеристики лабораторных животных.

Предстоит понять не только то, какие генетические уязвимости связаны с развитием той или иной патологии, но и за счет каких процессов стресс приводит к нарушениям функций центральной нервной системы. В последние годы нейровоспаление рассматривается как один из механизмов, посредством которого стрессорная реакция меняет молекулярную, эпигенетическую и, в конечном итоге, клеточную пластичность, таким образом, что нарушается функция нервной ткани и, как следствие, поведение. В качестве возможного регулятора процессов нейровоспаления рассматривают ось «микробиота-кишечник-мозг», поскольку известно, что микроорганизмы могут через выделяемые ими метаболиты влиять на работу клеток нервной ткани, в том числе, на транскрипцию генов, связанных с воспалением через эпигенетические механизмы.

В данной работе мы изучили выраженность постстрессорного нейровоспаления и динамику изменений микробиоты кишечника у крыс с наследственно обусловленным высоким и низким уровнем возбудимости нервной системы.

Исследование проводили на пятимесячных самцах крыс двух линий: высокий порог, низкая возбудимость (ВП) и низкий порог, высокая возбудимость (НП), которые были селектированы в Институте физиологии им. И. Павлова РАН по величине порога возбудимости большеберцового нерва к электрическому току. Животные экспериментальных групп обеих линий были подвергнуты

длительному эмоционально-болевному стрессированию по протоколу К. Гехта.

Стрессированных животных и соответствующие контрольные группы декапитировали через 24 часа, 7, 24 и 60 дней после воздействия стресса, анализ поведения проводили в этих же временных точках после окончания стрессирования.

Поведение оценивали с помощью тестов «Открытое поле» (ОП) и «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Для оценки нейровоспаления в гиппокампе и префронтальной коре оценивали количество иммунопозитивных клеток (микроглиальный маркер Iba1), определяли уровень мРНК генов, связанных с про- и противовоспалительными цитокинами, в структурах, вовлеченных в патогенез постстрессорных патологий (префронтальная кора, гиппокамп, миндалина). Кроме того, оценивали уровень экспрессии некоторых генов, вовлеченных в синаптическую пластичность (*nr3c1*, *nr3c2*, *bdnf*).

Для изучения микробного разнообразия экстрагировали ДНК из стула животных с последующим секвенированием гена 16S рРНК.

Выявлены специфичные для линий крыс с контрастной возбудимостью поведенческие эффекты стресса: у низковобудимых животных (ВП) отсутствовали какие-либо постстрессорные поведенческие симптомы на протяжении большей части периода наблюдений, однако через 60 дней после окончания стрессирования крысы данной линии демонстрировали значимое снижение локомоции и груминга в тесте ОП по сравнению с контролем. У высоковозбудимых животных линии НП наблюдаются выраженные тревожно-подобные симптомы уже через сутки после стресса и сохраняются до 60 го дня.

У высоковозбудимых крыс обнаружено значимое увеличение числа микроглиальных клеток на 7 сутки после стрессирования во всех исследованных зонах гиппокампа, уровень мРНК провоспалительного цитокина *IL1 β* у этих животных значимо выше по сравнению с контролем к 24 му дню после стресса в гиппокампе и миндалине. Эффект стресса на количество микроглиальных клеток у низковобудимых крыс менее выражен и заметен только в области CA1 в тот же временной промежуток, а увеличение экспрессии гена *il1 β* отмечено только в гиппокампе через 24 дня после окончания стрессирования.

Анализ экспрессии генов, вовлеченных в синаптическую пластичность у интактных животных показал, что высоковозбудимые

крысы линии НП имеют значимо более низкий уровень экспрессии гена *nr3c2* (кодирующего минералкортикоидный рецептор) в гиппокампе по сравнению с низковобудимой линией ВП. Анализ краткосрочного и долгосрочного действия стресса на уровень экспрессии изучаемых генов выявил снижение уровня мРНК *bdnf* в префронтальной коре и гиппокампе у крыс линии НП.

Микробиота кишечника интактных низковобудимых крыс (ВП) характеризуется большим разнообразием по сравнению с высоковозбудимыми, о чем свидетельствуют значимо более высокие значения индексов альфа-разнообразия, но под воздействием стресса представленность конкретных родов бактерий меняется более динамично по сравнению с линией НП.

Можно предполагать, что исходно большее разнообразие микробиоты кишечника низковобудимых животных является одним из факторов, способных регулировать экспрессию генов провоспалительных цитокинов посредством выделения короткоцепочечных жирных кислот, ингибирующих гистондеацетилазы хозяина (HDACs), тем самым влияя на активацию транскрипции генов хозяина не только в крови, но и в мозге. Это позволяет сдерживать развитие постстрессорного нейровоспаления, что, по-видимому, обеспечивает большие адаптивные возможности низковобудимым животным линии ВП, которые в ответ на стресс показывают менее выраженные тревожно-подобные симптомы по сравнению с высоковозбудимой линией.

Гипотеза «Мульти-сетевой нейронной гипервозбудимости» [2] предполагает, что стойкое возбуждение в нервных цепях, связанных с генерацией тревоги, приводит к тревожным расстройствам; гипер (гипо)возбуждение в цепях, связанных с пониженным эмоциональным фоном, вызывает симптомы депрессии; постоянное возбуждение в цепях, вовлеченных в когнитивную обработку, вызывает навязчивые мысли. Такая патологическая нейрональная активность может быть вызвана неспособностью «уязвимой» нервной системы регулировать свое состояние при воздействии стрессора. Строгих доказательств данной гипотезы нет, частично она подтверждается GWAS исследованиями (полногеномный поиск ассоциаций) и транскриптомным анализом, которые свидетельствуют о том, в патогенезе психопатологий принимают участие гены, связанные с кальциевыми каналопатиями [3]. Полученные нами данные, не являясь прямыми доказательствами причинно-следственной связи уровня возбудимости с постстрессорными поведенче-

скими нарушениями у крыс, не противоречат высказанным выше предположениям.

Возможно, существуют и негативные эффекты аномально низкой возбудимости, когда сниженная нейрональная активность в важных для эмоционального контроля нервных сетях, так же приводит к нарушениям адаптации.

Полученные результаты позволяют сформулировать новые вопросы: как будут влиять другие модели длительного стресса на физиологические функции и поведение крыс с различной возбудимостью нервной системы? Каковы генетические и эпигенетические различия линий с высокой и низкой возбудимостью? Какие эпигенетические факторы могут быть потенциальными регуляторами развития постстрессорного воспаления у крыс с разной возбудимостью? Зная о влиянии стресса на микробиоту кишечника и возможностях микроорганизмов-симбионтов модулировать функциональное состояние ЦНС, необходимо проверить, будут ли целенаправленные изменения состава микробного сообщества, либо содержания микробных метаболитов, оказывать противовоспалительное действие в нервной ткани и способно ли такое вмешательство нормализовать поведение животных.

Финансовая поддержка: данное исследование было поддержано из средств программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» БФУ им. И. Канта и Госпрограммы 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019—2030), тема 0134—2019—0002.

Список литературы

1. Monroe S. M., Simons, A. D. Diathesis-stress theories in the context of life stress research: implications for the depressive disorders//Psychol. Bull. — 1991. — №.110. — P. 406—425.
2. Binder M. R. The neuronal excitability spectrum: A new paradigm in the diagnosis, treatment, and prevention of mental illness and its relation to chronic disease//Am. J. Clin. Exp. Med. — 2021. — Т. 9. — № 6. — P. 187—203.
3. Liu Y. et al. Meta-analysis of genome-wide association data of bipolar disorder and major depressive disorder//Mol. Psychiatry. — 2011. — Т. 16. — № 1. — P. 2—4.

GENETICALLY DETERMINED NERVOUS SYSTEM EXCITABILITY AS A RISK FACTOR FOR THE DEVELOPMENT OF POST-STRESS BEHAVIORAL DISORDERS: A STUDY ON ANIMAL MODELS

I. Shalaginova^{1*}, A. Vylegzhanina¹,
T. Zachepilo², N. Dyuzhikova²

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University
236041, Kaliningrad, st. Alexandr Nevskogo, 14

² Institute of Physiology. I. P. Pavlov RAS
199034, St. Petersburg, nab. Makarova, 6.

*e-mail: shalaginova_i@mail.ru

Annotation. The possible role of nervous system excitability in the pathogenesis of post-stress disorders is discussed. Animals with contrasting genetically determined nervous system excitability show different dynamics and severity of behavioral disturbances in response to stress, neuroinflammation processes, and indicators of gut microbiota diversity.

Key words: nervous system excitability, stress, post-stress disorders, neuroinflammation, the “microbiota-gut-brain” axis.

СОВРЕМЕННЫЕ СТРАТЕГИИ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ ТЕРАПИИ СПИНАЛЬНОЙ ТРАВМЫ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-82-83

Баклаушев В. П.^{1,2}

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России 117513, Москва, Россия

² ФГБУН институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, 119991 Москва, Россия

e-mail: baklaushev@fccps.ru

Ключевые слова: нейрорегенерация, репрограммирование, нейральные стволовые клетки, нейромодуляция

Ограниченные возможности регенерации ЦНС у человека требуют создания новых источников нейральных стволовых клеток (НСК) для регенерации. Таким источником могут быть репрограммированные в нейральном направлении аутологичные соматические клетки. В отличие от взрослых НСК, наличие которых у человека в последнее время ставится под сомнение, репрограммированные НСК характеризуются повышенной способностью к нейрональной дифференцировке, несмотря на воспалительное микроокружение взрослого мозга. В течение последней декады активно разрабатываются технологии прямого пронеуронального репрограммирования или трансдифференцировки, минующей стадию клеток с индуцированной плюрипотентностью. В последние годы предпринимаются весьма интересные попытки прямого репрограммирования глиальных клеток *in situ* с помощью различных биотехнологических подходов. Краеугольной проблемой успешной регенеративной терапии церебральной и спинальной травмы является предотвращение развития грубого соединительнотканного рубца на месте травмы, препятствующего регенерации проводящих путей спинного мозга. С целью его преодоления разрабатываются различные скаффолды, облегчающие прорастание аксонов, а также испытываются различные генотерапевтические средства нокдауна ключевых факторов образования рубца или наоборот, активации ремоделирования внеклеточного матрикса и репаративной регенерации.

Крайне интересным и перспективным при заболеваниях и травмах ЦНС представляется применение нейромодуляции. Показано, что эпидуральная стимуляция в зоне L2-S1 у человека и млекопитающих активирует так называемые SPG нейроны, обеспечивающие функционирование спинального генератора ходьбы. Одним из наиболее перспективных подходов представляется комбинирование нейротехнологий и регенеративных технологий, в частности, имплантации скаффолдов с репрограммированными клетками с последующей нейромодуляцией.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ФОКАЛЬНОЙ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ IN VIVO

DOI 10.24412/CL-37124-2023-84-85

Шумкова В. В.¹, Ситдикова В. Р.¹, Силаева В. М.¹,
Логашкин А. Е.¹, Мамлеев А. Р.¹, Минлебаев М. Г.¹

¹ НИЛ Нейробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Казань, Россия
e-mail: victshumkova@gmail.com

Аннотация. Эпилепсия — заболевание, сопровождающееся приступами гиперсинхронной нейронной активности. Используя крысиную модель, мы исследовали механизмы распространения фокальной эпилепсии. Наши результаты показали, что эпилептическая активность распространяется с вовлечением преимущественно супра- и инфрагранулярных слоев неокортекса.

Ключевые слова: фокальная эпилепсия, 4-аминопиридин, крыса, in vivo

Эпилепсия — неврологическое заболевание с повторяющимися приступами гиперсинхронной нейронной активности, которое поражает до 2% новорожденных. Более половины случаев составляет фокальная эпилепсия, которая характеризуется наличием очага — участка коры, в котором происходит зарождение эпилептической активности [1]. Однако фокальные припадки часто распространяются и/или перерастают в генерализованные [2]. При этом неонатальные судороги характеризуются чрезвычайно высоким уровнем смертности (до 20%), а также наличием неврологических нарушений, инвалидности и задержки развития у выживших детей. В связи с этим понимание механизмов возникновения и распространения приступов является жизненно важным для совершенствования терапевтических подходов к лечению этого разрушительного заболевания.

Чтобы описать пространственное распространение эпилептической активности, мы использовали комбинацию вне- и внутриклеточных электрофизиологических регистраций in vivo. Регистрация проводилась на крысах p15-p27, где p0-день рождения.

Эпилептиформная активность вызывалась с помощью интракортикальной инъекции 4-аминопиридина (4-АП, 100 мМ, 0,5—1 мкл).

Наши результаты показали, что фокальная эпилептическая активность распространяется преимущественно по супрагранулярным и инфрагранулярным слоям, в то время как гранулярный слой слабо вовлечен в эпилептическую активность. Результаты настоящего исследования могут лечь в основу разработки новой тактики лечения фокальной эпилепсии.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22—25—00225.

Список литературы

1. Panayiotopoulos, C. (2005). Neonatal Seizures and Neonatal Syndromes. Bladon Medical Publishing.
2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2599/?report=printable>
3. Pisani, F., Spagnoli, C., Falsaperla, R., Nagarajan, L., Ramantani, G. (2021). Seizures in the neonate: A review of etiologies and outcomes.
4. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2020.12.023>

PROPAGATION OF FOCAL EPILEPTIC ACTIVITY IN VIVO

Shumkova V. V.¹, Sitdikova V.R.¹, Silaeva V. M.¹,
Logashkin A. E.¹, Mamleev A. R.¹, Minlebaev M. G.¹

¹ Laboratory of Neurobiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia
e-mail: victshumkova@gmail.com

Annotation. Epilepsy is a disease associated with episodes of hyper-synchronous neuronal activity. Using a rat model, we studied the mechanisms of propagation of epilepsy. Our results showed that epileptic activity spreads by involving supra- and infragranular layers.

Key words: focal epilepsy, 4-aminopyridine, rat, in vivo

АКТИВАЦИЯ WNT КАСКАДА ПРИВОДИТ К ЧАСТИЧНОЙ КОМПЕНСАЦИИ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ ДИСФУНКЦИЕЙ У КРЫС

DOI 10.24412/CL-37124-2023-86-92

Добрякова Ю. В.¹, Герасимов К. А.¹, Короткова Т. А.¹,
Корягина А. А.¹, Маркевич В. А.¹, Большаков А. П.¹

¹ Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва, Россия
e-mail: julkadobr@gmail.com

Аннотация. Холинергическая дисфункция является одним из компонентов патогенеза нейродегенеративных заболеваний. В работе исследовали защитные свойства активатора канонического wnt каскада wnt3a в условиях холинергического дефицита в гиппокампе и обнаружили, что wnt3a может вызывать частичную компенсацию последствий этого дефицита.

Ключевые слова: холинергическая дисфункция, wnt, гиппокамп, ацетилхолин, синаптическая пластичность

Патогенез ряда нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, тяжелые формы болезни Паркинсона, деменция с тельцами Леви и т. д. имеет ряд общих элементов, несмотря на различия в симптомах болезней. Одним из общих элементов является дисфункция холинергической системы. Дегенерация холинергических нейронов базальных ядер переднего мозга происходит как при болезни Альцгеймера, так и при тяжелых случаях болезни Паркинсона и деменции с тельцами Леви [1,2]. Другим элементом является снижение активности сигнального каскада wnt, которое, как считается, может лежать в основе гиперактивации гликогенсинтазы киназы 3-бета и формирования нейрофибриллярных клубков гиперфосфорилированного тау-белка [3], являющегося в норме одним из компонентов аксонального цитоскелета нейронов, вовлеченных в стабилизацию микротрубочек. Дисфункция wnt каскада наряду с инсулиновой резистентностью, очень часто развивающейся при упомянутых патологиях [4,5], может приводить к повышенной активности GSK3b и гиперфосфорилированию тау, которое

происходит в результате фосфорилирования этого белка по множеству сайтов, к нарушению его функции, дестабилизации внутриклеточного транспорта, и, как следствие, гибели клеток.

Основными ферментами, вовлеченными в процесс фосфорилирования тау-белка, являются циклин-зависимая киназа 5 и гликоген-синтаза киназа 3-бета (GSK3b). Последний фермент является одним из ключевых в двух сигнальных каскадах — это каскад, запускаемый инсулиновым рецептором и frizzled (fzd) рецепторами, активирующими wnt каскад [6].

Исследования роли сигнального каскада wnt, опосредованного fzd рецепторами, а также роли GSK3b проводятся на различных животных моделях. Эти модели включают в себя животных, у которых был индуцирован тот или иной дефицит с помощью определенных токсинов, или трансгенных животных, несущих человеческие семейные мутации, которые ассоциированы с развитием тех или иных нейродегенеративных заболеваний. На трансгенных животных, сверхэкспрессирующих человеческий бета-амилоид с семейными мутациями, было показано повышение экспрессии белка Dkk1, регулирующего активность wnt каскада, и снижение активности канонического wnt каскада [4]. Другим важным аспектом, связывающим сигнальный путь wnt и болезнь Альцгеймера, является то, что снижение активности wnt каскада приводит к накоплению бета-амилоида [7] и активация каскада, напротив, препятствует его накоплению и подавляет экспрессию протеазы BACE, расщепляющей белок-предшественник амилоида (APP) [8].

В работе изучили защитную роль сверхэкспрессии лиганда сигнального пути wnt (wnt3a) на фоне холинергической дисфункции. На основании результатов электрофизиологических и поведенческих экспериментов оценили влияние сверхэкспрессии лиганда wnt3a на функциональные свойства глутаматергических синапсов области CA1 гиппокампа и когнитивные нарушения, возникающие при холинергической дисфункции.

Эксперименты выполнили на половозрелых крысах-самцах Вистар (n = 64, масса тела 250—350 г). Все животные были случайным образом разделены на три экспериментальные группы, состоявшие из крыс, которым вводили 192IgG-сапорин и контрольную конструкцию (n = 20), животных, которым вводили фосфатно-солевой буфер и контрольную конструкцию (n = 24) и крыс, которым вводили 192IgG-сапорин и конструкцию, сверхэкспрессирующую wnt3a (n = 20). Электрофизиологическому и поведенческому исследованию

дованиям предшествовала хирургическая операция. Крысы получали интрасептальные инъекции 192IgG-сапорина или растворителя в медиальную септальную область (МСО) (AP +0,4 мм, L +1,5 мм, 14°). Препарат вводили в дозе 1,5 мкг/на крысу. Вирусную конструкцию, несущую wnt3a или контрольную конструкцию вводили в оба гиппокампа (AP -2,9 мм, L +1,9 мм, H -3,3 мм) в объеме 1 мкл/сторону. Эксперименты проводили через 21 день после операции.

Часть животных включили в серию электрофизиологических экспериментов ($n = 34$). Крыс анестезировали уретаном (1,75 г/кг массы тела, внутривенно). Стимулирующий никель-хромовый электрод (диаметр 80 мкм) вживляли в вентральную гиппокампальную комиссуру (ВГК) (AP -1,3 мм, L +1,0 мм, H -3,5 мм). Регистрирующий электрод имплантировали в область СА1 (AP -2,7 мм, L +1,5 мм, H -2,2 мм). Амплитуду вызванных постсинаптических потенциалов (ВПСП) в поле СА1 после стимуляции ВГК (межстимульный интервал 30 мс; время между циклами 20 сек при интенсивности 100—400 мкА) рассчитывали, суммируя 10 последовательных стимулов, и регистрировали каждые 10 мин. Интенсивность тестового парного импульса устанавливали на уровне 40—50% от максимальной амплитуды ВПСП. Базовую активность регистрировали в течение 30 мин. После этого индуцировали долговременную потенциацию (ДП) в поле СА1, тетанизируя ВГК высокочастотной стимуляцией (5 стимуляций, состоявших из 4 серий по 5 стимулов с частотой 100 Гц с межстимульным интервалом 200 мс и интервалом между сериями 30 с).

Начиная с 21 дня после инъекции токсина, на оставшихся особях ($n = 30$) провели серию тестов для анализа поведенческой активности, включая «Открытое поле» (21 день), «Сужающаяся дорожка» (22—26 дни) и «Y-образный лабиринт» (26 день).

Двигательную и исследовательскую активность животных изучали в тесте «Открытое поле». В течение 5 мин регистрировали следующие показатели: пройденное расстояние, скорость передвижения, вертикальную активность (число стоек), число и общее время реакций груминга и длительность и число замираний.

Сенсомоторную координацию оценивали в тесте «Сужающаяся дорожка». В течение первых четырех дней животных обучали доходить по дорожке до целевой камеры. На пятый день проводили тестирование. Для оценки применяли балльную систему подсчета. Итоговая оценка включала в себя сумму трех испытаний, причем баллы присваивали отдельно за каждый из четырех 50-сантиметровых

сегментов дорожки (максимальная оценка 12 баллов за 3 испытания). 0 баллов присваивали, если животное соскальзывало лапой с поверхности дорожки, оценку 1 балл давали, если крыса прошла сегмент без ошибок.

Кратковременную память оценивали, исследуя поведение чередования в Y-образном лабиринте. Регистрировали поведение спонтанного чередования, основанное на способности животных запоминать рукав, который оно только что исследовало, и не входить в те рукава, которые оно посещало до этого. Длительность тестирования составляла 8 мин. В течение всего теста крысы свободно перемещались по лабиринту. Регистрировали последовательность входов в каждый рукав. Чередование определяли как последовательные входы в рукава лабиринта без возврата в ранее посещенный рукав или рукав, из которого животное вышло в данный момент времени. Таким образом, процент чередований оценивали как (число чередований/число входов в рукава — 2) \times 100).

После экспериментов проводили иммуногистохимическое исследование для подтверждения гибели холинергических нейронов. Окрашивание производили антителами, связывающими холинацетилтрансферазу (ХАТ), являющуюся маркером холинергических нейронов. У животных, которым вводили 192IgG-сапорин в МСО или 192IgG-сапорин совместно с вирусом, оверэкспрессирующим wnt3a количество ХАТ-позитивных нейронов было статистически значительно меньше по сравнению со значением показателя у животных из контрольной группы ($10,2 \pm 11,4$, $23,8 \pm 21,3$ и $105,1 \pm 39,2\%$ соответственно, $p < 0,0167$ в обоих случаях).

У части крыс собирали образцы гиппокампов для оценки активности ацетилхолинэстеразы. Активность фермента в гиппокампе крыс определяли спектрофотометрическим методом. На фоне введения иммунотоксина выявили статистически значимое снижение активности фермента ($p < 0,0167$), а оверэкспрессия wnt3a не компенсирует индуцированный дефицит ($p < 0,0167$).

В первой серии ДП, индуцировали в синапсах ВГК-СА1 с помощью высокочастотной стимуляции ВГК, которая одновременно активирует аксоны, исходящие из МСО и области СА3 гиппокампа. В эксперименте наблюдали статистически значимый эффект основного воздействия на ответы, вызванные высокочастотной стимуляцией ВГК ($F_{1,19} = 5,99$, $p < 0,01$). Прирост амплитуды ВПСП у животных из группы, получавших иммунотоксин 192IgG-сапорин был статистически значительно ниже, чем у крыс, получавших инъек-

цию растворителя. У животных, которым одновременно вводили 192IgG-сапорин и конструкцию для оверэкспрессии wnt3a, выявили восстановление величины долговременной потенциации, оцениваемой по приросту амплитуды ВПСП, по сравнению со значениями амплитуды у животных, которым вводили только 192IgG-сапорин и вирусы с контрольной конструкцией. Таким образом, ДП, индуцированная одновременной активацией глутаматергических аксонов пирамидных нейронов зоны СА3 и септальных волокон критически зависит от активации септальных холинергических аксонов, а оверэкспрессия wnt3a частично восстанавливает нарушения, вызванные холинергическим дефицитом.

Во второй серии экспериментов при анализе горизонтальной или вертикальной двигательной активности или исследованных показателей поведения в тесте «Открытое поле» достоверных различий между группами не выявили. При анализе показатели тонкой координации движения в тесте «Сужающаяся дорожка» выявили существенное изменение у крыс, получавших инъекции 192IgG-сапорин. На фоне инъекции 192IgG-сапорин отметили статистически значимое снижение координации, измеренному по балльной шкале ($9,8 \pm 0,35$ баллов, $n = 11$) по сравнению со значением показателя у животных из контрольной группы ($11,3 \pm 0,21$, $n = 13$, $p < 0,01$) и животными, которым инъецировали аденоассоциированные вирусы, несущие каскету с wnt3a ($10,8 \pm 0,25$, $n = 10$, $p < 0,05$). Поведение спонтанного чередования рукавов в Y-образном лабиринте позволяет, хотя и в достаточно примитивной форме, оценить состояние кратковременной (рабочей) памяти. Введение 192IgG-сапорина приводило к выраженному нарушению чередования и оверэкспрессия wnt3a не предотвращала ухудшение показателей в этом тесте. Установлено, что чередования в контроле наблюдались на уровне $66,5 \pm 3,23$ %, а у животных из групп, которым вводили 192IgG-сапорин и 192IgG-сапорин с wnt3a $49,96 \pm 7,03$ % и $50,15 \pm 6,5$ % соответственно.

На основании данных, полученных при исследовании защитного эффекта активации канонического wnt-каскада на модели холинергического дефицита, вызванного введением иммунотоксина 192IgG-сапорин в МСО, показали, что при оверэкспрессии wnt3a в гиппокампе происходит частичное восстановление амплитуды синаптического ответа в области СА1 гиппокампа в ответ на стимуляцию ВГК и восстановление моторной активности в тесте «Сужающаяся дорожка». Согласно литературным данным,

По всей видимости, связь между поведенческими реакциями и активацией wnt-каскада не является однозначной. Наблюдаемое взаимодействие может быть результатом проявления работы тонких неизученных внутриклеточных механизмов, обусловленных развитием компенсаторной реакции на повреждение, длительной вынужденной активации каскада или рядом других эффектов. Активация канонического wnt-каскада может оказывать самостоятельное влияние на поведение, указывая на то, что активация этого каскада может оказывать положительный эффект при когнитивных нарушениях.

Список литературы

1. Ray NJ, Bradburn S, Murgatroyd C, Toseeb U, Mir P, Kountouriotis GK, et al. In vivo cholinergic basal forebrain atrophy predicts cognitive decline in de novo Parkinson's disease. *Brain* 2018;141:165—76. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWX310>.
2. Grothe MJ, Schuster C, Bauer F, Prudlo J, Teipel SJ, Heinsen H. Atrophy of the cholinergic basal forebrain in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease dementia. *J Neurol* 2014;261:1939—48. <https://doi.org/10.1007/S00415—014—7439-Z>.
3. Passamonti L, Rodríguez PV, Hong YT, Allinson KSJ, Williamson D, Borchert RJ, et al. 18F-AV-1451 positron emission tomography in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *Brain* 2017;140:781—91. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWW340>.
4. Palomer E, Buechler J, Salinas PC. Wnt Signaling Deregulation in the Aging and Alzheimer's Brain. *Front Cell Neurosci* 2019;13. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00227>.
5. Kellar D, Craft S. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches. *Lancet Neurol* 2020;19:758—66. [https://doi.org/10.1016/S1474—4422\(20\)30231—3](https://doi.org/10.1016/S1474—4422(20)30231—3).
6. Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:769—76. <https://doi.org/10.1038/35096075>.
7. Tapia-Rojas C, Burgos P V., Inestrosa NC. Inhibition of Wnt signaling induces amyloidogenic processing of amyloid precursor protein and the production and aggregation of Amyloid- β (A β)42 peptides. *J Neurochem* 2016;139:1175—91. <https://doi.org/10.1111/JNC.13873>.
8. Parr C, Mirzaei N, Christian M, Sastre M. Activation of the Wnt/ β -catenin pathway represses the transcription of the β -amyloid

precursor protein cleaving enzyme (BACE1) via binding of T-cell factor-4 to BACE1 promoter. *FASEB J* 2015;29:623—35. <https://doi.org/10.1096/FJ.14—253211>.

WNT CASCADE ACTIVATION LEADS TO PARTIAL COMPENSATION OF CHOLINERGIC DYSFUNCTION CAUSED BY 192-IGG-SAPORIN IN RAT BRAIN

Dobryakova Yu. V.¹, Gerasimov K.¹, Korotkova T. A.¹, Koryagina A.¹, Markevich V. A.¹, Bolshakov A. P.¹

¹ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS

Annotation. Cholinergic dysfunction plays a key role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. We studied the protective properties of the wnt cascade activator wnt3a under conditions of cholinergic dysfunction in the hippocampus. We found that wnt3a can partially restore behavioral activity and synaptic plasticity induced with immunotoxin.

Key words: cholinergic dysfunction, wnt, hippocampus, acetylcholine, synaptic plasticity

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МАСС—СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ФАСИЛИТИ ФЕДЕРАЛЬНОГО ЦЕНТРА МОЗГА И НЕЙРОТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-93-95

Корженевский Д. А.¹, Кудряшова О. М.¹

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия
e-mail: korzhenevski.d@fccps.ru

Аннотация. Масс-спектрометрическая протеомика и метаболомика все шире используются для изучения процессов в нервной системе. В докладе описаны технические и методические возможности масс-спектрометрической фасилити ФЦМН в данной области.

Ключевые слова: протеомика, метаболомика, липидомика, флакс-анализ

Омиксные технологии — это набор технических и методических подходов, обеспечивающих ненаправленный поиск и комплексный анализ изменений содержания широких групп химических соединений в биологических объектах при изменениях их состояния. К таким группам традиционно относят ДНК (геномика), РНК (транскриптомика), белки (протеомика), низкомолекулярные метаболиты (метаболомика), из числа последних часто выделяют в отдельную группу липиды и другие неполярные соединения (липидомика). К настоящему времени эти направления омиксных технологий хорошо разработаны и существует немало примеров успешного их использования для изучения средне- и долгосрочных изменений в нервной системе или отдельных ее компонентах [1, 2]. В этом списке технологий протеомика, липидомика и метаболомика могут быть выделены в отдельную подгруппу как потому, что изучают более быстрые изменения состояния клеток, так и потому, что для генерации первичных данных о составе соответствующей фракции веществ часто применяют хромато-масс-спектрометрию.

Научно-производственный комплекс ФЦМН оснащен двумя хромато-масс-спектрометрами с детектором типа «орбитальная ловушка», позволяющими решать основные задачи протеомного

и метаболомного анализа и обладает квалифицированным персоналом, способным адаптировать и проектировать «мокрые» омиксные методики под имеющуюся техническую базу, а также обеспечивать последующий биоинформатический анализ полученных данных. В настоящее время в нашей омиксной фасилити налажены стандартные протоколы безметочной антаргетной и таргетной полуколичественной протеомики и с их помощью ведется, в частности, исследование процесса ферроптоза [3]. В стадии отладки находятся варианты протокола для безметочной редокс-протеомики (оценки доли окисленных цистеинов в протеоме) с использованием защиты окисленных и восстановленных остатков цистеина двумя разными химическими группами, которую можно использовать, в частности, для изучения окислительного стресса в нервной ткани.

На завершающей стадии отработки находится протокол для полуколичественной стандартной липидомики (т.е. анализа глицеро- и сфинголипидов), который также планируется приложить к оценке процесса ферроптоза. Ведется работа по адаптации описанных в литературе протоколов редокс-липидомики (прямого таргетного либо антаргетного полуколичественного измерения продуктов окисления полиненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов).

Другим примером приложения наших возможностей в области метаболомики является анализ метаболитических потоков (флакс-анализ). В этой технологии данные о распределении искусственно вводимых с разными пищевыми молекулами атомов стабильных изотопов углерода или азота между различными метаболитами используются для оценки интенсивности протекания тех или иных ветвей метаболизма. Этим методом нам удалось углубить понимание механизмов реализации Варбург-эффекта в онкотрансформированных клетках.

Список литературы

1. Tkachev A, Stepanova V, Zhang L, Khrameeva E, Zubkov D, Giavalisco P, Khaitovich P. *Sci Rep.* 2019 Dec 4;9 (1):18348.
2. Yim YY, Nestler EJ. *Biomolecules.* 2023 Jun 16;13 (6):998.
3. Alexey M, Nesterenko, Dmitry A. Korzhenevskii, Vasilisa M. Tereshchuk, Olga M. Kudryashova, Vsevolod V. Belousov, Arina G. Shokhina. *Data in Brief.* V. 48, June 2023: 109170

THE CAPABILITIES OF THE FCBRN'S MASS-SPECTRAL FACILITY USABLE IN NEURAL SYSTEM RESEARCH

Korzhenevskii D. A. ¹, Kudryashova O. M. ¹

¹ Federal center for brain research and neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

e-mail: korzhenevski.d@fccps.ru

Annotation. Mass-spectrometry based proteomics and metabolomics are now widely used in neural system studies. Here we describe the capabilities of the FCBRN's mass-spectral facility that may be applied to this research field.

Key words: proteomics, metabolomics, lipidomics, MFA

ПОИСК МЕТАБОЛОМНЫХ МАРКЕРОВ ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ НОВОРОЖДЕННЫХ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-96-99

Шевцова Ю. А.¹, Эльдаров Ч. М.¹, Горюнов К. В.¹,
Чаговец В. В.¹, Стародубцева Н. Л.¹, Ионов О. В.¹,
Силачев Д. Н.^{1,*}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Россия

*e-mail: silachevdm@genebee.msu.ru

Аннотация. Гипоксически-ишемическая энцефалопатия (ГИЭ) новорожденных — это острое повреждение головного мозга, возникающее вследствие ограниченности поступления кислорода и питательных веществ в головной мозг из-за нарушения кровоснабжения во время внутриутробного, интранатального или послеродового периода. К 2 годам до 60% детей с ГИЭ умирают или имеют серьезные нарушения, включая умственную отсталость, эпилепсию и церебральный паралич (ДЦП) [1]. В настоящее время единственным методом лечения младенцев с ГИЭ является терапевтическая гипотермия. Считается, что гипотермия эффективна, поскольку она снижает уровень свободных радикалов и глутамата, уменьшает потребность в кислороде и снижает апоптотическую гибель клеток [2]. Для эффективного лечения терапевтическую гипотермию необходимо проводить в течение первых 6 часов жизни. Однако, около 20% новорожденных младенцев, у которых в итоге разовьется ГИЭ средней или тяжелой степени, остаются без должного клинического внимания [3]. Для ранней дифференциальной диагностики ГИЭ новорожденных могут быть применимы подходы, основанные на анализе метаболических изменений в крови новорожденных с использованием хромато-масс-спектрометрии. Использование дополнительных критериев, таких как метаболомные маркеры, будет способствовать более точной и своевременной постановке диагноза и дифференциальной диагностике сочетанных повреждений. Клинические исследования в неонатальный период очень ограничены, при исследовании динамики молекулярного состава биологических жидкостей преимуществом

обладают неинвазивные образцы (моча, стул), а также малоинвазивные образцы (кровь, сухое пятно крови).

Ключевые слова: масс-спектрометрия, метаболомика, протеомика, диагностика, асфиксия новорожденных

Целью данного исследования являлось поиск маркеров раннего повреждения головного мозга на основе современных масс-спектрометрических методов анализа метаболома в плазме и мазках сухих пятен крови используя крысиную модель неонатальной ГИЭ.

Для определения маркеров, отражающих только патологические изменения головного мозга в результате ГИЭ, нами было смоделировано повреждение головного мозга в условиях *in vivo*. Для моделирования повреждения головного мозга отбирались 7-ми дневные крысы обоих полов. Для получения гипоксически-ишемического повреждения головного мозга применялся метод Райса-Ваннучи [4]. Крыс анестезировали 1%-ным изофлюраном, далее отделяли левую сонную артерию и пережигали ее электрокаутером. После подвергали крысят гипоксии в течение 2 часов в смеси газов: 8% кислорода и 92% азота. Через 4 часа после гипоксии для выявления морфологических изменений в зонах повреждения головного мозга крыс проводилась магнитно-резонансная томография.

Предполагается, что степень зрелости головного мозга может влиять на метаболические паттерны повреждения. Для проверки данной гипотезы была разработана модель фотохимически индуцированного тромбоза сосудов коры головного мозга. Крысята отбирались на двух сроках после рождения: через 7 суток (зрелость мозга которых соответствует зрелости мозга плода на сроке гестации 32—36 недель человека) и 12 суток после рождения (мозг 12-суточных крысят соответствует по степени зрелости мозгу доношенного новорожденного) [5]. При моделировании данным способом повреждения головного мозга производили индуцированный лазером тромбоз сосудов у 7-ми и 12-ти дневных крысят с последующим сбором сухих пятен и плазмы крови для метаболомного анализа с целью идентификации маркеров ишемического повреждения головного мозга. Для визуализации и морфометрии области фокального ишемического очага использовали магнитно-резонансную томографию через 4 часа после фототромбоза.

Через 6 часов после воздействия получали плазму и сухие пятна крови для последующего метаболомного анализа методом высокоэффективной хроматографии (Ultimate 3000 LC System)

с масс-спектрометрическим детектированием (Maxis Impact qTOF) (ВЭЖХ—МС).

Для выявления потенциальных низкомолекулярных маркеров повреждения головного мозга с использованием ВЭЖХ—МС был проведен анализ полученных данных. Многомерный статистический анализ (PLS-DA) данных ВЭЖХ—МС показал четкое разделение групп животных в обоих случаях как в экстрактах плазмы крови, так и в экстрактах сухих пятен крови. Полученные данные свидетельствуют о выраженном изменении состава метаболитов плазмы и цельной крови под действием ишемии/гипоксии у крысят. С помощью одномерного статистического анализа были отобраны и идентифицированы молекулярные ионы, концентрация которых статистически значимо изменялась между группами; проанализированы метаболические пути, в которых данные метаболиты участвуют. Так, анализ сухих пятен выявил пониженную концентрацию ряда фосфатидилхолинов и лизофосфатидмилхолинов, а также диглицеридов, в то время как триглицериды и моноациглицеролы были повышены в 2—7 раз. Наиболее вовлеченными метаболическими путями являлись метаболизм глицерофосфолипидов и сфинголипидов, а также путь биосинтеза стероидных гормонов. На основании проведенных исследований можно заключить, что в результате гипоксически-ишемических воздействий наблюдается заметное изменение метаболитов в крови лабораторных животных.

Таким образом, метод высокоэффективной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием может быть надежным способом детекции метаболических изменений в плазме крови и сухих пятнах крови для ранней диагностики гипоксически-ишемической энцефалопатии новорожденных.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22—15—00454, <https://rscf.ru/project/22—15—00454/>

Список литературы

1. Volpe JJ. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy.//Ann Neurol. — 2012; 72:156—166.
2. Roka A., Azzopardi D. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic ischaemic encephalopathy.//Early Human Development. — 2010; 86 (6):361—7.

3. DuPont T.L. [и др.]. Short-term outcomes of newborns with perinatal acidemia who are not eligible for systemic hypothermia therapy//The Journal of Pediatrics. 2013. № 1 (162). С. 35—41.
4. Rice J.E. [и др.]. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat//Annals of Neurology. 1981. № 9 (2):131—41.
5. Pressler R., Auvin S. Comparison of Brain Maturation among Species: An Example in Translational Research Suggesting the Possible Use of Bumetanide in Newborn.//Frontiers in Neurology. 2013. № 4.

ГЕНЕРАЦИЯ ВНУТРИНЕЙРОНАЛЬНОГО ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА *IN VIVO* ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-100-103

Елесина Е. А.^{1,2}, Цопина А. С.^{1,2}, Мальцев Д. И.^{1,3}, Солотенков М. А.², Калинин А. Л.¹, Ланин А. А.^{2,4}, Федотов И. В.^{2,4}, Федотов А. Б.^{2,4}, Мощенко А. А.³, Подгорный О. В.^{1,3,5}, Белоусов В. В.^{1,3,5,6}

¹ Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия,

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,

³ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва, Россия,

⁴ Российский квантовый центр, Сколково, Россия,

⁵ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия,

⁶ Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center, Skolkovo, Moscow, Russia
e-mail: elesina.ek@gmail.com

Аннотация. В работе была продемонстрирована генерация пероксида водорода хемогенетическим инструментом на основе оксидазы D-аминокислот в зубчатой извилине гиппокампа мыши *in vivo*. Использование этого инструмента в дальнейшем позволит ответить на вопрос о роли окислительного стресса в развитии нейродегенерации.

Ключевые слова: Окислительный стресс, Нейродегенерация, Оксидаза D-аминокислот

При окислительном стрессе наблюдается дисбаланс между окислителями и восстановителями в пользу окислителей, приводящий к нарушению редокс-сигналинга и/или повреждению молекул [3]. Хорошо известно, что нейродегенеративные заболевания и старение сопровождаются окислительным стрессом, однако до сих пор неясно, является ли окислительный стресс основным инициирующим событием, приводящим к нейродегенерации, поскольку раньше отсутствовали методы по созданию изолированного окислительного стресса [1].

Изолированный окислительный стресс можно создать с помощью оксидазы D-аминокислот (DAAO) из дрожжей *Rhodotorula gracilis*. DAAO — стереоспецифический фермент, катализирующий окислительное дезаминирование D-аминокислот, в результате которого в качестве побочного продукта образуется пероксид водорода. Фермент обладает высокой специфичностью к D-аминокислотам и имеет высокую ферментативную активность по сравнению с известными DAAO из других организмов. Кроме того, поскольку клетки млекопитающих преимущественно метаболизируют L-аминокислоты, а D-аминокислоты присутствуют в клетках в небольших количествах, то путем добавления клеткам, экспрессирующим DAAO, D-аминокислот можно контролируемо продуцировать пероксид водорода. Поскольку в дальнейшем мы планируем изучать нейродегенерацию под воздействием окислительного стресса, вызванного избыточным синтезом пероксида водорода, в данной работе мы проверяли, можно ли контролируемо продуцировать пероксид водорода с помощью хемогенетического инструмента на основе DAAO в возбуждающих нейронах гиппокампа мышей *in vivo*. Для наблюдения за образованием перекиси водорода в режиме реального времени мы использовали генетически кодируемый биосенсор HyPer7.

Посредством стереотаксической операции мы доставляли аденоассоциированные вирусы, содержавшие генетические конструкции с HyPer7 и DAAO или его мутантной инактивированной версией, в зубчатую извилину гиппокампа. Мутантная версия DAAO отличается заменой аргинина на аланин в 285 положении. Этот остаток аргинина играет ключевую роль в стабилизации D-аминокислот в активном центре DAAO и замена аргинина на аланин в мутантном белке приводит к многократному увеличению константы Михаэлиса, что делает фермент почти не активным с практически неизменной структурой [2], что позволяет его использовать в качестве контроля при экспериментах. В область введения вируса имплантировали ферулу, представляющую собой оптоволокно в керамической канюле. С помощью ферулы мы могли возбуждать флуоресценцию сенсора HyPer7 в целевой зоне и фиксировать ее интенсивность.

После периода восстановления мышей через ферулу подключали к оптической установке, состоявшей из двух источников излучения: 470 нм и 405 нм. Эти длины волн соответствуют двум максимумам возбуждения флуоресценции сенсора HyPer7. Камера фиксирует

вала интенсивность флуоресценции при длине волны 520 нм — максимуме флуоресценции сенсора. При окислении сенсора увеличивается соотношение интенсивностей флуоресценции при 470 и 400 нм ($F = F_{470}/F_{405}$). На протяжении часа мы записывали базовую линию, затем вводили мышам внутривентриально раствор D-норвалина в дозировке 3500 мг/кг, 1500 мг/кг, 500 мг/кг или 250 мг/кг и в течение 4 часов записывали ответ.

Мы показали, что после внутривентриального введения D-аминокислоты развивается ответ HuPer7, что свидетельствует о внутринейрональной генерации пероксида водорода. При этом интенсивность ответа сенсора коррелировала с количеством введенной D-аминокислоты. Таким образом мы показали, что DAAO способен генерировать пероксид водорода *in vivo*. Кроме того, мы убедились, что D-норвалин способен проникать через ГЭБ, что ранее показано не было.

Использование DAAO *in vivo* поможет нам ответить на вопрос о роли окислительного стресса нейронов в развитии нейродегенерации. Если эксперименты *in vivo* покажут, что хемогенетически индуцированный окислительный стресс действительно приводит к нарушениям поведения, очевидной гибели нейронов и другим признакам патологий мозга, связанных со старением, DAAO может стать перспективным инструментом для создания животных моделей, имитирующих ранние стадии нейродегенерации.

**Финансовая поддержка: грант РФФИ № 23—75—30023,
грант РФФИ № 22—22—00590.**

Список литературы

1. Kalinichenko A.L., Jappy D., Solius G.M., Maltsev D.I., Bogdanova Y.A., Mukhametshina L.F., Sokolov R.A., Moshchenko A.A., Shaydurov V.A., Rozov A.V., Podgorny O.V., Belousov V.V. Chemo-genetic emulation of intraneuronal oxidative stress affects synaptic plasticity//Redox Biol. 2023. V. 60. P. 102604.
2. Molla G., Porrini D., Job V., Motteran L., Vegezzi C., Campaner S., Pilone M.S., Pollegioni L. Role of Arginine 285 in the Active Site of Rhodotorula gracilis d-Amino Acid Oxidase: A SITE-DIRECTED MUTAGENESIS STUDY *//J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 32. P. 24715—24721.
3. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine//Redox Biol. 2015. V. 4. P. 180—183.

GENERATION OF INTRA-NEURONAL HYDROGEN PEROXIDE IN VIVO FOR MODELING NEURODEGENERATIVE DISEASES

Elesina E. A.^{1,2}, Tsoarina A. S.^{1,2}, Maltsev D. I.^{1,3}, Solotnikov M. A.², Kalinichenko A. L.¹, Lanin A. A.^{2,4}, Fedotov I. V.^{2,4}, Fedotov A. B.^{2,4}, Moschenko A. A.³, Podgorny O. V.^{1,3,5}, Belousov V. V.^{1,3,5,6}

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia,

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia,

³ Federal State Budgetary Institution “Federal center of brain research and neurotechnologies” of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia,

⁴ Russian Quantum Center, Skolkovo, Russia,

⁵ The Russian National Research Medical University named after N. I. Pirogov, Moscow, Russia,

⁶ Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center, Skolkovo, Moscow, Russia

Annotation. In this work we demonstrated the generation of hydrogen peroxide by the chemogenetic tool based on D-amino acid oxidase in the dentate gyrus of the mouse hippocampus *in vivo*. The use of this chemogenetic tool will further help to answer the question of the role of oxidative stress in the development of neurodegeneration.

Key words: Oxidative stress, Neurodegeneration, D-amino acid oxidase

НЕЙРОННАЯ АКТИВНОСТЬ СУБТАЛАМИЧЕСКОГО ЯДРА У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМ НАЧАЛОМ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

DOI 10.24412/CL-37124-2023-104-105

Филюшкина В. И.¹, Белова Е. М.¹, Гамалея А. А.,
Томский А. А., Седов А. С.¹

¹ ФГБУН Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва, Россия.

² ФГАУ “Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н. Н. Бурденко” Минздрава России, Москва, Россия.

e-mail: filyushkina.veronika@gmail.com

Аннотация.

В докладе будут показаны особенности параметров одиночной активности нейронов субталамического ядра (STN) у пациентов с ранним началом болезни Паркинсона.

Ключевые слова: активность одиночных нейронов, субталамическое ядро, болезнь Паркинсона, глубинная стимуляция мозга

В последние годы в клинической практике значительно возросла распространенность болезни Паркинсона (БП) с ранним началом, при этом особенности электрофизиологической активности мозга у этих пациентов остаются малоизученными. Целью настоящего исследования является описание характеристики одиночной нейронной активности субталамического ядра (STN) при БП с ранним началом.

Мы провели микроэлектродную регистрацию одиночной активности субталамического ядра у 18 пациентов с болезнью Паркинсона с ранним началом и у 14 пациентов с обычным началом (контрольная группа) во время нейрохирургических операции по вживлению электродов для глубинной стимуляции мозга (DBS). Все операции проводились под местной анестезией. Восьми пациентам с БП с ранним началом и восьми пациентам контрольной группы во время операции предъявлялись произвольные двигательные тесты. Мы разделили нейроны на 3 паттерна — тонический, нерегулярно-пачечный и пачечно-паузный паттерны с помощью метода иерархической кластеризации гистограмм плотности межмпуль-

сных интервалов и рассчитали частоту разрядов, коэффициент вариации (CV) и другие параметры.

Мы показали, что средняя частота разрядов (33 имп/сек) в группе раннего начала была сопоставима с частотой разрядов (36 имп/сек) в контрольной группе, при этом коэффициент вариации был значимо выше (0,99 против 0,93). Мы также обнаружили достоверные ($p < 0,001$, $\chi^2 = 19$) различия в распределении паттернов между исследуемыми группами пациентов. В STN пациентов с ранним началом наблюдался более высокий процент паузно-пачечных клеток (51,6% против 43,3%) и более низкий процент тонических нейронов (16,1% против 20,9%). Нерегулярно-пачечные и тонические нейроны в группе с ранним началом заболевания характеризовались более нерегулярным рисунком активности, а паузно-пачечные клетки характеризовались значительно более высокими альфа-осцилляциями. Анализ нейронных реакций позволил выделить пул реагирующих нейронов. Мы показали, что доля реагирующих нейронов была значительно выше ($\chi^2 = 6,7$, $p < 0,01$) в группе с ранним началом заболевания.

В целом наши результаты показали, что активность субталамического ядра у пациентов с ранним началом болезни Паркинсона значительно отличается от контрольной группы как по характеристикам одиночных нейронов, так и по чувствительности к двигательным тестам. Эти результаты представляют фундаментальный интерес, а также могут быть важны при поиске индивидуальных подходов к настройке программы DBS стимуляции.

NEURONAL ACTIVITY OF SUBTHALAMIC NUCLEUS IN EARLY ONSET PARKINSON'S DISEASE

Filyushkina V. I.¹, Belova E. M.¹, Gamaley A. A.²,
Tomskiy A. A.², Sedov A. S.¹

¹ Semenov Research Center of Chemical Physics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² N. N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow, Russia

Annotation. The report will show the features of single unit activity of the subthalamic nucleus (STN) in patients with early onset Parkinson's disease.

Key words: single unit activity, subthalamic nucleus, Parkinson's disease, deep brain stimulation

ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНАЛЬНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В ОСТРОЙ ФАЗЕ ГИАЛУРОНИДАЗА-ЗАВИСИМОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-106-108

Соколов Р. А.^{1,2,3}, Круть В. Г.², Мухина И. В.^{1,4}¹ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия,² Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, РАН, Москва, Россия,³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия⁴ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

e-mail: sokolov@neuro.nnov.ru

Аннотация. Внеклеточный матрикс мозга (ВКМ) представляет собой сеть макромолекул, синтезированную нейронами и глиальными клетками. В нашей работе мы оценили кальциевую активность нейронов в острой фазе разрушения ВКМ. Показано резкое увеличение концентрации внутриклеточного кальция. Показан резкий подъем потенциала на мембране нейронов. Показано увеличение частоты генерации спонтанных потенциалов действия интернейронов спустя 2 минуты после отмывки гиалуронидазы.

Ключевые слова: гиппокамп, нейрон, внеклеточный матрикс мозга, кальциевый имиджинг, потенциал действия.

Внеклеточный матрикс мозга (ВКМ) представляет собой упорядоченную сеть макромолекул и занимает порядка 20% объема взрослого мозга. ВКМ синтезируется нейронами и глиальными клетками мозга, и состоит из регуляторных белков и полисахаридов, таких как: гликозаминогликаны (гиалуроновая кислота), протеоглики (нейрокан, бревикан и др.), гликопротеины (тенасцины), коллагена и др. Физические функции ВКМ преимущественно барьерные (диффузия, растворимость ионов, удержание воды, клеточная миграция). В то же время ВКМ регулирует фундаментальные нейрональные процессы в ходе онтогенеза мозга и во взрослом возрасте (рост нейритов, синаптогенез, пластичность) [1].

Для изучения физиологических функций ВКМ чаще всего используется ферментативное удаление ВКМ при помощи специфических ферментов (гиалуронидаза, хондроитиназа и др.). Полимеры гиалуроновой кислоты являются ключевым компонентом ВКМ, выполняя якорную роль для остальных компонентов ВКМ. Ранее была найдена гиалуронидазо-зависимая модель эпилепсии на культурах клеток, в то же время подтверждена эпилепсия у мышинной модели с нокаутом гена, ответственного за производство гиалуроновой кислоты в мозге [2,3]. Однако все исследования строятся на модели изучения отсроченного (от нескольких часов до нескольких дней) влияния разрушения матрикса на клеточную и сетевую активность, в то время, как неизвестны эффекты в острой стадии разрушения ВКМ. Здесь мы демонстрируем эффекты острого разрушения ВКМ при помощи фермента гиалуронидазы на примере нейронов гиппокампа мыши.

Добавка гиалуронидазы к нейронам во время одновременной записи флуоресцентного сигнала от кальциевого сенсора и электрофизиологической регистрации патч-методом в режиме фиксации тока приводила к резкому повышению внутриклеточной концентрации кальция на 100% от базового уровня светимости сенсора одновременно с выходом мембранного потенциала на 0 ± 4 мВ. Значения флуоресцентного сигнала от сенсора и плато потенциала сохранялись в течении всего времени аппликации гиалуронидазы (2 минуты). В момент отмывки от гиалуронидазы наблюдалось резкое падение потенциала до исходных значений. Вместе с тем оценка частоты возникновения спонтанных потенциалов действия показала достоверное увеличение частоты у интернейронов (1.44 Гц против 3.19 Гц, $p < 0.02$), но не у пирамидальных нейронов (0.22 Гц против 0.88 Гц $p < 0.2$). Подобный эффект может быть связан с существующими перинеурональными сетями вокруг интернейронов, но не пирамидальных нейронов. Предварительное блокирование тетродотоксином быстрых натриевых потенциал-зависимых каналов или дилтиаземом кальциевых потенциал-зависимых каналов L-типа не приводило к изменению характера поведения кальциевого сенсора и мембранного потенциала при аппликации гиалуронидазы, по сравнению с контролем. Таким образом разрушение ВКМ в острой фазе имеет сложно-составную динамику наполнения кальцием цитозоля нейронов одновременно с глобальным повышением уровня мембранного потенциала, и требует дальнейшего изучения. Работа поддержана РФФ, грант № 23—15—00295.

Список литературы

1. D. Lam, H. A. Enright, J. Cadena, et al., Tissue-specific extracellular matrix accelerates the formation of neural networks and communities in a neuron-glia co-culture on a multi-electrode array, *Scientific Reports* 9 (2019) 4159. 10.1038/s41598-019-40128-1.
2. M. Vedunova, T. Sakharnova, E. Mitroshina, et al., Seizure-like activity in hyaluronidase-treated dissociated hippocampal cultures, *Front Cell Neurosci* 7 (2013) 149. 10.3389/fncel.2013.00149.
3. A. M. Arranz, K. L. Perkins, F. Irie, et al., Hyaluronan deficiency due to Has3 knock-out causes altered neuronal activity and seizures via reduction in brain extracellular space, *J Neurosci* 34 (2014) 6164-6176. 10.1523/jneurosci.3458-13.2014.

CHANGES IN NEURONAL SIGNALING DURING THE ACUTE PHASE OF THE HYALURONIDASE-DEPENDENT MODEL OF EPILEPSY

Sokolov R. A.^{1,2,3}, Krut' V. G.², Mukhina I. V.^{1,4}

¹ Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia,

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia,

³ Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia ⁴Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Annotation. The brain extracellular matrix (ECM) is a network of macromolecules synthesized by neurons and glial cells. We evaluated the calcium activity of neurons in the acute phase of the disruption of ECM. Here we show an increase in the intracellular calcium concentration. Also a sharp rise of the membrane potential of neurons is shown. Additionally, we revealed an increase in frequency of interneuronal spontaneous action potentials 2 minutes after hyaluronidase was washed out.

Key words: hippocampus, neuron, extracellular matrix, calcium imaging, action potential

УДК-612.82

ВЫСОКОЧАСТОТНЫЕ ПАЧКИ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ МЕНЯЮТ СВОЙСТВА ЗРИТЕЛЬНЫХ ОТВЕТОВ НЕЙРОНОВ НЕОКОРТЕКСА МЫШИ ПО МЕХАНИЗМУ ГЕТЕРОСИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-109-112

Смирнов И. В.¹, Осипова А. А.², Смирнова М. П.¹,
Бородинова А. А.¹, Малышев А. Ю.¹

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия;

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова Москва, Россия.
e-mail: ivan.vas.smirnov@gmail.com

Аннотация. Гетеросинаптическая пластичность является важным механизмом, обеспечивающим стабильность нейрональных сетей. В ходе нашей работы мы показали, что высокочастотные пачки потенциалов действия, индуцированные в нейронах зрительной коры мыши, могут приводить к уменьшению их ориентационной и дирекциональной селективности, развивающемуся, по всей видимости, по механизму гетеросинаптической пластичности.

Ключевые слова: нейрон, гетеросинаптическая пластичность, зрительная кора, оптогенетика, петч-клямп

Одним из важнейших свойств нейронных сетей является синаптическая пластичность, которая заключается в изменении эффективности синаптической передачи. Согласно современным представлениям, синаптическая пластичность может лежать в основе модификации нейронных сетей и их активности в процессе обучения. Тем не менее роль синаптической пластичности в формировании таких сложных сетевых свойств как параметры сенсорных ответов нейронов первичной зрительной коры до сих пор остается мало изученной.

При предъявлении животному зрительных стимулов происходит активация специфических синаптических входов, приводящая к генерации потенциалов действия в нейронах первичной

зрительной коры. В ряде работ было показано, что сенсорная стимуляция сама по себе способна вызвать долговременные пластические изменения синаптических входов, задействованных в формировании сенсорного ответа, по механизму гомосинаптической (хеббовской) пластичности. Другим видом долговременной синаптической пластичности является гетеросинаптическая пластичность, которой подвергаются неактивные синаптические входы. В ходе нашей работы мы исследовали роль гетеросинаптической пластичности в модификации сенсорных ответов нейронов первичной зрительной коры.

Одной из экспериментальных моделей, позволяющих селективно вызывать гетеросинаптическую пластичность, является внутриклеточная тетанизация постсинаптических нейронов, которая заключается в индукции высокочастотных пачек потенциалов действия путем инъекции импульсов тока через регистрирующий электрод. В ходе нашего исследования методом *in vivo* пэтч-кламп мы регистрировали подпороговые ответы нейронов первичной зрительной коры в ответ на предъявление зрительных стимулов в виде движущихся в двух противоположных направлениях полос различной ориентации. После записи контрольных зрительных ответов мы производили внутриклеточную тетанизацию исследуемых нейронов, после чего продолжали тестирующую зрительную стимуляцию. Нами было обнаружено, что внутриклеточная тетанизация приводит к уширению ответов сенсорных нейронов за счет смещения переднего фронта ответа на зрительный стимул оптимальной ориентации и направления. Кроме того, внутриклеточная тетанизация приводила к увеличению индекса ориентационной селективности исследуемых нейронов.

Поскольку внутриклеточная регистрация нейронов достаточно инвазивна, во второй серии экспериментов мы использовали экстраклеточную регистрацию, совмещенную с оптогенетической стимуляцией исследуемых клеток. Для этого нейроны $\frac{2}{3}$ слоя первичной зрительной коры были трансдуцированы AAV2 вирусом, несущим быстрый канальный родопсин OChief. В этой серии экспериментов выполнялась селективная оптогенетическая тетанизация нейронов, аналогичная внутриклеточной тетанизации. Свет для оптогенетической тетанизации доставлялся с помощью оптического волокна, введенного непосредственно внутрь регистрирующего микроэлектрода. Данная оптическая схема позволила осуществлять селективную оптогенетическую тетанизацию

регистрируемых нейронов. В ходе этих экспериментов мы обнаружили, что оптогенетическая тетанизация приводит к уменьшению дирекциональной селективности нейронов и увеличению ширины ориентационной настройки.

Для разрешения полученного противоречия между сериями экспериментов с внутриклеточной и экстраклеточной регистрацией мы провели эксперименты на математической модели нейрона leaky integrate and fire (LIF). В результате исследования модели мы показали, что противоречие между двумя сериями *in vivo* экспериментов может объясняться влиянием внутриклеточной регистрации методом пэтч-кламп на баланс ионов внутри нейрона. Внутриклеточная регистрация приводила к увеличению концентрации ионов хлора внутри клетки и смещению потенциала реверсии для ГАМК токов. Таким образом, мы предполагаем, что тетанизация нейронов первичной зрительной коры в первую очередь приводит к уменьшению индекса дирекциональной селективности и увеличению ширины ориентационной настройки.

Ориентационные настройки и дирекциональная селективность являются важными характеристиками нейронов первичной зрительной коры, которые остаются стабильными с течением времени. Тем не менее, как было показано ранее, предыдущий сенсорный опыт в процессе обучения, может приводить к модификации параметров зрительных ответов в виде увеличения ориентационной и дирекциональной селективности, по механизму гомосинаптической пластичности. В ходе нашей работы мы обнаружили, что гетеросинаптическая пластичность в противоположность этому приводит к уменьшению ориентационной и дирекциональной селективности нейронов. Поскольку в реальности гомо- и гетеросинаптическая пластичности протекают одновременно, можно предположить, что гетеросинаптическая пластичность способствует стабилизации параметров зрительных ответов отдельных нейронов.

Данное исследование было поддержано Российским Научным Фондом (грант № #20-15-00398).

HIGH-FREQUENCY BURSTS OF ACTION POTENTIALS CAN CHANGE THE PROPERTIES OF VISUAL RESPONSES OF MOUSE CORTICAL NEURONS BY THE MECHANISM OF HETEROSYNAPTIC PLASTICITY

Smirnov I. V.¹, Osipova A. A.², Smirnova M. P.¹,
Borodinova A. A.¹, Malyshev A. Y.¹

¹ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia,

² Moscow State University M. V. Lomonosov, Moscow, Russia

Annotation. Heterosynaptic plasticity is an important mechanism ensuring the stability of neuronal networks. In this work, we have shown that high-frequency bursts of action potentials induced in mouse visual cortex neurons can lead to a decrease in their orientational and directive selectivity, which apparently develops through the mechanism of heterosynaptic plasticity.

Key words: Neuron, Heterosynaptic plasticity, Visual cortex, Optogenetics, patch-clamp

УДК 573

ДИСФУНКЦИИ НЕЙРОН-ГЛИАЛЬНЫХ СЕТЕЙ В РАННЕМ ПЕРИОДЕ У МЫШЕЙ С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА

DOI 10.24412/CL-37124-2023-113-116

Матвеева М. В.¹, Федулина А. А.¹, Мальцева К. Е.¹,
Лебедева А. В.¹

¹ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

m.matveeva288@gmail.com

Аннотация. появляются все больше доказательств того, что дисфункции глиальных клеток является основной причиной нейродегенеративных процессов и когнитивных нарушений, наблюдаемых при болезни Альцгеймера. Данное исследование направлено на изучение ранних дисфункций астроцитов в нейрон-глиальной сети у линии мышей с признаками болезни Альцгеймера. Результаты, полученные в данной работе, необходимы для более глубокого понимания роли астроцитов в регуляции патологии и рассмотрении их в качестве мишени для терапии, направленной на профилактику и лечение нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: нейрон-глиальные сети, болезнь Альцгеймера, электрофизиология, кальциевый имиджинг

Болезнь Альцгеймера (БА) — часто встречающееся нейродегенеративное заболевание пожилых людей, которое начинается задолго до появления клинических симптомов и характеризуется когнитивными нарушениями, изменениями поведения настроения. Несмотря на то, что было выдвинуто множество гипотез о причинах и механизмах развития БА, точные патофизиологические процессы, лежащие в основе ее развития, остаются неясными.

До недавнего времени нейронные сети находились в центре внимания исследований патологий, ассоциированного с БА. Возможный вклад астроцитов в развитие заболевания практически не учитывался. Однако астроциты являются неотъемлемой частью мозга, а реактивность астроцитов является ранним признаком начала заболевания и поэтому может быть перспективной мишенью для доклинической диагностики и лечения [1]. В животных моделях

БА астроциты подвергаются дегенерации и атрофии на ранних стадиях патологического процесса, что, возможно, изменяет гомеостатические функции мозга. Изменения способствуют ранним когнитивным нарушениям [2], а метаболические изменения в мозге, связанные с нарушением доставки глюкозы и других питательных веществ от астроцитов к нейронам, происходят на ранних стадиях патологического прогрессирования БА [3,4].

В связи с этим целью исследования является изучения функционирования нейрон-астроцитарной сети в гиппокампе мышей с моделью Альцгеймера в досимптоматическом периоде.

Все эксперименты проводились на переживающих срезах гиппокампа генно-модифицированной линии мышей 5xFAD, имеющей мутации генов, характерные для болезни Альцгеймера. Для проведения экспериментов были взяты половозрелые самцы возрастом 1—1,5 месяца. В работе использовались методы кальциевого имиджинга, электрофизиологии, а также было проведено поведенческое тестирование. Регистрация сигналов происходила в области CA1 гиппокампа.

В ходе работы была проведена оценка когнитивно-мнестических способностей, не выявившая различий в испытуемых группах. В то же время при исследовании функциональной кальциевой активности астроцитов было показано статистически значимое увеличение частоты в группе животных с генотипом болезни Альцгеймера относительно контрольной группы. Также было продемонстрировано количественное увеличение астроцитов (астроглиозис) в группе животных с генотипом болезни Альцгеймера относительно группы контроля, что говорит об изменениях в функционировании астроцитов. Это указывает на то, что астроциты претерпевают изменения в раннем прогрессировании БА, когда животные еще не проявляют когнитивных признаков заболевания. Кроме того, было выявлено снижение долговременной синаптической пластичности у мышей с моделью БА относительно контрольной группы. В ходе исследования долговременной синаптической пластичности были показаны статистически значимые различия между испытуемыми группами. Высокие показатели долговременной потенциации были обнаружены у контрольной группы животных: скорость нарастания возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП) составила 150—185 % от базовой линии значений до theta-burst stimulation (TBS), что говорит о хорошей синаптической проводимости и отсутствии

каких-либо патологических отклонений. Группа с моделью БА показала среднюю потенциацию на уровне 125 %, а после показатели начали резко снижаться.

В процессе синаптической передачи астроциты играют важную роль в механизме обратного захвата нейротрансмиттеров, который может быть нарушен у животных 5xFAD. Таким образом, данное исследование демонстрирует наличие аномалий астроцитов на ранних стадиях развития болезни Альцгеймера у генетически-модифицированных мышей, что важно для ранней диагностики болезни Альцгеймера и методов ее коррекции.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 075—15—2022—293 от 15.04.2022 г (проект о создании и развитии научного центра мирового уровня «Центр фотоники»).

Список литературы

1. González-Reyes R. E. et al. Involvement of astrocytes in Alzheimer's disease from a neuroinflammatory and oxidative stress perspective//Frontiers in molecular neuroscience.— 2017.— Т. 10.— С. 427.
2. Li K. et al. Reactive astrocytes in neurodegenerative diseases//Aging and disease.— 2019.— Т. 10.— №. 3.— С. 664.
3. Butterfield D. A., Halliwell B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease//Nature Reviews Neuroscience.— 2019.— Т. 20.— №. 3.— С. 148—160.
4. Palmqvist S. et al. Earliest accumulation of β -amyloid occurs within the default-mode network and concurrently affects brain connectivity//Nature communications.— 2017.— Т. 8.— №. 1.— С. 1—13.

EARLY ASTROCYTE DYSFUNCTION IN THE NEURON-GLIAL NETWORK IN MICE WITH A MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

Matveeva M. V., Fedulina A. A., Maltseva K. E. Lebedeva A. V.

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia
m.matveeva288@gmail.com

There is growing evidence that glial cell dysfunction is a major cause of the neurodegenerative processes and cognitive impairment seen in Alzheimer's disease. This study aims to investigate early astrocyte dysfunction in the neuron-glial network in a line of mice with Alzheimer's disease. The results obtained in this work are necessary to better understand the role of astrocytes in the regulation of pathology and to consider them as a target for therapies aimed at the prevention and treatment of neurodegenerative diseases.

УДК-573

ВЛИЯНИЕ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ АСТРОГЛИИ НА МОДУЛЯЦИЮ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ В ГИППОКАМПЕ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-117-119

Мальцева К. Е.¹, Джэппи Д. Д.², Соколов Р. А.^{1,3,4},
Круть В. Г.³, Федулина А. А.¹, Розов А. В.^{1,2}

¹ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия,

² ФГБУ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва, Россия,

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия,

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

e-mail: kmaltseva97@gmail.com

Аннотация. Исследование направлено на изучение роли астроцитов в синаптической передаче с использованием метода оптогенетической стимуляции. Актуальность данной работы обусловлена недостаточным пониманием роли астроцитов в регуляции нейрональной активности мозга.

Ключевые слова: оптогенетика, астроциты, синаптическая передача, гиппокамп.

Астроциты — это специализированные глиальные клетки, число которых превышает число нейронов более чем в пять раз [1]. Они являются наиболее распространенными глиальными клетками в центральной нервной системе, известными своей метаболической и защитной ролью. Несмотря на то, что астроциты часто окружают синапсы, их традиционно рассматривают как пассивных участников синаптической передачи. Однако значительный объем данных, полученных в последние годы, продемонстрировали существование двунаправленной связи между астроцитами и нейронами, что побудило пересмотреть роль астроцитов в физиологии нервной системы [2]. Множество исследований показывают, что астроциты участвуют в модуляции синаптической передачи, путем высвобождения глутрансмиттеров. Но точные механизмы, которые описывают эти взаимодействия, не были представлены.

Целью нашего исследования является изучение роли астроцитов в регуляции синаптической передачи с помощью оптогенетической активации астроглии. Все эксперименты проводились на переживающих срезах гиппокампа мышей линии C57BL/6 возрастом P30—60. Мышам в возрасте P0 вводили в желудочки вирус AAV GFAP ChR2 EYFP, который обеспечивал селективную экспрессию ChR2 в астроцитах. Одновременно регистрировалась спонтанная сетевая активность (sharp wave and ripples; SPW-R) методом регистрации изменения полевого потенциала и синаптические ГАМК-токи в пирамидных клетках поля CA1 методом пэчч-кламп.

Было показано, что активация астроцитов синим светом приводит к снижению амплитуды и частоты SPW-R и как следствие к подавлению ассоциированных с ритмом ГАМКергических ответов. Таким образом мы можем предположить, что астроциты высвобождают глиопередатчик, моделируя синаптическую передачу (рис. 1).

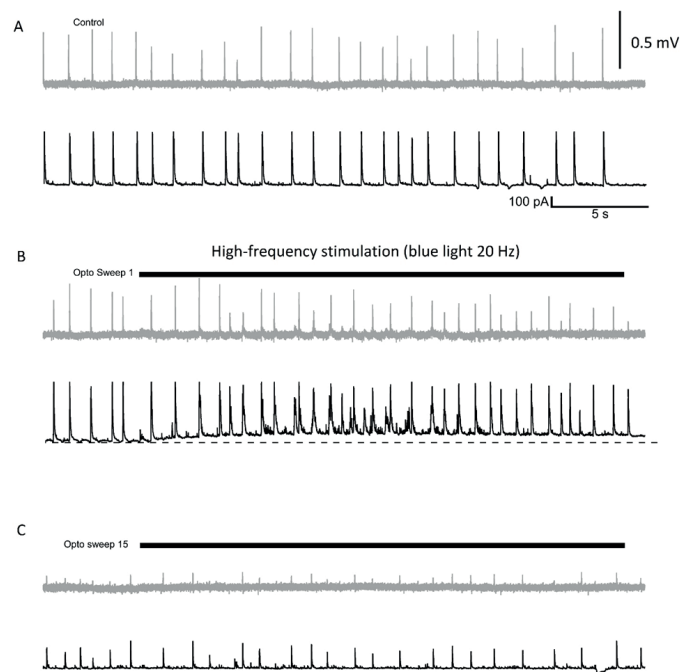


Рис. 1. Ответы ГАМК-токов (черные) и SPW-R (серые). (А) До оптогенетической стимуляции. (В) Во время стимуляции. (С) В конце стимуляции.

Исходя из полученных данных мы можем предложить несколько предварительных гипотез, касательно природы высвобождаемого глиотрансмиттера. Однако, для полного понимания механизма действия требуются проведение расширенного фармакологического анализа наблюдаемого феномена.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 075—15—2022—293 от 15.04.2022 г (проект о создании и развитии научного центра мирового уровня «Центр фотоники»).

Список литературы

1. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010 Jan;119 (1):7—35. doi: 10.1007/s00401—009—0619—8.
2. Newman EA. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 2003 Oct;26 (10):536—42. doi: 10.1016/S0166—2236 (03)00237—6.

THE EFFECT OF OPTOGENETIC ASTROGLIA ACTIVATION ON MODULATION OF SYNAPTIC TRANSMISSION IN THE HIPPOCAMPUS

Maltseva K. E. ¹, Jappy D. J. ², Sokolov R. A. ^{1,3,4}, Krut V. G. ³, Fedulina A. A. ¹, Rozov A. V. ^{1,2}

¹ National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia,

² FSBI «Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies» of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia,

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia,

⁴ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

Annotation. The study is aimed at studying the role of astrocytes in synaptic transmission using the method of optogenetic stimulation. The relevance of this work is due to insufficient understanding of the role of astrocytes in the regulation of neuronal activity of the brain.

Key words: optogenetics, astrocytes, synaptic transmission, hippocampus.

ЭКСПРЕССИЯ ЦИТОКИНОВ В ГИППОКАМПЕ И КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОГО СТАТУСА И РОЛЬ МОДУЛЯЦИИ ЭНДОКАННАБИНОИДНОЙ СИСТЕМЫ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-120-122

Карань А. А.¹, Сулейманова Е. М.¹, Борисова М. А.¹, Волобуева М. Н.¹, Большаков А. П.¹

¹ ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН
117485, Москва, ул. Бутлерова, д. 5 А
e-mail: akartar.n@gmail.com

Аннотация. Нейровоспаление — один из ключевых процессов в эпиптогенезе. Мы исследовали экспрессию цитокинов и влияние на нее модуляции эндоканнабиноидных рецепторов в различных областях мозга крыс после эпилептического статуса (ЭС). Результаты настоящего исследования показали, что ингибирование CB1R в ранние сроки после ЭС оказывало преходящее нейропротекторное действие.

Ключевые слова: Эпилепсия, нейровоспаление, пилокарпин, эндоканнабиноидная система

Согласно определению Международной Антиэпилептической Лиги (ILAE), эпилепсия — это «хроническое состояние мозга, которое характеризуется устойчивой предрасположенностью к возникновению эпилептических приступов и нейробиологическими, когнитивными, психологическими и социальными последствиями». Данное определение носит общий характер, но за ним скрывается множество состояний, и этиология, и симптоматика, и механизмы эпиптогенеза которых могут значительно отличаться, что затрудняет создание единой модели заболевания. Для преодоления данного препятствия в рамках моделирования осуществляется выбор конкретного типа эпилепсии и его проявления (-ий): электрофизиологического, морфологического (в основном нейродегенерации) и поведенческого [1]. В данной работе используется модель эпилептического статуса с внутрибрюшинным введением пилокарпина, где воспроизводятся аспекты электрофизиологической актив-

ности и нейродегенерации. Воспроизведение сразу двух аспектов сближает пилокарпиновую модель именно с заболеванием под названием “эпилепсия”.

Одним из нейробиологических процессов, связанных с хроническим состоянием мозга, характеризующимся устойчивой предрасположенностью к возникновению эпилептических приступов, в настоящее время считается нейровоспаление. Нейровоспаление — это реакция центральной нервной системы (ЦНС) на различные нарушения, такие как инсульт, травма, инфекция, аутоиммунные заболевания, стресс и повышенная возбудимость нейронной сети, например, во время эпилептических судорог. Такая реакция включает в себя биосинтез и высвобождение молекул с воспалительными свойствами клетками мозга, в основном активированной микроглией и астроцитами, а также нейронами и клетками сосудистой сети мозга [2].

В настоящее время в рамках исследования нейровоспаления, характерного для многих патологических состояний, рассматривается, в частности, влияние на него эндоканнабиноидной системы (ЭКС) [3], однако, в исследованиях, посвященных эпилепсии, основное внимание сосредоточено на том, как модуляция ЭКС влияет на сетевую нейрональную активность за счет изменения работы синапсов (возбуждающих и тормозных) через CB1 рецепторы, а связи с нейровоспалением посвящено лишь небольшое количество исследований [4].

В нашем исследовании мы анализировали динамику нейровоспаления после введения пилокарпина и влияния на эту динамику антагониста CB1 эндоканнабиноидных рецепторов. Нейровоспаление оценивали по уровням экспрессии провоспалительного цитокина *Il1b*, *Il6* и противовоспалительного цитокина *Cx3cl1* в дорсальном и вентральном гиппокампах, энторинальной, фронтальной и соматосенсорной корках. Экспрессию оценивали с помощью количественной ПЦР через 24 часа, 7 дней и 5 месяцев после инъекции конвульсанта. Мы результаты мы получили, что: 1) в неокортексе рос уровень мРНК *Il1b* и *Cnr1* и снижалась экспрессия *Cx3cl1*, в то время как в гиппокампе в исследуемые сроки после эпилептического статуса (ЭС) изменялась только экспрессия *Il1b*. Наиболее стойкое снижение экспрессии *Cx3cl1* обнаружено в энторинальной коре; 2) ингибирование CB1-рецепторов в ранние сроки после ЭС оказывало транзитный нейропротекторный эффект, не проявляющийся в хроническом периоде и не препятствующий развитию спонтанных

приступов после ЭС; (3) ингибирование рецепторов СВ1 предотвращало повышение экспрессии *IL6* в хроническом периоде после СЭ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект №. 20—015—00468.

Список литературы

1. Engel J. Jr, International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology//Epilepsia. 2001. Vol. 42, № 6. P. 796—803.
2. Vezzani A. et al. Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures//J. Neurosci. 1999. Vol. 19, № 12. P. 5054—5065.
3. Walter L., Stella N. Cannabinoids and neuroinflammation//Br. J. Pharmacol. 2004. Vol. 141, № 5. P. 775—785.
4. Cheung K. A. K. et al. The Interplay between the Endocannabinoid System, Epilepsy and Cannabinoids//Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20, № 23.

EXPRESSION OF CYTOKINES IN THE RAT HIPPOCAMPUS AND CORTEX IN THE LITHIUM-PILOCARPINE MODEL OF STATUS EPILEPTICUS AND THE ROLE OF MODULATION OF ENDOCANNABINOID SYSTEM

Karan A. A.¹, Suleymanova E. M.¹, Borisova M. A.¹, Volobueva M. N.¹, Bolshakov A. P.¹

¹ИИНА&NPh Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS 117485, Moscow, 5A Butlerova St.

Annotation. Neuroinflammation is one of the key processes in epileptogenesis. We investigated the expression of cytokines and the effect of modulation of endocannabinoid receptors on it in various regions of the brain of rats after status epilepticus (SE). The results of this study showed that CB1R inhibition early after SE had a transient neuroprotective effect.

Key words: Epilepsy, neuroinflammation, pilocarpine, endocannabinoid system

УДК-53.047

ЭЛЕКТРОСПИННИНГ С БИОКОМПОНЕНТАМИ КАК МЕТОД СОЗДАНИЯ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-123-125

Ковалева П. А.¹, Каршиева С. Ш.¹, Зеленова Э. Д.¹, Сенатов Ф. С.¹

¹ НИТУ МИСИС, Москва, Россия
e-mail: zhukova.pa@yandex.ru

Аннотация. (не более 300 знаков на русском языке): В данной работе на модели мышинных фибробластов NIH3T3 были исследованы возможность создания клеточно-инженерной конструкции методом Cell-electrospinning, оценена выживаемость клеток при различных параметрах процесса, а также исследованы выравнивание клеток и распластывание сфероидов вдоль направленной волокнистой структуры.

Ключевые слова: Биофабрикация, электроспиннинг, тканевая инженерия, нервная ткань

Клеточно-инженерные конструкции часто показывают свою эффективность при восстановлении функциональной нервной ткани. При создании такого конструкта важным фактором являются свойства и структура скаффолда и их соответствие восстанавливаемой ткани. Анизотропная структура, например, микроканалы или направленные волокна, способствуют росту, выравниванию и дифференцировке клеток и часто используется для регенерации, например, нервной или мышечной ткани [1, 2].

Метод электроспиннинга позволяет создавать микро- и нано-волокнистые структуры на основе биосовместимых полимеров, а также контролировать диаметр волокон и их направленность. Кроме того, такие волокна могут выступать не только подложкой для клеток, но и нести в себе активные вещества в виде лекарственных средств, биоактивных материалов или белков [3]. В данной работе предложено использовать метод электроспиннинга в сочетании с клеточным компонентом (Cell-electrospinning), то есть ин-

капсуляцию клеток в микро- и нановолокна. Такой метод биофабрикации позволяет создавать трехмерные структуры, где волокнистая структура подобна естественному внеклеточному матриксу, и может быть анизотропной, кроме того, высока доступность питательных веществ и взаимодействие между клетками и матрицей [4].

Так как одиночным клеткам требуется значительный период культивирования для достижения взаимодействия между отдельными клетками, предлагается использовать клеточные сфероиды в качестве биокомпонента. Сфероиды — трехмерные клеточные агрегаты, которые имитируют ткань, способны вырабатывать внеклеточный матрикс и повышать жизнеспособность клеток при внешних воздействиях [5]. Заклячая клеточные сфероиды в волокна направленной матрицы, можно добиться получения тканеподобной направленной структуры.

В данной работе на модели мышинных фибробластов NIH3T3 были исследованы возможность создания клеточно-инженерной конструкции методом Cell-electrospinning, оценена выживаемость клеток при различных параметрах процесса, а также исследованы выравнивание клеток и распластывание сфероидов вдоль направленной волокнистой структуры.

Использование метода электроспиннинга с клетками перспективно для создания клеточно-инженерных конструкторов нервных тканей, где для высокой функциональности необходимо обеспечивать направленное взаимодействие клеток, а также для создания многослойных конструкторов с разными типами клеток.

Работа проводится при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030».

Список литературы

1. Chai, Y., Zhao, H., Yang, S., Gao, X., Cao, Z., Lu, J., ... & Wang, X. (2022). Structural alignment guides oriented migration and differentiation of endogenous neural stem cells for neurogenesis in brain injury treatment. *Biomaterials*, 280, 121310.
2. Hu, T., Shi, M., Zhao, X., Liang, Y., Bi, L., Zhang, Z., ... & Guo, B. (2022). Biomimetic 3D aligned conductive tubular cryogel scaffolds with mechanical anisotropy for 3D cell alignment, differentiation and in vivo skeletal muscle regeneration. *Chemical Engineering Journal*, 428, 131017.

3. Mohammadalizadeh, Z., Bahremandi-Toloue, E., & Karbasi, S. (2022). Recent advances in modification strategies of pre-and post-electrospinning of nanofiber scaffolds in tissue engineering. *Reactive and Functional Polymers*, 172, 105202.
4. Yeo, M., Chae, S., & Kim, G. (2021). An in vitro model using spheroids-laden nanofibrous structures for attaining high degree of myoblast alignment and differentiation. *Theranostics*, 11 (7), 3331.
5. Gryadunova, A. A., Koudan, E. V., Rodionov, S. A., Pereira, F. D. A. S., Meteleva, N. Y., Kasyanov, V. A., ... & Bulanova, E. A. (2020). Cytoskeleton systems contribute differently to the functional intrinsic properties of chondrospheres. *Acta biomaterialia*, 118, 141—152.

CELL-ELECTROSPINNING AS A METHOD OF CREATING CELL-ENGINEERING STRUCTURES FOR DIRECTION RECOVERY OF NEURAL TISSUE

Kovaleva P. A.¹, Karshieva S.Sh.¹, Zelenova E. D.¹,
Senatov F. S.¹

¹ NUST MISIS, Moscow, Russia
e-mail: zhukova.pa@yandex.ru

Annotation. In this study, the possibility of creating a cell-engineering structure by Cell-electrospinning was investigated using a model of mouse NIH-3T3 fibroblasts. Cell viability was estimated at various process parameters. Cell alignment and spreading of tissue spheroids along a directed fibrous structure were investigated.

Key words: Biofabrication, electrospinning, tissue engineering, neural tissue

НЕЙРАЛЬНЫЕ СФЕРОИДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-126-128

Мишина Н. М.^{1,2}, Берестовой М. А.³, Усатова В. С.³,
Иваненко А. В.⁴, Джэппи Д.³, Круть В. Г.¹, Соколов Р. А.¹,
Розов А. В.³, Белоусов В. В.^{2,3}

¹ РНИМУ им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия;

² Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

³ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва, Россия;

⁴ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для
биомедицины РНИМУ им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия

e-mail: berestovoy@fccps.ru

Аннотация. Исследована динамика образования пероксида водорода при ишемии-реперфузии в нейральных сфероидах, стабильно экспрессирующих генетически кодируемый флуоресцентный сенсор Нурер7. В результате мы не обнаружили увеличения концентрации пероксида водорода ни в острой стадии ишемии, ни при реперфузии, а также через 24 часа после реперфузии.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека, генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры, CRISPR/Cas9, ишемия-реперфузия, нейральные сфероиды

Заболевания, характеризующиеся ишемически-реперфузионным повреждением (ИРП) тканей мозга, продолжают оставаться одной из наиболее частых причин смерти и инвалидизации по всему миру. Считается, что активные формы кислорода (АФК) играют решающую роль в патофизиологии ИРП [1, 2]. Однако до сих пор не выяснен точный момент генерации АФК — стадия гипоксии или реперфузии, при которой происходит быстрое восстановление количества кислорода. Кроме того, пока не до конца понятно, какой тип клеток ответственен за избыточную продукцию АФК. Такое непонимание молекулярных механизмов окислительного стресса в патофизиологии ИРП во многом связано с тем, что существующие в настоящее время подходы являются в основном косвенными. Для

детального изучения динамики продукции АФК в реальном времени при моделировании ИРП в живых клетках в настоящее время стали доступны генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры.

В данной работе для исследования молекулярных механизмов окислительного стресса в патофизиологии ИРП нами был использован генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор Нурер7 [3], позволяющий детектировать генерацию пероксида водорода, одной из самых реакционноспособных АФК. С помощью системы для геномного редактирования CRISPR-Cas9 мы ввели биосенсор Нурер7 в ИПСК здорового донора, которые затем дифференцировали в нейральные сфероиды (Нурер7-нейросфероиды). Далее, используя ранее описанный нами метод [4], мы моделировали ИРП и оценили степень окислительного стресса в режиме реального времени в полученных нейральных сфероидах. В эксперименте были использованы 2—6-недельные Нурер7-нейросфероиды. Используемая нами установка позволяет точно контролировать и быстро детектировать изменения уровня кислорода в среде в процессе флуоресцентной микроскопии живых сфероидов на всех этапах эксперимента. Генерацию пероксида водорода визуализировали на флуоресцентном конфокальном микроскопе в заданной 2D-плоскости конфокального изображения. Кроме того, непосредственно перед перфузией среды и сразу после нее были получены z-стеки Нурер7-нейросфероидов. Также были получены 3D изображения Нурер7-нейросфероидов через 24 часа после реперфузии и после добавления пероксида водорода.

В эксперименте мы не наблюдали изменения динамики образования пероксида водорода на этапах острой ишемии и реперфузии в Нурер7-нейросфероидах. Анализ 3D изображений Нурер7-нейросфероидов не выявил существенной разницы в уровнях окисления Нурер7 до и после эксперимента по моделированию ИРП, а также через 24 часа после реперфузии. Добавление пероксида водорода к Нурер7-нейросфероидам через 24 часа после реперфузии изменяло сигнал Нурер7, т.е. биосенсор находился в восстановленном состоянии до окисления пероксидом водорода. Таким образом в результате наших исследований мы не обнаружили всплеска образования пероксида водорода ни в острой стадии ишемии, ни при реперфузии, а также через 24 часа после реперфузии. Следовательно, полученные из ИПСК нейральные сфероиды, не имеющие в своем составе клеток микроглии и эндотелия, вероятно, не являются оптимальной моделью ИРП.

Список литературы

1. Qin, C. et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions//*Sig Transduct Target Ther.* –2022. –V. 7. — P. 215.
2. Abo M., Weerapana E. Chemical Probes for Redox Signaling and Oxidative Stress//*Antioxid. Redox Signal.* — 2019. — V. 30. — № 10. — P. 1369—1386.
3. Pak V. V. et al. Ultrasensitive genetically encoded indicator for hydrogen peroxide identifies roles for the oxidant in cell migration and mitochondrial function//*Cell metabolism.* — 2020. — V. 31. — № 3. — P.642—653
4. Kelmanson I. V. et al. In vivo dynamics of acidosis and oxidative stress in the acute phase of an ischemic stroke in a rodent model//*Redox Biology.* — 2021. — V. 48. –102178

ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY STUDIES ON NEURAL SPHEROIDS

Mishina N. M.^{1,2}, Berestovoy M. A.³, Usatova V. S.³,
Ivanenko A. V.⁴, Jappy D.³, Krut' V. G.¹, Sokolov R. A.¹,
Rozov A. V.³, Belousov V. V.^{2,3}

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia;

³ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia;

⁴ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

e-mail: berestovoy@fccps.ru

Annotation. We report of hydrogen peroxide dynamics in the acute phase of ischemia-reperfusion on the human induced pluripotent stem cells-derived neural spheroids, expressing a genetically encoded fluorescent sensor HyPer7. We did not detect the hydrogen peroxide production burst either during the acute phase of ischemia or reperfusion and 24 hours after reperfusion.

Key words: human induced pluripotent stem cells, genetically encoded fluorescent biosensors, CRISPR/Cas9, ischemia-reperfusion, neural spheroids.

УДК-615.462—036.5

РАЗРАБОТКА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ СПИННОГО МОЗГА

DOI 10.24412/CL-37124-2023-129-133

Зеленова Э. Д.¹, Каршиева С. Ш.¹, Ковалева П. А.¹,
Фурса Г. А.², Сенатов Ф. С.¹

¹ Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС»,
Москва, Россия,

² Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии
имени В.П. Сербского, Москва, Россия

e-mail: ezelenova@misis.ru

Аннотация. Для восстановления нервных волокон были получены биодеградируемые полимерные каркасы, состоящие из решётчатой структуры и электроспиннингованной подложки. Подобраны режимы и условия работы с данными материалами при электроспиннинге, условия шивки в растворе диальдегида. Проведена оценка цитотоксичности и клеточной адгезии.

Ключевые слова: Электроспиннинг, скаффолд, биодеградируемые водорастворимые полимеры, травма спинного мозга

Травма спинного мозга — это нейродегенеративное повреждение, сложно поддающегося терапии. Когда происходит частичное травмирование спинного мозга передача нервного сигнала останавливается в месте травмы. В настоящий момент наиболее распространенными методами лечения выступают медикаментозные способы терапии, лишь ограничивающие распространение повреждений и снимающие воспаление и болевые эффекты. Клеточная терапия (инъекционная) является перспективным, но недостаточным подходом к регенерации нервной ткани спинного мозга, в частности, из-за ингибирующей среды в месте травмы.

Разработка нейрорегенеративного имплантата позволит восстановить двигательные и чувствительные функции организма. Для восстановления нервных волокон необходимо создать условия, которые будут обеспечивать подходящую топологию, физико-химические, биологические и механические характеристики. В то же время материал должен отвечать требованиям по длительности

деградации и цитосовместимости [1]. Для создания биомиметической структуры, в которой бы клетки пролиферировали направленно, формируя нервные волокна, необходимо учитывать размер пор и степень пористости подложки, оптимальной для роста аксонов, а также общую ориентировку волокон [2,3].

Белое вещество в естественных тканях спинного мозга в основном состоит из направленных волокноподобных аксонных трактов. В качестве эталона установлено, что диаметры аксонов находятся в диапазоне 500—3000 нм для спинного мозга свиньи и 300—20000 нм для спинного мозга человека. По различным литературным источникам, размер пор должен превышать 10 мкм и достигать до 100—300 мкм при пористости 90—95 % [4].

Метод электроспиннинга позволяет формировать субмикронные и нано- волокна, а также создавать необходимую ориентацию, размер пор и пористость получаемых структур, что необходимо для пролиферации клеток [6,7]. Такие скаффолды не только ускорят регенерацию аксонов за счёт своих физико-химических и топологических характеристик, но и могут являться носителями для лекарств, факторов роста и других биологически-активных веществ и компонентов, подавляющих ингибирующую среду во время острой фазы травмы. При помощи данного метода получен слой, служащий скаффолдом для формирования нервных тканей.

В качестве оптимальной полимерной основы был выбран поливиниловый спирт. Данный биорезорбируемый водорастворимый синтетический полимер отвечает требованиям биосовместимости и подходит для формирования волокон методом электроспиннинга. Подобраны режимы и концентрации получения анизотропной бездефектной структуры с заданными параметрами из поливинилового спирта (85—124 кДа, 12 %_{масс} в H₂O_{дист}). Напряжение составляет 13,5 кВ при расстоянии между иглой и дисковым коллектором 5—8 см и скорости вращения коллектора 600 об/мин.

Для получения механически стабильной оболочки, замещающей твёрдый плотный соединительнотканый слой спинного мозга был применен метод 3D-печати. В качестве материала был выбран поливиниловый спирт. Подобраны режимы и условия печати, для получения конструкций с размером пор до 100 мкм. Размеры конструкции были подобраны в соответствие с размерами спинальной травмы крысы: 2,5×6 мм. После печати сетки крепились на коллектор в установке электроспиннинга, где происходило нанесение волокон из растворённого поливинилового спирта.

Были найдены пропорции и составляющие сшивающего раствора и условия проведения реакции. Полученные конструкции были помещены в раствор глутарового альдегида, соляной кислоты и ацетона. Образцы находились в среде смеси в течение 1 ч, 2 ч и 3 ч. После сшивки материала конструкции были отмыты в трис-HCl буферном растворе для избавления остатков диальдегида, а также для доведения pH=7,5.

Для оценки цитотоксичности и клеточной адгезии были выбраны фибробласты, глиальные и эндотелиальные клетки. Для оценки общей цитотоксичности и адгезии были выбраны фибробласты. Для заселения на электроспиннингованную составляющую выбраны глиальные клетки, в напечатанную сетку — эндотелиальные клетки, для дальнейшего формирования сосудов в соединительнотканной оболочке. На основе проведенных результатов сканирующей электронной микроскопии, скорости деградации и *in vitro* испытаний были выбраны подходящие режимы получения конструкций. После 24 часов эксперимента процент выживаемости клеток составил 75 % для 2 часов и 81 % для 3 часов нахождения в сшивающем растворе с содержанием 2,5 %_{об} глутарового альдегида при pH=2—3. Заметно, что спустя 24 часа после начала эксперимента, цитотоксичность образцов выше, чем после 72 часов, однако является допустимой. Это обуславливается выходом сшивающей смеси из субмикропористого образца. После 72 часов эксперимента процент выживаемости клеток составил 104 % и 105 %, для 2 часов и 3 часов нахождения в сшивающем растворе, соответственно.

Методом сканирующей электронной микроскопии изменения в морфологии после процесса сшивки не были найдены. Также результаты ИК-спектроскопии показали наличие связей между поливиниловым спиртом и глутаровым альдегидом, что отображает прошедшую реакцию сшивки полимера. Оптимальная скорость деградации, необходимые механические характеристики при сохранении высокой выживаемости и адгезии клеток вдоль волокон демонстрируют высокую перспективность использования разработанных конструкций в качестве имплантатов для лечения спинальных травм.

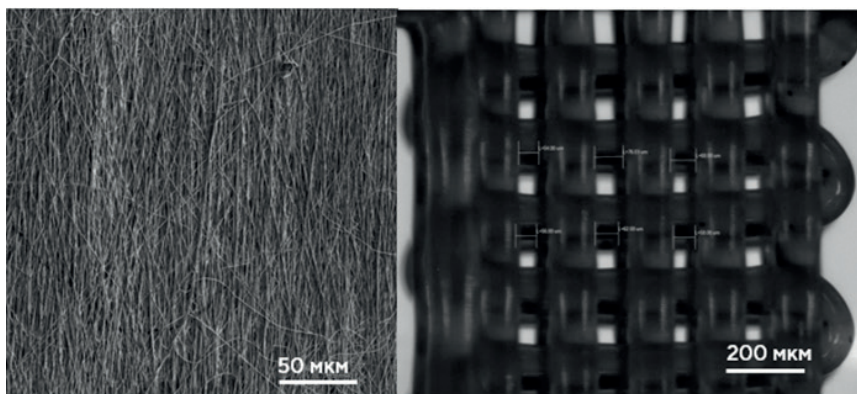


Рисунок 1 — Микрофотографии полученной структуры

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» (Университет МИСИС, Стратегический проект «Биомедицинские материалы и Биоинженерия»).

Список литературы

1. Singh, A., Shiekh, P. A., Das, M., Seppälä, J. V., & Kumar, A. (2018). Aligned Chitosan-Gelatin Cryogel Filled Polyurethane Nerve Guidance Channel for Neural Tissue Engineering: Fabrication, Characterization and In-Vitro Evaluation. *Biomacromolecules*. doi:10.1021/acs.biomac.8b01308
2. Sousa, Joanna P. M. & Stratakis, Emmanuel & Manu, Joao & Marques, Paula. (2023). Anisotropic 3D scaffolds for spinal cord guided repair: Current concepts. *Biomaterials Advances*. 148. 213353. doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213353
3. Puhl, D. L., Funnell, J. L., Nelson, D. W., Gottipati, M. K., & Gilbert, R. J. (2020). Electrospun Fiber Scaffolds for Engineering Glial Cell Behavior to Promote Neural Regeneration. *Bioengineering*, 8 (1), 4. doi:10.3390/bioengineering8010004
4. Xue, W., Shi, W., Kong, Y., Kuss, M., & Duan, B. (2021). Anisotropic scaffolds for peripheral nerve and spinal cord regeneration. *Bioactive Materials*, 6 (11), 4141—4160. doi:10.1016/j.bioactmat.2021.04.019 doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.019

5. A. Kourgiantaki, D.S. Tzeranis, K. Karali, Neural stem cell delivery via porous collagen scaffolds promotes neuronal differentiation and locomotion recovery in spinal cord injury *NPJ Regen. Med.*, 5 (2020), pp. 12—26
6. B. Niemczyk, P. Sajkiewicz, D. Kolbuk Injectable hydrogels as novel materials for central nervous system regeneration *J. Neural Eng.*, 15 (5) (2018), p. 051002

DE NOVO МУТАЦИЯ SEMA4D ВЫЗЫВАЕТ ТОНИКО-КЛОНИЧЕСКУЮ ЭПИЛЕПСИЮ У ЧЕЛОВЕКА

DOI 10.24412/CL-37124-2023-134-139

Кондакова Е. В.¹, Тарабыкин В. С.^{1,2}, Newman A. G.²

¹ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия, ² Институт клеточной биологии и нейробиологии клиники Шарите, Берлин, Германия
e-mail: elen_kondakova@list.ru

Аннотация. Мы обнаружили новую *de novo* мутацию *Sema4D-Q497P* у пациента с тонико-клоническими припадками. При сверхэкспрессии в развивающемся мозге мыши hSema4D-497P мутантного белка происходит ингибирование миграции нейронов и проекции аксонов нейронов коры головного мозга.

Ключевые слова: эпилепсия, семафорины, Sema4D, гликозилирование

Семейство семафориновых молекул участвует в контроле развития нервной системы, а также в функционировании иммунных клеток [1]. Белки Семафорины у мыши делятся на восемь классов, состоящих из секретлируемых и мембраносвязанных белков [2].

Мы идентифицировали пациента с генерализованными тонико-клоническими судорогами, в геноме которого присутствует мутация *de novo* в гене Семафорин-4D (*Sema4D*). Секвенирование экзона выявило несинонимичную мутацию в гене *Sema4D* аденозина в цитозин, приводящую к замене в белке глутамина (Q) на пролин (P) в кодоне 497. Учитывая, что остаток Q497 участвует в формировании бета-листа в домене Sema, ожидается, что включение пролинового кольца изменит вторичную структуру.

Чтобы предсказать, как эта мутация может влиять на фолдинг белка, мы использовали последний выпуск программы *alphafold2* для сравнения предсказанной структуры с известной кристаллической структурой hSema4D (PDB: 1OLZ). Предсказанная структура hSema4D и hSema4D-497P дикого типа чрезвычайно близка к кристаллической структуре 1OLZ. В обоих предсказаниях

WT и 497P верхние сегменты домена Sema не могут быть предсказаны с достаточной степенью достоверности правильно и образуют петли с низкой достоверностью, которые говорят о текущем ограничении *alphafold2* и не могут быть интерпретированы. Однако бета-лист, содержащий кодон 497, согласуется между 1OLZ и прогнозом для hSema4D, поэтому оказалось возможным сравнить структуру мутации 497 со структурой дикого типа на этом уровне. В то время как бета-лист, содержащий P497, согласно теоретическим предсказаниям, формируется правильно, бета-лист под ним не должен образовываться, что является особенностью структуры белка, которая находится в непосредственной близости от сайта гликозилирования N77. Учитывая его расположение, также возможно, что стерические затруднения из-за мутации P497 влияют на нормальное гликозилирование в N49 и N419 или убиквитинирование в K505 или K81.

Мы решили проверить, может ли этот мутант Sema4D все еще образовывать гомо- и гетеродимеры с другим белком семейства Sema — Sema7a после иммунопреципитации белков, сверхэкспрессированных в клетках HEK293T. Интересно, что, хотя мутация Q497P не мешала гомодимеризации Sema4D или гетеродимеризации с Sema7A, мы наблюдали изменение миграции полос Sema4D в геле SDS-PAGE. В то время как Sema4D дикого типа обычно мигрирует в двух размерах (~ 150 кДа и ~ 120 кДа), мы наблюдали, что с Sema4D-497P более тяжелая форма белка (~ 150 кДа) практически отсутствует.

В соответствии с нашими структурными предсказаниями мы предположили, что две формы Sema4D могут соответствовать разным состояниям созревания или состояниям гликозилирования белка. После инкубации лизатов с ферментами дегликозилирования мы наблюдали, что форма hSema4D массой 150 кДа содержит O-связанное гликозилирование. В то время как hSema4D-497P продолжает оставаться гликозилированной, обработка Endo H, который не может расщеплять сложные гликаны, приводит к размеру, не наблюдаемому на hSema4D-497P. Однако обработка PNGase F, которая должна расщеплять все сайты гликозилирования, по-прежнему приводит к появлению двух заметных полос WT, уменьшенных до ~ 120 кДа и ~ 110 кДа, что позволяет предположить, что разница в размерах обусловлена не гликозилированием, а чем-то другим.

Учитывая, что присутствие рецептора Sema7A на плазматической мембране необходимо для его биологической функции, мы

использовали поверхностное биотинилирование с последующим осаждением антителами с авидином, чтобы выяснить роль Sema7A и мутации Q497P в регуляции субклеточной локализации семафорина 4D. Интересно, что биотинилированной оказалась только 150 кДа форма Sema4D, что указывает на то, что это мембранно локализованная форма белка. Было показано, что коэкспрессия Sema7A увеличивает долю Sema4D, локализованного на поверхности, в три раза, в то время как мутация Sema4D по остатку 497 устраняет его локализацию на клеточной поверхности.

Чтобы дополнительно охарактеризовать этот эффект, мы нуклеофицировали первичные нейроны с помощью HA-mSema7A и sp-мус hSema4D или sp-мус-hSema4D-Q497P и провели анализ колокализации с помощью PLA (proximity ligation assay), чтобы наблюдать расположение семафоринового комплекса *in situ*. Мы увидели, что в то время как комплексы hSema4D-mSema7A в норме находятся вблизи клеточной мембраны и в конусе роста аксона, комплексы hSema4D-497P-Sema7A обнаруживаются преимущественно в соме и отсутствуют в конусе роста. При сверхэкспрессии доминантной мутации hSema4D-497P в развивающемся неокортексе методом внутриутробной электропорации, мы наблюдали ингибирующий эффект на миграцию нейронов и навигацию аксонов по сравнению с экспрессией нормального hSema4D. Учитывая, что hSema4D-497P по-прежнему гомо- и гетеродимеризуется, но не локализуется на мембране, можно предположить, что мутация hSema4D-497P блокирует клеточные функции как Sema4D, так и Sema7A.

Наши результаты демонстрируют важную роль посттрансляционных модификаций Sema4D в инициации миграции нейронов и спецификации аксонов. Это способствует нашему пониманию сложной этиологии патологий развития нервной системы.

Работа проведена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект №FSWR-2023—0029).

Список литературы

1. Yazdani, U., and Terman, J. R. (2006). The semaphorins. *Genome biology* 7, 211.
2. Pasterkamp, R. J., and Giger, R. J. (2009). Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Current Opinion in Neurobiology* 19, 263—274. 10.1016/j.conb.2009.06.001.

DE NOVO MUTATION OF SEMA4D CAUSES TONIC—CLONIC SEIZURES IN A HUMAN PATIENT

Kondakova E. V.¹, Tarabykin V. S.^{1,2}, Newman A. G.²

¹ National Research Nizhny Novgorod State University N. I. Lobachevsky, Nizhny Novgorod, Russia, ² Institute of Cell Biology and Neurobiology, Berlin, Germany
e-mail: elen_kondakova@list.ru

Annotation. We discovered a *de novo* mutation of human *Sema4D* in a patient with epilepsy. When overexpressed in the developing mouse brain, hSema4D-497P inhibits migration and axon projections of cortical neurons.

Key words: epilepsy, Semaphorins, Sema4D, glycosylation

The Semaphorin family of axon guidance molecules are implicated in the development of the nervous system as well as in immune cell function [1]. Murine Semaphorins are divided into eight classes consisting of secreted and membrane-bound proteins [2].

We identified a patient presenting with generalized tonic-clonic seizures that has a *de novo* mutation in *Sema4D*. Exome sequencing revealed a nonsynonymous mutation of adenosine to cytosine resulting in a glutamine (Q) to proline (P) substitution at codon 497. Given that the Q497 residue is involved in the formation of a beta sheet on a propeller of the Sema domain, the sudden inclusion of a proline ring is expected to alter secondary structure.

To predict how this mutation may affect protein folding, we used the most recent release of alphafold2 to compare predicted structure with the known crystal structure of hSema4D (PDB: 1OLZ). The predicted structure of wildtype hSema4D and hSema4D-497P are extremely close to the 1OLZ crystal structure. In both WT and 497P predictions, upper segments of the Sema domain are not predicted correctly and form low confidence loops which speak to a current limitation of alphafold2 and should not be interpreted. However, the beta sheet that contains codon 497 is consistent between 1OLZ and the prediction for hSema4D, so it is useful to compare the 497 mutation structure to wildtype at this level. While the beta sheet containing P497 is predicted to form correctly, the beta sheet below it is not predicted to form, a feature that resides in close proximity to glycosylation site N77. Given its location, it is also possible that steric hindrance from the P497 mutation affects normal glycosylation at N49 and N419 or ubiquitination at K505 or K81.

We asked if this mutant of Sema4D can still form homo and heterodimers with another Sema protein, Sema7a, after immunoprecipitation of proteins overexpressed in HEK293T cells. Interestingly, while the Q497P mutation did not interfere with Sema4D homodimerization or heterodimerization with Sema7A, we observed a change in the migration of the Sema4D bands in an SDS-PAGE gel. While wildtype Sema4D normally migrates as two sizes (~150kDa and ~120kDa), we observed that with Sema4D-497P, the heavier form of the protein (~150kDa) was largely absent.

In line with our structural predictions, we surmised that the two forms of Sema4D could correspond to different maturation states or glycosylation states of the protein. After incubating lysates with deglycosylation enzymes, we could observe that the 150kDa form of hSema4D contains O-linked glycosylation. While hSema4D-497P continues to be glycosylated, treatment with Endo H, which cannot cleave complex glycans, results in a size not observed on hSema4D-497P. However, treatment with PNGase F, which should cleave all glycosylation, still results in two prominent WT bands, reduced to ~120kDa and ~110kDa, suggesting that something other than glycosylation contributes to the difference in size.

Given that presence of the Sema7A receptor at the plasma membrane is essential for its biological function, we used surface biotinylation followed by avidin pull down to address the role of Sema7A and of the Q497P mutation in regulating the subcellular localization of Semaphorin 4D. Interestingly, only the 150kDa form of Sema4D became biotinylated, indicating that this is the membrane localized form of the protein. We observed that co-expression of Sema7A increased the proportion of surface-localized Sema4D three-fold, while mutation of *Sema4D* at residue 497 abolished its localization to the cell surface.

To further characterize this effect, we nucleofected primary neurons with HA-mSema7A and sp-myc-hSema4D or sp-myc-hSema4D-Q497P and performed a proximity ligation assay to observe the location of the semaphorin complex *in situ*. We could observe that while hSema4D-mSema7A complexes are normally found near the cell membrane and in the growth cone, hSema4D-497P-Sema7A complexes are found predominantly in the soma and absent from the growth cone. When this dominant hSema4D-497P mutation is overexpressed in the developing neocortex by *in utero* electroporation, we can observe an inhibitory effect on neuronal migration and axon projection compared to expression of normal hSema4D. Given hSema4D-497P still homo and heterodimerizes

but is not localized to the membrane, it is likely hSema4D-497P strongly inhibits cell autonomous functions of both Sema4D and Sema7A.

Overall, our results show a crucial role of the Sema4D posttranslational modifications in initiating neuronal migration and axon specification. This further contributes to our understanding of the complex etiology of neurodevelopmental pathologies.

Scientific research carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project №FSWR-2023—0029).

Reference list

1. Yazdani, U., and Terman, J. R. (2006). The semaphorins. *Genome biology* 7, 211.
2. Pasterkamp, R. J., and Giger, R. J. (2009). Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Current Opinion in Neurobiology* 19, 263—274. 10.1016/j.conb.2009.06.001.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ENU-МУТАНТНЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ, ПРОЯВЛЯЮЩИХ ЭПИЛЕПТИФОРМНУЮ АКТИВНОСТЬ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-140-147

Рыбакова В. П.¹, Митина Н. Н.¹, Бабаев А. А.¹,
Тарабыкин В. С.².

¹ Нижегородский нейронаучный центр, лаборатория генетики развития мозга, Нижний Новгород, Россия,² Институт клеточной биологии и нейробиологии клиники Шарите, Берлин, Германия
e-mail: verunya.rubackova@mail.ru

Аннотация. Для исследования механизмов эпилептогенеза актуальным является выявление и описание мутаций, вызывающих данную патологию. В данном исследовании была проведена фенотипическая характеристика мутантной линии мышей S5—1, для которой характерен мутантный эпилептический фенотип, проявляющийся в аудиогенных судорогах.

Ключевые слова: ENU-мутагенез, аудиогенная эпилепсия, фенотипический скрининг.

Эпилепсия — это гетерогенное состояние, имеющее хроническое, прогредиентное течение и, как правило, высокий уровень инвалидизации. В России эпилепсия встречается с частотой от 1,1 до 8,9 случая на 1000 человек. Известно, что риск возникновения зависит от возраста: наиболее часто болеют дети до 15 лет и лица старше 65 лет [1].

Современное представление о механизмах возникновения и течения эпилепсии нельзя назвать целостным. Морфологические и биохимические нарушения при эпилепсии, ведущие к возникновению взрывчатой, синхронизированной активности нейронов, являются предметом изучения в течение многих десятилетий [2].

Одним из важных патогенетических факторов, обуславливающих развитие эпилепсии, является генетическая предрасположенность. В настоящее время известно несколько генов, ответственных за развитие эпилепсии, например: ген SESN3 — выступает в каче-

стве основного регулятора эпилептической генной сети, играет в ней координирующую роль; гены CENTB5 человека и мыши находятся в одной группе с генами SCNN1D и ACOT7, и нарушения в них связаны с нейродегенеративными процессами и эпилепсией. Все перечисленные гены экспрессируются во всех проанализированных тканях человека и мыши, что указывает на их физиологическую важность [3].

Несмотря на имеющиеся сведения о некоторых генах, роль генетических факторов в провокации эпилептогенеза остается мало изученной. Одним из методов, позволяющих в эксперименте выявлять роль генов в развитии организма и его функционирования, является химический мутагенез, вызываемый N-этил-N-нитрозомочевинной (N-ethyl-N-nitrosourea — ENU).

Цель работы — идентифицировать и охарактеризовать новые мутантные линии мышей, проявляющих признаки эпилепсии с последующим анализом влияния генотипа на патологические изменения структуры мозга и поведения у лабораторных экспериментальных животных.

Один из подходов к изучению роли отдельных генов основан на химическом мутагенезе, вызываемом N-этил-N-нитрозомочевинной (N-ethyl-N-nitrosourea — ENU). ENU входит в класс алкилирующих агентов и не требует метаболической активации. Он внедряет этильную группу в гуанин, при этом образуется Об-этилгуанин, который комплементарен к аденину, а не к цитозину. В результате происходит точечная замена, в том числе и в ДНК сперматозоидов [4].

Для проведения исследования были сгенерированы мышинные мутанты путем химического мутагенеза N-этил-N-нитрозомочевинной (ENU). Было произведено 3 серии ENU-инъекции 95 самцов мышей линии СЗ Н с дозой 90 мг/кг.

В нашей работе мы придерживались следующей схемы скрещивания: подвергнутых ENU-мутагенезу самцов линии СЗН/HeN (поколение G0) скрещивали с интактными самками той же линии и получали первую генерацию (G1) потомков. От каждого восстановившего фертильность самца брали 4 сына (G1) для последующих скрещиваний с мышами линии С57Bl/6 для поиска мутаций, приводящих к развитию признаков эпилепсии. Самок (G2), полученных в результате этих скрещиваний, гибридизировали с их же отцами (G1) и получали потомство (G3) [5].

Выявление и отбор мышинных мутантов с повышенной склонностью к эпилептическим припадкам осуществлялись на двадца-

тый день после рождения (P20) с применением методики Крушинского, учитывающей степень проявления аудиогенных судорог.

Аудиогенные судороги (АС), развивающиеся рефлекторно у грызунов в ответ на звуковую стимуляцию, являются одной из наиболее популярных и адекватных экспериментальных моделей генерализованной конвульсивной эпилепсии (*grand mal*) человека [6].

К настоящему времени проведен скрининг 39 линий мышей из 2 групп инъекционного введения и выявлены 12 линий, в той или иной степени проявившие признаки эпилептической активности. Для создания мутантных линий были выбраны те группы животных, где проявление признака среди потомства (G3) было наиболее частым по сравнению с остальными группами. Создание линий с рецессивной мутацией проводилось с отбором животных, показывающих абберрантный фенотип во второй раз. Наследование абберрантного фенотипа подтверждалось в G5-поколении мышей.

Дополнительные методы скрининга включали применение химической пилокарпиновой модели. Одним из провоцирующих приступов стимулов у животных являются инъекции фармакологических препаратов (агонистов, антагонистов, модуляторов), повышающие возбудимость или снижающие торможение нейрональной сети [7].

Для дальнейшего исследования мы использовали одну из наиболее популярных в настоящее время моделей эпилепсии *in vivo* — парентеральное введение пилокарпина (*pilocarpine*, Tocris) с дозой 200 мг/кг. Данное вещество является агонистом мускариновых рецепторов и вызывает пароксизмальную активность нейронов, в большинстве случаев приводящую к развитию тоническо-клонических судорог у экспериментальных животных. Чтобы предотвратить чрезмерную активацию периферических мускариновых рецепторов, за полчаса до парентерального введения хемоконвульсанта вводили антагонист мускариновых рецепторов метилскополамин (*methylscopolamine*, Sigma Aldrich) подкожно в дозе 1 мг/кг. Было произведено инъекционное введение пилокарпином особей с мутантным фенотипом и животных из контрольной группы гибридов. Оценивалась скорость и длительность наступления судорожного приступа у мутантных и контрольных особей. Отличий выявлено не было.

Для характеристики эпилептических линий использовали базовое поведенческое фенотипирование, которое предусматривает проведение тестирований на память, способность к обучению, моторно-двигательные реакции и оценку эмоционального статуса. Комплекс поведенческих исследований у имеющихся линий выявил

более интенсивный показатель акустической реакции вздрагивания по сравнению с контрольной гибридной группой животных. Также в условиях методики открытого поля по показателям среднего пройденного расстояния двигательная активность мышей этих линий была выше, чем у контроля, но при этом уровень тревожности был понижен и определялся меньшим количеством вертикальных стоек. При оценке когнитивных функций с применением теста УРПИ мутантные особи показали высокую способность к обучению.

Также были проведены *in vitro* эксперименты для оценки спонтанной кальциевой активности с использованием первичных нейрональных культур коры головного мозга, полученных от мышей линии S5—1 на 1 день постнатального развития. В данном эксперименте был использован индикатор Ca^{2+} Oregon Green 488 BAPTA-1 AM [8]. В ходе *in vitro* экспериментов было выявлено повышение частоты спонтанных кальциевых событий в первичных культурах клеток коры головного мозга у некоторых исследуемых линий мышей.

Таким образом, быстро расширяющаяся сфера генетических данных существенно способствует нашему пониманию эпилептических нарушений, но отношение между генетическими отклонениями и фенотипическими проявлениями остается сложным и не до конца понятным. Выявление и характеристика новых мутантных мышей с последующей идентификацией и характеристикой генов, отвечающих за мутации, позволит значительно улучшить наше понимание генетической регуляции развития и последующих нарушений в работе коры головного мозга.

Научное исследование проведено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект №FSWR-2023—0029).

Список литературы

1. Авакян Г. Н. Современные аспекты лечения эпилепсии // Нервные болезни. 2005. Т. 2. С. 4—8.
2. Харибегашвили А. С., Евтушенко С. К., Иванова М. Ф. // Международный неврологический журнал. 2017. № 2. С. 11—13.
3. Hedrich U., Maljevic S. Pathophysiologische Mechanismen genetischer Epilepsien // Zeitschrift Epileptologie. 2016. V.17, № 4. P.32—34.
4. Мошкин М. П. Генотипы млекопитающих для биомедицинских исследований // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18, № 1. С. 41—42.

5. Borisova E. V., Epifanova E. A., Tutukova S. A., et al. Identification of novel mutations controlling cerebral cortex malformations caused by ENU-induced mutagenesis in the mouse//Sovremennye tehnologii v medicine. 2018. V.10. № 3. P.70—77.
6. Крушинский Л. В. Новое в изучении экспериментальной эпилепсии и физиологических механизмов, лежащих в ее основе//Успехи современной Биологии. 1949. № 28. С. 108—133.
7. Loscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs//Elsevier. 2011. № 20. P.359—368.
8. Митрошина Е. В., Ведунова М. В., Калинин Я. И. Кальциевый имиджинг в клеточных культурах и тканях: Учебно-методическое пособие. — Нижний Новгород: ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2011. — 28 с.

PHENOTYPICAL CHARACTERISTICS OF THE MUTANT MICE STRAIN S5—1 PRONE TO EPILEPTIFORM ACTIVITY

Rybakova V. P.¹, Mitina N. N.¹, Babaev A. A.¹, Tarabykin V.S.²

¹ Nizhny Novgorod Neuroscience Center, Laboratory of Genetics of Brain Development, Nizhny Novgorod, Russia, ² Institute of Cell Biology and Neurobiology, Berlin, Germany
e-mail: verunya.rubackova@mail.ru

Abstract: To study the mechanisms of epileptogenesis, it is important to identify and describe the mutations controlling this pathology. In this study, the phenotypic characterization of the mutant mice strain S5—1 was carried out.

Key words: ENU-mutagenesis, audiogenic epilepsy, phenotype screening.

Epilepsy is a heterogeneous condition with a chronic, progressive course and, as a rule, a high level of disability. In Russia, epilepsy occurs with a frequency of 1.1—8.9 incidences per 1000 people. It is known that the risk of occurrence depends on the patient's age: children under 15 y. o. and people over 65 are more likely to have the diagnosis. [1].

The modern understanding of the onset mechanisms and pathogenesis of epilepsy still is not holistic. Morphological and biochemical defects in epilepsy leading to the explosive, synchronized activity of neurons have been the subject of study for many decades [2].

One of the possible pathogenetic factors leading to epileptogenesis is a genetic disposition. Currently, several genes are known that are responsible

for the development of epilepsy, for example, the SESN3 gene, the main regulator of the epileptic gene network, plays a coordinating role in it; human and mouse CENTB5 genes are in the same group as the SCNN1D and ACOT7 genes, and their mutations are associated with neurodegeneration and epilepsy. All of these genes are expressed in all analyzed human tissues and muscles, which shows their physiological significance [3].

Despite the available information about some genes, the role of genetic factors in epileptogenesis remains poorly understood. One of the methods that make it possible to experimentally reveal the role of genes in the development of an organism and its functioning is chemical mutagenesis caused by N-ethyl-N-nitrosourea (ENU).

The study aims to identify and characterize new mutant mice strains showing signs of epilepsy with subsequent analysis of the effect of the genotype on pathological changes in the structure of the brain and behavior in laboratory experimental animals.

One of the approaches to study the role of individual genes is based on chemical mutagenesis caused by N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). ENU belongs to the class of alkylating agents and does not require metabolic activation. It introduces an ethyl group into guanine and forms O6-ethylguanine, which is complementary to adenine, and not to cytosine. As a result, a point replacement occurs in the DNA, including the spermatozoa DNA [4].

Mouse mutants were generated by chemical mutagenesis with N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). 3 series of ENU injections were made in 95 male C3H mice at a dose of 90 mg/kg.

In our work, we adhered to the following breeding scheme: males of the C3H/HeN strain (generation G0) injected with ENU were crossed with intact females of the same strain and the first generation (G1) of offspring was obtained. Four sons (G1) were taken from each male who restored fertility for subsequent crosses with C57Bl/6 mice to search for mutations leading to the development of epilepsy phenotype. Females (G2) obtained as a result of these crosses were hybridized with their fathers (G1) to receive offspring (G3) [5].

The identification and selection of mouse mutants with an increased tendency to epileptic seizures were carried out on the twentieth day after birth (P20) using the Krushinsky method, which takes into account the degree of manifestation of audiogenic seizures.

Audiogenic seizures (AS), which develop reflexively in rodents in response to sound stimulation, are one of the most popular and relevant experimental models of human generalized convulsive epilepsy (grand mal) [6].

For today, screening of 39 mice strains from 2 injection groups has been carried out and 12 strains showed signs of epileptic activity in a varying degree have been identified. To create mutant strains, those groups of animals were selected, where the manifestation of the trait among the offspring (G3) was the most frequent compared to other groups. The creation of strains with a recessive mutation was carried out with the selection of animals showing an aberrant phenotype for the second time. The inheritance of the aberrant phenotype was confirmed in the G5 generation.

Additional screening methods included the use of a chemical pilocarpine model. One of the stimuli provoking seizures in animals is the injection of pharmacological agents (agonists, antagonists, modulators) that increase the excitability or reduce the inhibition of the neuronal network [7].

For further research, we used one of the most popular in vivo models of epilepsy, parenteral administration of pilocarpine (pilocarpine, Tocris) at a dose of 200 mg/kg. This substance is a muscarinic receptor agonist and causes paroxysmal activity of neurons, in most cases leading to the development of tonic-clonic seizures in experimental animals. To prevent excessive activation of peripheral muscarinic receptors, the muscarinic receptor antagonist methylscopolamine (methylscopolamine, Sigma Aldrich) was administered subcutaneously at a dose of 1 mg/kg half an hour before parenteral administration of the chemoconvulsant. Animals with a mutant phenotype and the control group of hybrid mice were injected with pilocarpine. The time and duration of the convulsive attack onset in mutant and control animals were estimated. No differences were found.

To characterize epileptic strains, basic behavioral phenotyping was used, which includes tests for memory, learning ability, motor responses, and emotional status assessment. A complex of behavioral studies in the mutant strains revealed a more intense indicator of the acoustic startle response compared to the control hybrid group of animals. Also, under the conditions of the open field test, in terms of the average distance traveled, the motor activity of mice of these strains was higher than that of the control, but the level of anxiety was lowered and was determined by a smaller number of vertical racks. When assessing cognitive functions using the passive avoidance test, mutant individuals showed a higher ability to learn.

In vitro experiments were also carried out to assess spontaneous calcium activity using primary neuronal cultures of the cerebral cortex obtained from neonatal (P1) mice of the S5—1 strain. In this experiment,

we used the Ca²⁺ Oregon Green 488 BAPTA-1 AM indicator [8]. During in vitro experiments, an increase in the frequency of spontaneous calcium events in primary cultures of cerebral cortex cells in some of the studied mice was revealed.

Thus, the rapidly expanding field of genetic data contributes significantly to our understanding of epileptic disorders, but the relationship between genetic abnormalities and phenotypic manifestations remains complex and not fully understood. The identification and characterization of novel mice mutants, followed by the identification and characterization of the genes responsible for the mutations, will greatly improve our understanding of the genetic regulation of development and the subsequent disruption of the cerebral cortex.

Scientific research carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project №FSWR-2023—0029).

Bibliography

1. Avakyan G. N. Modern aspects of epilepsy treatment // Nervous diseases. 2005. V.2. p.4—8.
2. Kharibegashvili A. S., Evtushenko S. K., Ivanova M. F. // International neurological journal. 2017. № 2. p. 11—13.
3. Hedrich U., Maljevic S. Pathophysiologische Mechanismen genetischer Epilepsien // Zeitschrift Epileptologie. 2016. V.17, № 4. P.32—34.
4. Moshkin M. P. Mammalian genotypes for biomedical research//Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014. V.18, № 1. p.41—42.
5. Borisova E. V., Epifanova E. A., Tutukova S. A., et.al. Identification of novel mutations controlling cerebral cortex malformations caused by ENU-induced mutagenesis in the mouse//Sovremennye tehnologii v medicine. 2018. V.10. № 3. P.70—77.
6. Krushinsky L. V. New in the study of experimental epilepsy and the physiological mechanisms underlying it // Advances in Modern Biology. 1949. № 28. p. 108—133.
7. Loscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs//Elsevier. 2011. № 20. P.359—368.
8. Mitroshina E. V., Vedunova M. V., Kalintseva Ya. I. Calcium Imaging in Cell Cultures and Tissues: Educational and Methodological Guide.— Nizhny Novgorod: UNN them. N. I. Lobachevsky 2011.— 28 p.

РОЛЬ РЕДОКС-ЗАВИСИМОГО РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ В НАРУШЕНИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА

DOI 10.24412/CL-37124-2023-148-158

Шувалова М. Л.^{1,2,3}, Носов Г. А.^{1,3}, Белоусов В. В.^{1,3}¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия;² Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия;³ Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Россия

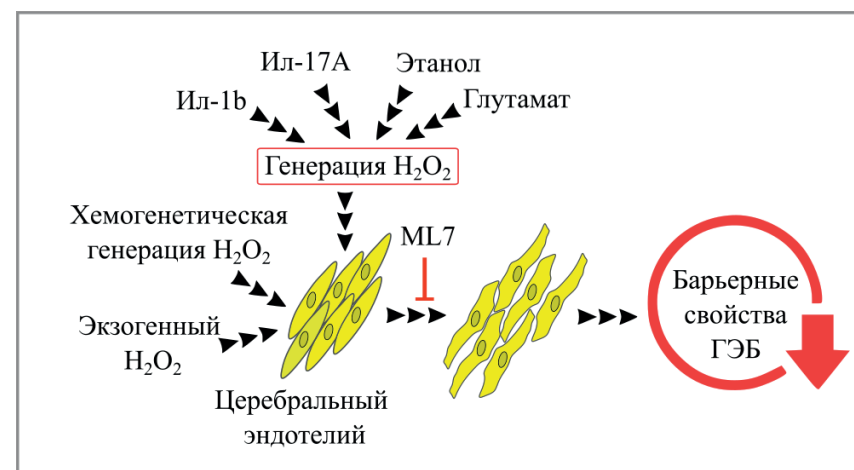
Shuvalova.m@fccps.ru

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, АФК, модель ГЭБ

Нарушения гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) при различных заболеваниях могут быть связаны с воздействием активных форм кислорода (АФК). Пероксид водорода (H_2O_2) является одним из основных видов АФК в клетке, который может функционировать как сигнальная молекула, а также как повреждающий агент. В данной работе исследовали влияние экзогенного и эндогенного H_2O_2 на функционирование гематоэнцефалического барьера. Для детекции H_2O_2 использовали генетически кодируемый сенсор *HyPer7*, а для контролируемой генерации эндогенного H_2O_2 использовали хемотропический генератор оксидазу D-аминокислот (DAAO). Для исследования генерации H_2O_2 в ответ на биологически активные вещества на церебральные эндотелиоциты воздействовали интерлейкином 17 А (ИЛ-17 А), интерлейкином 1b (ИЛ-1b), этанолом, глутаматом. Для данных веществ известно их негативное влияние на барьерные функции ГЭБ. Воздействие этих веществ приводило к генерации H_2O_2 в церебральных эндотелиоцитах с различными скоростями и амплитудами. Генерация H_2O_2 в ответ на воздействие ИЛ-17А, ИЛ-1b, глутамата, этанола, а также генерация эндогенного H_2O_2 и экзогенный H_2O_2 вызывали ремоделирование актинового цитоскелета в эндотелиоцитах, что

вело к нарушению эндотелиального монослоя и снижению его барьерных свойств. При блокировании ремоделирования цитоскелета ингибитором киназы легких цепей миозина ML7 эффект исследуемых веществ на проницаемость ГЭБ в модели *in vitro* не наблюдался. Таким образом, редокс-зависимое ремоделирование актинового цитоскелета эндотелиоцитов является одним из механизмов увеличения проницаемости ГЭБ. Данные результаты могут иметь важное значение для разработки новых методов лечения заболеваний, связанных с нарушением барьерных функций ГЭБ.

Графическое резюме



Введение

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) — это интерфейс между кровью и центральной нервной системой, который регулирует поток веществ в обе стороны, а также защищает нервную ткань от проникновения потенциально токсичных соединений, патогенов и иммунных клеток. ГЭБ играет критическую роль в поддержании гомеостаза ЦНС, нарушение его функционирования и повышение проницаемости имеют важное значение в патогенезе неврологических заболеваний, таких как рассеянный склероз, инсульт, нейродегенеративные заболевания и некоторые другие [1] [2]. Одним из механизмов нарушения барьерных свойств ГЭБ является генерация в его клеточных компонентах активных форм кислорода (АФК) [3]. АФК — это

высокореактивные химические соединения, чью реакционную способность обуславливает кислород. Повышенная продукция АФК может приводить к необратимому повреждению молекул и органелл, и, в итоге, к оксидативному стрессу и нарушению нормальных биологических процессов. Однако парадигма об исключительно негативном воздействии АФК за последние десятилетия была значительно пересмотрена в связи с открытием и изучением редокс-сигналинга [5]. В настоящее время круг факторов, для которых известен редокс-сигналинг, значительно расширился, в том числе благодаря современным инструментам детекции АФК в клетках [6].

Методы

Модель ГЭБ конструировали на основе культуральной вставки Transwell. Модель представляет из себя монослой эндотелиоцитов, растущий на люминальной стороне пористой мембраны, астроциты, растущие на аблюминальной стороне мембраны. Для определения барьерных свойств модели измеряли коэффициент проницаемости [7].

Для генерации H_2O_2 использовали генетически кодируемый генератор — оксидазу D-аминокислот (DAAO) [8]. Для визуализации образования перекиси водорода использовали генетически кодируемый флуоресцентный сенсор HyPer 7 [6]. В работе использовали конструкции, несущий слитый белок DAAO-HyPer7.

Результаты

Этанол, IL1b (интерлейкин 1b), IL17A (интерлейкин 17A) и глутамат *in vivo* увеличивают проницаемость ГЭБ. Чтобы выяснить, образуется ли H_2O_2 при воздействии этих веществ, к церебральным эндотелиоцитам, которые экспрессируют сенсор HyPer7, добавляли в конечных концентрациях: этанол — 100%, IL17A и IL1b — 100 нг/мл, глутамат — 1 мМ. Все вещества вызывали образование H_2O_2 , причем с отличающимися кинетиками (рис. 1).

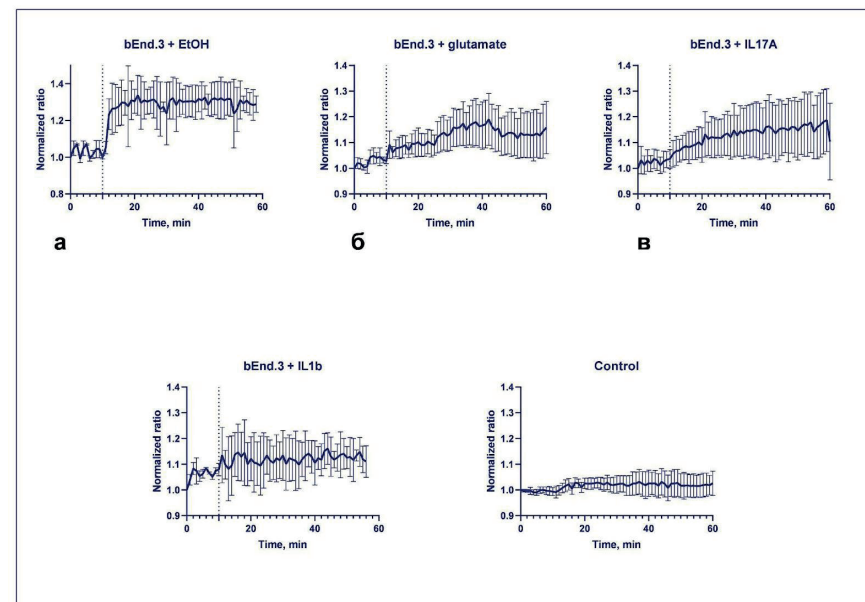


Рис 1. Генерация H_2O_2 в ответ на добавление этанола, глутамата, ИЛ-17 А и ИЛ-1b к клеткам церебрального эндотелия линии bEnd.3.

Далее определяли, влияет ли генерация H_2O_2 с помощью DAAO в эндотелиоцитах или астроцитах модели ГЭБ на ее барьерные свойства. При генерации H_2O_2 в астроцитах коэффициент проницаемости через 24 часа составил $11,6 \pm 1,1$ мкм/мин, а через 48 часов — $10,2 \pm 1,1$ мкм/мин, что больше по сравнению с исходным ($8,5 \pm 1,8$ мкм/мин) на 36% и 20%. При генерации H_2O_2 в эндотелиоцитах коэффициент проницаемости через 24 часа составил $10,1 \pm 1,2$ мкм/мин, а через 48 часов — $10,2 \pm 1,6$ мкм/мин, что больше по сравнению с исходным на 18% и 20%. Таким образом, генерация H_2O_2 в эндотелиоцитах и в астроцитах вела к значительному увеличению проницаемости ГЭБ.

Чтобы определить, не вызвано ли снижение барьерных функций ГЭБ гибелью его клеток, провели МТТ-тест на их жизнеспособность. В течение 24 часов инкубировали с 5 мМ D-аланином эндотелиоциты и астроциты. Значимых отличий в жизнеспособности клеток с HyPer7-DAAO и клеток без HyPer7-DAAO не обнаружено (рис. 2).

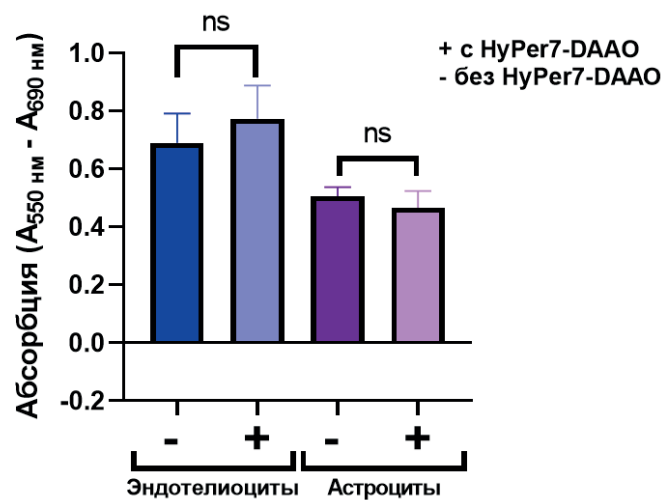


Рис. 2. Генерация H₂O₂ с использованием DAAO и 5 мМ D-аланина не ведет к гибели эндотелиоцитов и астроцитов.

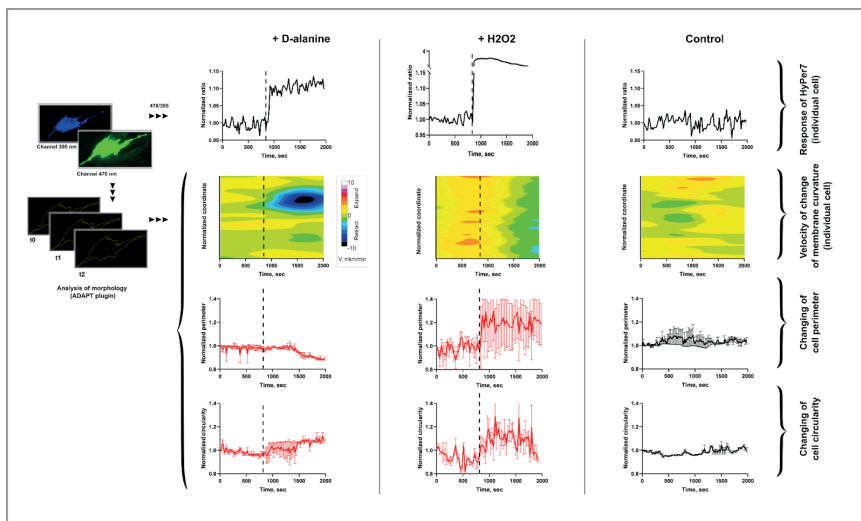


Рис. 3. Изменение формы индивидуальных клеток в ответ на эндогенный или экзогенный H₂O₂. Изображения обрабатывали с использованием плагина ADAPT.

Мы предположили, что при генерации H₂O₂ барьерные функции ГЭБ могут нарушаться из-за редокс-зависимого ремоделиро-

вания цитоскелета клеток, изменения их формы и нарушения эндотелиального монослоя. Мы показали, что в ответ на генерацию H₂O₂ эндотелиальные клетки меняют свою форму (рис. 3). Они увеличивают свой периметр, циркулярность уменьшается. Мембрана увеличивает скорость изменения своей кривизны, что свидетельствует об активной перестройке актинового цитоскелета. Эти данные демонстрируют, что в ответ на генерацию H₂O₂ в эндотелиальном монослое происходят значительные перестройки, что в итоге ведет к увеличению проницаемости ГЭБ. Таким образом, генерация H₂O₂ значительно влияет на форму индивидуальных клеток и на структуру эндотелиального монослоя в целом.

Чтобы определить, является ли изменение формы клеток зависимым от активации киназы легких цепей миозина, к клеткам добавляли ее ингибитор ML7. Добавление ML7 значительно снижало эффект H₂O₂ на изменение формы клетки (рис. 4).

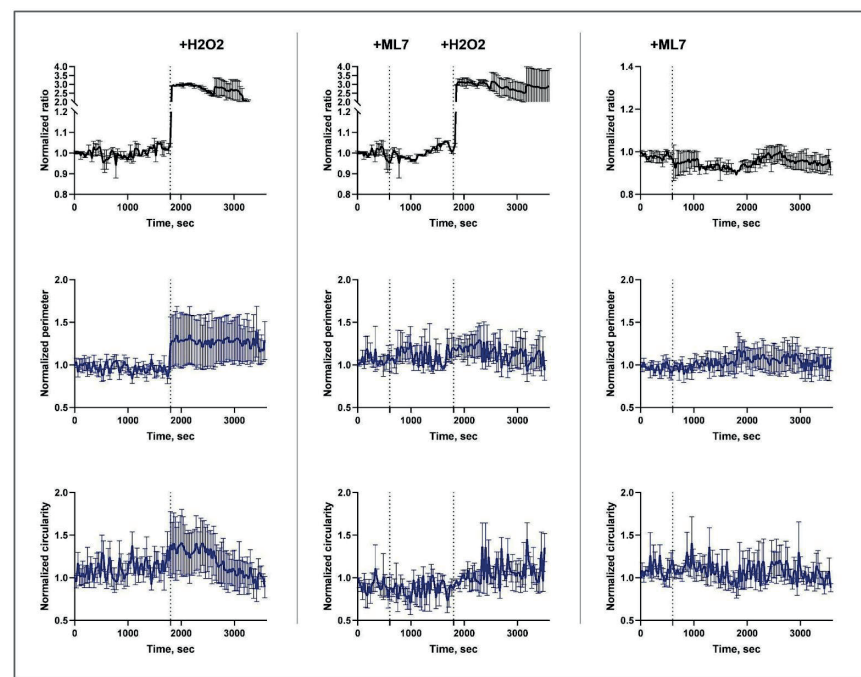


Рис. 4. Блокирование киназы легких цепей миозина добавлением ингибитора ML7 снижает эффект H₂O₂ на изменение формы эндотелиоцитов.

Обсуждение

Мы показали, что H_2O_2 образуется в церебральном эндотелии в ответ на IL1b, IL17A, глутамат и этанол. Для исследования выбрали именно эти вещества, потому что известно, что они вызывают нарушения барьерных свойств ГЭБ и их воздействие на клетки может приводить к генерации АФК [9] [10] [11] [12].

Одной из главных причин повышенной генерации АФК в клетке является воспалительная реакция, медиаторами которой являются разнообразные провоспалительные цитокины [13]. Генерация АФК в клетках ГЭБ происходит в ответ на “прооксидантные” провоспалительные цитокины — IL17A, TNF- α [14], IL1 β , IL6 и другие. Эти цитокины играют важную роль в развитии нейровоспаления и рассеянного склероза, а также других дисфункций ГЭБ [15].

Одним из прооксидативных цитокинов является IL17A. Он играет важную роль в антимикробной защите, однако его избыточная активность ассоциирована с различными аутоиммунными заболеваниями. Этот цитокин играет важную роль в развитии рассеянного склероза и нейровоспаления [16]. Источником IL17A являются главным образом Т-хелперы (Th17) [19]. Показано, что Th-17 клетки инфильтруют очаги поражения больных рассеянным склерозом и животных с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (животная модель рассеянного склероза) [16].

Глутамат — основной возбуждающий нейромедиатор ЦНС, а также биологически активное вещество с широким спектром эффектов и клеток-мишеней [21]. В эндотелиоцитах глутамат воздействует на N-метил-D-аспартатные рецепторы (NMDA-рецепторы), что вызывает вход кальция и в итоге ведет к продукции АФК митохондриями [22]. Окислительный стресс при воздействии глутамата также усугубляется тем, что при высоких концентрациях он ингибирует глутамат/цистеиновый антипортер, что снижает концентрацию в клетке цистеина — предшественника антиоксиданта глутатиона [23].

Этанол комплексно влияет на организм, его высокая концентрация в крови приводит в том числе к увеличению проницаемости ГЭБ. Хроническое употребление этанола может быть причиной поступления в мозг потенциально опасных веществ и нарушения функций нервной ткани [12].

Увеличение проницаемости ГЭБ за счет образования H_2O_2 может быть общим механизмом, по которому действуют исследованные вещества. Различия в кинетиках генерации H_2O_2 может быть

объяснено разными системами продукции H_2O_2 , которые активируются этими веществами [25]. Большой интерес представляет провести ингибиторный анализ различных систем генерации H_2O_2 , чтобы определить, какая из них активируется в ответ на каждое из исследуемых веществ. Ингибирование конкретной системы продукции АФК может быть полезно при лечении нарушений ГЭБ, вызванного тем или иным веществом.

Мы предположили, что увеличение проницаемости ГЭБ в ответ на генерацию H_2O_2 может быть связано либо с гибелью клеток ГЭБ, либо с редокс-зависимым ремоделированием цитоскелета эндотелиоцитов, изменением их формы и, как следствие, нарушения целостности эндотелиального монослоя. Генерация H_2O_2 не приводила к гибели клеток. Действительно, концентрации H_2O_2 , которые вызывают гибель клеток, находятся в микромолярном диапазоне, в то время как ДААО генерирует H_2O_2 в наномолярных концентрациях, которые характерны для редокс-сигналинга. Мы действительно наблюдали результат событий редокс-сигналинга: ремоделирование цитоскелета и статистически значимые изменения в морфологии эндотелиальных клеток. Механизм этого ремоделирования может заключаться в активации редокс-зависимого фермента киназы легких цепей миозина, которая активирует актомиозиновый сократительный аппарат клетки [27]. Актиновый цитоскелет играет критическую роль в функционировании эндотелия, поддерживая форму клетки и организацию плотных контактов [28]. Редокс-зависимая активация киназы легких цепей миозина приводит к фосфорилированию легких цепей миозина и активации сократительного аппарата клетки [29].

Заключение

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что H_2O_2 является важным регулятором проницаемости ГЭБ. H_2O_2 продуцируется в ответ на вещества, которые увеличивают проницаемость ГЭБ, и его генерация сама по себе ведет к увеличению проницаемости ГЭБ. Блокирование редокс-зависимого ремоделирования цитоскелета эндотелиоцитов может быть стратегией лечения нарушений функций ГЭБ, которые обусловлены генерацией H_2O_2 .

Список литературы

1. Greco A, Minghetti L, Sette G, Fieschi C, Levi G. Cerebrospinal fluid isoprostane shows oxidative stress in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 1999;53: 1876—1879.

2. Knox EG, Aburto MR, Clarke G, Cryan JF, O'Driscoll CM. The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration. *Mol Psychiatry*. 2022;27: 2659—2673.
3. van Leeuwen E, Hampton MB, Smyth LCD. Redox signalling and regulation of the blood-brain barrier. *Int J Biochem Cell Biol*. 2020;125: 105794.
4. Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL, Savvateeva MV, Melnikova NV, Krasnov GS, et al. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019: 6175804.
5. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21: 363—383.
6. Pak VV, Ezerina D, Lyublinskaya OG, Pedre B, Tyurin-Kuzmin PA, Mishina NM, et al. Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function. *Cell Metab*. 2020;31: 642—653.e6.
7. Zhao W, Han L, Bae Y, Manickam DS. Lucifer Yellow — A Robust Paracellular Permeability Marker in a Cell Model of the Human Blood-brain Barrier. *J Vis Exp*. 2019. doi:10.3791/58900
8. Matlashov ME, Belousov VV, Enikolopov G. How much H₂O₂ is produced by recombinant D-amino acid oxidase in mammalian cells? *Antioxid Redox Signal*. 2014;20: 1039—1044.
9. Wang Y, Jin S, Sonobe Y, Cheng Y, Horiuchi H, Parajuli B, et al. Interleukin-1 β induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes. *PLoS One*. 2014;9: e110024.
10. Setiadi AF, Abbas AR, Jeet S, Wong K, Bischof A, Peng I, et al. IL-17A is associated with the breakdown of the blood-brain barrier in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2019;332: 147—154.
11. Xhima K, Weber-Adrian D, Silburt J. Glutamate Induces Blood-Brain Barrier Permeability through Activation of N-Methyl-D-Aspartate Receptors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2016. pp. 12296—12298.
12. Gulati A, Nath C, Shanker K, Srimal RC, Dhawan KN, Bhargava KP. Effect of alcohols on the permeability of blood-brain barrier. *Pharmacol Res Commun*. 1985;17: 85—93.
13. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20: 1126—1167.
14. Sandoval R, Lazcano P, Ferrari F, Pinto-Pardo N, González-Billault C, Utreras E. TNF- α Increases Production of Reactive Oxygen Species through Cdk5 Activation in Nociceptive Neurons. *Front Physiol*. 2018;9: 65.
15. Yang C, Hawkins KE, Doré S, Candelario-Jalil E. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019;316: C135—C153.
16. Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Kanjevac T, Arsenijevic D, Radosavljevic G, et al. Interleukin-17 in Chronic Inflammatory Neurological Diseases. *Front Immunol*. 2020;11: 947.
17. Pietrowski E, Bender B, Huppert J, White R, Luhmann HJ, Kuhlmann CRW. Pro-inflammatory effects of interleukin-17A on vascular smooth muscle cells involve NAD(P)H-oxidase derived reactive oxygen species. *J Vasc Res*. 2011;48: 52—58.
18. Wojkowska DW, Szpakowski P, Glabinski A. Interleukin 17A Promotes Lymphocytes Adhesion and Induces CCL2 and CXCL1 Release from Brain Endothelial Cells. *Int J Mol Sci*. 2017;18. doi:10.3390/ijms18051000
19. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10: 479—489.
20. Reynolds IJ, Hastings TG. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J Neurosci*. 1995;15: 3318—3327.
21. Wang Y, Wu J, Wang J, He L, Lai H, Zhang T, et al. Mitochondrial oxidative stress in brain microvascular endothelial cells: Triggering blood-brain barrier disruption. *Mitochondrion*. 2023;69: 71—82.
22. Chen W, Guo C, Feng H, Chen Y. Mitochondria: Novel Mechanisms and Therapeutic Targets for Secondary Brain Injury After Intracerebral Hemorrhage. *Front Aging Neurosci*. 2020;12: 615451.
23. Bridges RJ, Natale NR, Patel SA. System xc⁻ cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *Br J Pharmacol*. 2012;165: 20—34.
24. Dong X—X, Wang Y, Qin Z-H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2009;30: 379—387.
25. Lennicke C, Rahn J, Lichtenfels R, Wessjohann LA, Seliger B. Hydrogen peroxide — production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun Signal*. 2015;13: 39.
26. Шувалова МЛ, Носов ГА, Белоусов ВВ. ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННОЙ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА IN VITRO. *Нейротехнологии будущего: тезисы участников конференции «Нейрокампус 2022: старт!» (04—07 сентября 2022 г)*. 2022; 146—150.
27. Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J*. 2010;24: 1023—1034.

28. Luissint A-C, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud P-O. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS*. 2012;9: 23.
29. Matsumura F, Yamakita Y, Yamashiro S. Myosin light chain kinases and phosphatase in mitosis and cytokinesis. *Arch Biochem Biophys*. 2011;510: 76—82.

УДК-57.084.1, 576.32/.36

ДОСТАВКА КАНАЛА TRPV1 ЧЕЛОВЕКА В ТОРМОЗНЫЕ НЕЙРОНЫ ДЛЯ ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЭПИЛЕПСИИ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-159-163

Пурик А. А.^{1,2}, Калиниченко А. Л.¹, Мухаметшина Л. Ф.¹,
Круть В. Г.³, Мальцев Д. И.^{1,3}, Подгорный О. В.^{1,2,3}, Белоусов В. В.^{1,2,3,4}.

¹ Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия,

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия,

³ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва, Россия,

⁴ Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center, Skolkovo, Moscow, Russia
e-mail: anastakson@mail.ru

Аннотация. Мы создали генетические конструкции для доставки человеческого термочувствительного канала TRPV1 в тормозные нейроны и провели тестирование этих конструкций на клетках линии НЕК293. Целью нашей работы является разработка методов неинвазивной термогенетической терапии эпилепсии.

Ключевые слова: Термогенетика, hTRPV1 канал, Эпилепсия, Cre/loxP-система, Клеточная линия НЕК293.

Эпилепсия является неврологическим заболеванием и характеризуется эпизодами непредсказуемых судорог, сопровождающихся часто потерей сознания и другими симптомами. В механизме возникновения чрезмерной электрической активности мозга при эпилепсии участвуют тормозные нейроны, которые в норме должны справляться с нормализацией активности, исходящей от возбуждающих нейронов, однако при дисфункции они находятся в дисбалансе с возбуждающими, что приводит к возникновению приступов^[1].

Одним из многообещающих подходов для подавления судорожных приступов при эпилепсии является модуляция активности возбуждающих или тормозных нейронов с помощью опто- или хемогенетики^{[2] [3]}. Однако, применение этих методов для лечения

эпилепсии ограничено определенными недостатками. Оптогенетика является инвазивным методом, включающим в себя использование светочувствительных ионных каналов растений и архей. В хемогенетике модуляция нейрональной активности развивается медленно из-за необходимости лиганда проникать из кровотока в ткани мозга. Перспективной альтернативой является термогенетика, основанная на использовании термочувствительного катионного канала TRPV1 человека поскольку, нагрев тканей мозга можно осуществлять с помощью фокусного ультразвука высокой интенсивности. Мы предполагаем, что доставив этот канал в тормозные нейроны в очаг эпилепсии и активировав их небольшим нагревом во время возникновения эпилептиформной активности, можно будет подавить ее генерализацию, и тем самым предотвратить развитие эпилептического приступа.

Доставка термочувствительного канала TRPV1 человека в тормозные нейроны представляет сложность из-за довольно больших размеров как кодирующей последовательности самого канала, так и всех известных промоторов, специфичных для тормозных нейронов. На дальнейших этапах мы будем упаковывать конструкции в аденоассоциированные вирусы, имеющие ограничение емкости в пять тысяч пар оснований, а вместе данные последовательности превышали бы это ограничение почти в два раза. Поэтому мы решили доставлять канал с помощью двух векторов и Cre/loxP системы. В один вектор мы помещали Cre-рекомбиназу под тканеспецифический промотор, а в другой — инвертированную последовательность канала с системой LoxP сайтов DIO, под промоторами CMV или hSyn. Мы ожидаем, что в тормозных нейронах будет экспрессироваться Cre-рекомбиназа, доставленная с помощью одного вектора. Она будет переворачивать инвертированную кодирующую последовательность канала TRPV1 из другого вектора, благодаря чему будет обеспечиваться специфичность экспрессии канала в тормозных нейронах.

В работе было собрано 6 различных конструкций. Пять из них используют Cre/loxP-систему [4]. В одной конструкции вместе с TRPV1 каналом под синапсиновым промотором находится участок микроРНК, обеспечивающий дифференциальную экспрессию канала в интернейронах: pAAV-hSyn-TRPV1-flag-8X2C+ (WPRE, SV40) [5].

Для Cre/loxP-системы мы собрали три плазмиды с кодирующей последовательностью Cre-рекомбиназы: с парвальбуминовым промотором — pAAV-fPV-NLS-Cre+ (WPRE, SV40), соматостатино-

вым промотором — pAAV-fSST-NLS-Cre+ (WPRE, SV40) и промотором mGAD65 — pAAV-mGAD65-NLS-Cre+ (WPRE, SV40). Были взяты разные специфические промоторы в целях дальнейшего использования конструкций в соответствующих типах нейронов. Вторая часть Cre/loxP-системы — DIO (double-floxed inverse open reading frame, loxP-сайты) — была помещена в две другие конструкции с инвертированной последовательностью hTRPV1 канала: pAAV-CMV-hSyn-DIO-TRPV1-flag+ (WPRE, SV40) и pAAV-CMV-DIO-TRPV1-flag+ (WPRE, SV40).

Вышеупомянутые плазмиды с Cre/loxP-системой были попарно контрастированы в клеточную линию HEK293 трансфицирующим агентом FuGene. В результате получилось шесть вариантов. Также была проведена трансфекция плазмидой с микроРНК. Для обнаружения изменений уровня кальция внутри клетки, мы сделали дополнительную котрансфекцию клеток плазмидой pAAV_CAG-GCaMP6s. В качестве контроля мы провели две трансфекции: (№ 1) pAAV_CAG-GCaMP6s и (№ 2) pAAV_CAG-GCaMP6s с pAAV-CaMKII-hTRPV1-flag+ (WPRE, SV40).

На следующий день после трансфекции была проведена съемка на эпифлуоресцентном микроскопе: включалась запись базовой линии, на 2 минуте добавлялся капсаицин с конечной концентрацией 9 мкМ — химический агонист TRPV1 канала, завершалась запись на 3 минуте. После добавления капсаицина в наших образцах наблюдалось резкое увеличение интенсивности флуоресценции, что свидетельствовало о повышении внутриклеточной концентрации кальция вследствие открытия hTRPV1. Как ожидалось, в клетках контроля (№ 2) также увеличивалась флуоресценция, а клетки контроля (№ 1) не изменили своей интенсивности. Для подсчета ответивших клеток была использована программа ImageJ, на основе полученных данных были построены графики с применением Python.

В дальнейших мы планируем упаковывать собранные конструкции в аденоассоциированные вирусы и провести стереотаксические операции на мышах с целью подавления эпилептиформной активности путем термогенетической активации тормозных нейронов.

Проект поддержан программой развития генетических технологий на 2019—2027 годы Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075—15—2019—1789, и грантом РНФ № 23—15—00295.

Список литературы

1. Avoli M, de Curtis M, Gnatkovsky V, Gotman J, Köhling R, Lévesque M, Manseau F, Shiri Z, Williams S. Specific imbalance of excitatory/inhibitory signaling establishes seizure onset pattern in temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol.* 2016 Jun 1;115 (6):3229—37. doi: 10.1152/jn.01128.2015. Epub 2016 Apr 13. PMID: 27075542; PMCID: PMC4946603.
2. Krook-Magnuson, E., Armstrong, C., Oijala, M. et al. On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nat Commun* 4, 1376 (2013). <https://doi.org/10.1038/ncomms2376>
3. Paz JT, Davidson TJ, Frechette ES, Delord B, Parada I, Peng K, Deisseroth K, Huguenard JR. Closed-loop optogenetic control of thalamus as a tool for interrupting seizures after cortical injury. *Nat Neurosci.* 2013 Jan;16 (1):64—70. doi: 10.1038/nn.3269. Epub 2012 Nov 7. PMID: 23143518; PMCID: PMC3700812.
4. Van Duyn GD. Cre Recombinase. *Microbiol Spectr.* 2015 Feb;3 (1): MDNA3—0014—2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3—0014—2014. PMID: 26104563.
5. Keaveney MK, Tseng HA, Ta TL, Gritton HJ, Man HY, Han X. A MicroRNA-Based Gene-Targeting Tool for Virally Labeling Interneurons in the Rodent Cortex. *Cell Rep.* 2018 Jul 10;24 (2):294—303. doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.049. PMID: 29996091; PMCID: PMC6095194.

DELIVERY OF THE HUMAN TRPV1 CHANNEL TO INHIBITORY NEURONS FOR THERMOGENETIC THERAPY OF EPILEPSY.

Purik A. A.^{1,2}, Kalinichenko A. L.¹, Mukhametshina L. F.¹,
Krut V. G.³, Maltsev D. I.^{1,3}, Podgorny O. V.^{1,2,3},
Belousov V. V.^{1,2,3,4}.

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia,

² The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russia,

³ Federal State Budgetary Institution “Federal center of brain research and neurotechnologies” of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia,

⁴ Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center, Skolkovo, Moscow, Russia

Annotation. We have created genetic constructs for delivering the human thermosensitive TRPV1 channel to inhibitory neurons and tested these constructs on the HEK293 cell line. The aim of our work is to develop methods for non-invasive thermogenetic therapy of epilepsy.

Key words: Thermogenetics, hTRPV1 channel, Epilepsy, Cre/loxP-system, HEK293 cell line.

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПРОТОТИПА БИОГИБРИДНОГО НЕЙРОИНТЕРФЕЙСА НА ОСНОВЕ КОМПОЗИЦИОННОГО ПОЛИМЕРА И КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-164-167

Жирнов С. В.¹, Каршиева С. Ш.^{1,2}, Тунеков Т. А.¹,
Илясов А. Р.^{1,3}

¹ Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС»,
Москва, Россия,

² ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина, Москва, Россия,

³ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия,
e-mail: m2003800@edu.misis.ru

Аннотация. В разработке материалов и дизайна инвазивных нейроинтерфейсов существуют два тренда — миниатюризация и использование мягких токопроводящих материалов. Мы демонстрируем способ синтеза токопроводящего материала на основе полидиметилсилоксана и графена, и метод фабрикации микроэлектродной матрицы с интегрированными клеточными сфероидами на его основе.

Ключевые слова: нейроинтерфейсы, композиционные материалы, микроэлектродные матрицы, клеточные сфероиды.

Современные инвазивные нейроинтерфейсы имеют ряд проблем: низкая биосовместимость из-за использования материалов, сильно отличающихся по своим физическим свойствам от нервной ткани, и, как следствие, невозможность длительной эксплуатации без критического падения разрешения из-за развития реакции отторжения; низкая надежность наиболее популярных тонкопленочных электродных систем, чему способствует сложный многоэтапный процесс их изготовления; высокий риск нанесения травмы при установке нейроинтерфейса и невозможность его обслуживания в случае повреждения.

Альтернативным подходом, активно обсуждаемым в последнее время в литературе, являются биогибридные системы — так называемые «живые электроды», — использующие биологические компоненты в качестве инженерной составляющей, призванной улучшить и даже вывести биосовместимость нейроинтерфейсов на новый уровень, недоступный для классических систем. В та-

ких биогибридных системах клетки могут играть различную роль, от покрытия для улучшения клеточной адгезии [1] или мишени для реиннервации [2] до функциональных «живых электродов», управляемых путем фотостимуляции [3]. Биогибридные системы позволяют проектировать микроэлектродные матрицы, которые могут не учитывать особенности ткани, в или на которую они будут имплантированы, оставляя эту задачу биологической компоненте.

Однако, биогибридный подход часто используется только для компенсации недостатков классических тонкопленочных нейроинтерфейсов. В нашей работе мы демонстрируем синтез материала и процесс изготовления композиционной 3D-микроэлектродной матрицы, механические свойства которой близки к свойствам нервной ткани.

Материалы на основе наноструктурированных форм углерода, таких как углеродные нанотрубки [4], графит [5], графен и оксид графена [6], были широко исследованы в качестве проводящих материалов микроэлектродных матриц. Их низкое, по сравнению с проводящими полимерами, сопротивление, стойкость к окислению в условиях организма и низкая себестоимость привлекли внимание к разработке имплантируемых нейроинтерфейсов с их использованием [7]. При этом углеродные нанотрубки и графен имеют наибольшую теоретическую проводимость в чистом виде, однако графен проявляет меньшую токсичность как *in vitro*, так и *in vivo* [8] [9].

Мы демонстрируем метод синтеза композиционного проводящего материала на основе дисперсного графена и полидиметилсилоксана, а также метод формирования 3D-микроэлектродных матриц.

Дисперсный графен (порядка 100 атомных слоев в листе) был предоставлен ООО «РУСГРАФЕН» и использовался в исходном виде. Полидиметилсилоксан в виде двухкомпонентного компаунда (форполимер и катализатор) был закуплен в ГНЦ РФ АО «ГНИИХ-ТЭОС», марка СИЭЛ 159—254.

Синтез композиционного состава был проведен в три стадии. В первую очередь мы провели ультразвуковую обработку (Bandelin SONOPULS HD 2200, зонд ТТ 13) порошка графена в растворе гексана и олеиновой кислоты (1/20/1 по массе) в течение 30 минут. Олеиновая кислота была использована в качестве детергента для предотвращения агрегации частиц графена в процессе синтеза. Вторым этапом был подготовлен раствор полидиметилсилоксана (1/10 катализатор/форполимер) в гексане (1/20 по объему), после чего он был смешан с раствором диспергированного графена в те-

чение одного часа на магнитной мешалке. На третьем этапе раствор был перемещен в выпаривательный сосуд, после чего осажден при нагреве (50 С, 90 мин) до состояния вязкой пасты. Мы установили порог перколяции для данного композита между 8 и 10 массовыми процентами наполнения графеном.

Для формирования структуры чипа мы использовали негативные литьевые формы, полученные лазерной обработкой (Avesta, 1030 нм, фемтосекундный лазер) фоторопластовых пленок по заданному шаблону. Композиционная паста была вручную зашлифована в литьевые формы, после чего покрыта слоем раствора чистого полидиметилсилоксана в гескасе для изоляции, и отверждена при 190 С в течение 6 часов.

В нашей работе мы использовали предварительно культивированные миосферы, которые были размещены в изолированных ячейках на поверхности электродной матрицы. Такие гибридные ячейки могут являться подходящими мишенями для иннервации аксонами периферических нервов. Мы подтвердили возможность выживания и распластывания путем культивации в течение трех дней миосфер внутри электродных ячеек *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030».

Список литературы

1. E. K. Purcell, J. P. Seymour, S. Yandamuri, & D. R. Kipke. In vivo evaluation of a neural stem cell-seeded prosthesis. // Journal of neural engineering. — 2009. — V. 6 (2).
2. A. E. Rochford, A. Carnicer-Lombarte, M. Kawan et al. Functional neurological restoration of amputated peripheral nerve using biohybrid regenerative bioelectronics. // Science Advances. — 2023. — V. 9 (12).
3. D. O. Adewole, L. A. Struzyna, J. C. Burrell et al. Development of optically controlled “living electrodes” with long-projecting axon tracts for a synaptic brain-machine interface. // Science Advances, —2021. —V. 7 (4).
4. C. Yang, C. B. Jacobs, M. D. Nguyen et al. Carbon nanotubes grown on metal microelectrodes for the detection of dopamine. // Analytical chemistry. —2016. —V. 88 (1), — P. 645—652.
5. A. Blau, A. Murr, S. Wolff et al. Flexible, all-polymer microelectrode arrays for the capture of cardiac and neuronal signals. // Biomaterials, —2011. —V. 32 (7). —P. 1778—1786.

6. Y. Lu, H. Lyu, A. G. Richardson, Luca (2016). Flexible neural electrode array based-on porous graphene for cortical microstimulation and sensing. Scientific reports, 6 (1), 33526.
7. I. R. Mineev, P. Musienko, A. Hirsch et al. Electronic dura mater for long-term multimodal neural interfaces. // Science, —2015. —V. 347 (6218). —P. 159—163.
8. D. Sahni, A. Jea, J. A. Mata et al. Biocompatibility of pristine graphene for neuronal interface. // Journal of Neurosurgery: Pediatrics. — 2011. — V. 11 (5). — P. 575—583.
9. Y. Zhang, S. F. Ali, E. Dervishi et al. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells. // ACS nano, —2010. —V. 4 (6). — P. 3181—3186.

PRODUCTION AND PROPERTIES OF A PROTOTYPE OF BIOHYBRID NEUROINTERFACE BASED ON COMPOSITE POLYMERS AND CELLULAR SPHEROIDS.

Zhirnov S. V.¹, Karshieva S. S.^{1,2}, Tunekov T. A.¹, Iliasov A. R.^{1,3}

¹National University of Science and Technology “MISIS”, Moscow, Russia

²N. N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia

³National research nuclear university “MEPHI”, Moscow, Russia

Abstract: There are two trends in the development of materials and design of invasive neurointerfaces — miniaturization and use of soft conductive materials. We demonstrate a method of synthesizing a conductive material based on polydimethylsiloxane and graphene particles, and a method of fabricating a microelectrode matrix with integrated cellular spheroids based on it.

Key words: neurointerfaces, composite materials, microelectrode arrays, cellular spheroids.

ХЕМОГЕНЕТИЧЕСКИ ВЫЗВАННЫЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ВЛИЯЕТ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ В ПИРАМИДАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ CA1

DOI 10.24412/CL-37124-2023-168-171

Джэппи Д. ¹, Калиниченко А. Л. ², Солюс Г. М. ²,
Мальцев Д. И. ^{1,2,3}, Богданова Ю. А. ^{2,3},
Мухаметшина Л. Ф. ^{2,4}, Петрухова Е. О. ², Соколов Р. А. ^{2,3},
Мощенко А. А. ¹, Шайдуров В. А. ^{1,5}, Розов А. В. ¹,
Подгорный О. В. ^{1,2,3}, Белоусов В. В. ^{1,2,3,6}

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва, Россия;

² Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

³ РНИМУ им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия;

⁵ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485 Москва, Россия;

⁶ Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center, Skolkovo, Moscow, Russia
email: djjappy@hotmail.co.uk

Аннотация. Используя хемогенетический подход, основанный на дрожжевой флаavin-зависимой оксидазе D-аминокислот (DAAO) для генерации H₂O₂ в пирамидальных клетках поля CA1 гиппокампа, мы показали, что избыточное образование H₂O₂ снижает долговременную потенциацию в синапсах CA3 — CA1 пирамидальных клеток и уменьшает долговременную депрессию в синапсах ССК+ интернейронов — CA1 пирамидальных клеток.

Ключевые слова: Гиппокамп, долговременная потенциация (ДВП), долговременная депрессия (ДВД), пероксид водорода (H₂O₂), окислительный стресс

Окислительный стресс возникает при нарушении редокс-зависимого сигналинга, повышении уровня генерации реактивных форм кислорода (АФК) и снижения активности антиоксидантных защитных механизмов. Нарушение окислительно-восстановительного баланса и выработка активных форм кислорода приводит к повреждению клеток. Считается, что в ЦНС окислительный стресс

может являться причиной когнитивного старения, психических и нейродегенеративных заболеваний [1]. Пероксид водорода (H₂O₂) является одной из самых стабильных молекул, относящихся к АФК, играет одну из ключевых ролей в редокс-зависимом сигналинге и служит предшественником некоторых более реакционно-способных форм АФК. H₂O₂ образуется преимущественно в процессе энергетического метаболизма и активности некоторых ферментов. Он является транскрипционно независимым вторичным мессенджером, поэтому его концентрация в клетке обычно находится под жестким контролем.

Синаптические контакты между нейронами могут быть первичной мишенью избыточного синтеза H₂O₂, а вызванные H₂O₂ изменения параметров синаптической передачи могут соответствовать ранним симптомам заболеваний, до того, как нейродегенерация станет очевидной. Ранее было показано, что окислительное повреждение вызывает изменения в синаптической пластичности [4].

Существуют свидетельства того, что различные популяции клеток в мозге имеют разную чувствительность к окислительному стрессу, и это может привести к различным последствиям для передачи нервного импульса в различных типах синапсов в условиях окислительного стресса [5]. Гиппокамп — одна из областей мозга которая сильно подвержена влиянию окислительного стресса, и клетки этой структуры подвергаются дегенерации при болезни Альцгеймера.

Длительный окислительный стресс приводит к гибели клеток с очевидными последствиями для работы мозга. Однако ранние стадии действия H₂O₂ на синапсы остаются малоизученными. Для исследования механизмов острого воздействия окислительного стресса на синаптическую пластичность и сетевую активность нейронов мы использовали хемогенетический подход. Нейроны в первичных культурах и/или в гиппокампах мышей были трансдуцированы вирусом, кодирующим оксидазу D-аминокислот из дрожжей (DAAO). Внеклеточное добавление D-аминокислот приводило к синтезу H₂O₂ в трансдуцированных клетках, что детектировалось по изменению флуоресценции генетически кодируемого биосенсора HyPer7. В экспериментах на переживающих срезах мозга мышей в качестве субстрата DAAO мы использовали D-норвалин в концентрации 2 mM. Хемогенетически вызванное увеличение концентрации H₂O₂ в постсинаптических пирамидных нейронах поля CA1 приводило к значительному подавлению долговременной по-

тенциации (ДВП) в возбуждающих синапсах, образованных коллатеральными Шаффера. Биохимический механизм H_2O_2 — зависимо угнетения ДВП в настоящий момент изучается. Более того избыточное производство перексид водорода в CA1 пирамидных клетках приводило к утрате способности индуцировать долговременной депрессию (ДВД) в перисоматических тормозных синапсах, образованных холецистокинин-положительными интернейронами. Фосфорилирование постсинаптических каналов является необходимым этапом индукции ДВП во входах коллатералей Шаффера (AMPA рецепторы) и ДВД в вышеупомянутых тормозных синапсах (ГАМК рецепторы), что позволяет предположить в качестве механизма угнетения долговременной пластичности подавление перексидом водорода киназной активности в трансдуцированных нейронах [2, 3].

На сетевом уровне хемогенетически-вызванное повышение концентрации H_2O_2 в пирамидах поля CA1 приводило к значительному снижению частоты возникновения и амплитуды спонтанных островолновых осцилляций (SPW-R).

В контрольных экспериментах, где использовались срезы гиппокампов мышей, трансдуцированных вирусом, кодирующим инактивированную форму DAAO (R285A), добавление D-норвалина не вызывало подавления синаптической пластичности в возбуждающих и тормозных синапсах и не приводила к полному угнетению SPW-R.

Проект поддержан грантом РФФ № 23—75—30023.

Список литературы

1. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now?//Journal of Neurochemistry. 2006. Т. 97. № 6. С. 1634—1658.
2. Jappy D. [и др.]. GABABR-Dependent Long-Term Depression at Hippocampal Synapses between CB1-Positive Interneurons and CA1 Pyramidal Cells//Frontiers in Cellular Neuroscience. 2016. (10).
3. Lee H.-K. [и др.]. Phosphorylation of the AMPA Receptor GluR1 Subunit Is Required for Synaptic Plasticity and Retention of Spatial Memory//Cell. 2003. № 5 (112). С. 631—643.
4. Pellmar T. C., Hollinden G. E., Sarvey J. M. Free radicals accelerate the decay of long-term potentiation in field CA1 of guinea-pig hippocampus//Neuroscience. 1991. № 2 (44). С. 353—359.
5. Wang X., Michaelis E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain//Frontiers in Aging Neuroscience. 2010. Т. 2. № MAR.

CHEMOGENETIC INTRACELLULAR PRODUCTION OF H_2O_2 AFFECTS SYNAPTIC PLASTICITY IN CA1 PYRAMIDAL CELLS.

David Jappy¹, Andrei L. Kalinichenko², Georgy M. Solius², Dmitry I. Maltsev^{1,2,3}, Yulia A. Bogdanova^{2,3}, Liana F. Mukhametshina^{2,4}, Elena O Petrukhova², Rostislav A. Sokolov^{2,3}, Aleksandr A. Moshchenko¹, Vladimir A. Shaydurov^{1,5}, Andrei V. Rozov¹, Oleg V. Podgorny^{1,2,3}, Vsevolod V. Belousov^{1,2,3,6}

¹ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Federal Medical Biological Agency, 117997 Moscow, Russia;

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia;

³ Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia;

⁴ Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia;

⁵ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, 117485 Moscow, Russia;

⁶ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia
email: djjappy@hotmail.co.uk

Annotation. With a chemogenetic approach based on yeast flavoprotein D-amino acid oxidase (DAAO) to generate hydrogen peroxide (H_2O_2) in CA1 pyramidal cells, we found that overproduction of H_2O_2 reduced LTP at CA3 to CA1 pyramidal cell synapses and reduced LTD at CCK+ interneuron to CA1 pyramidal cell synapses.

Key words: Hippocampus, LTP, LTD, H_2O_2 , Oxidative stress

ИНДУЦИРОВАННЫЙ СИНАПТОГЕНЕЗ В ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНАПТИЧЕСКИХ АДГЕЗИВНЫХ БЕЛКОВ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-172-174

Молодцова А. А., Носов Г. А.

ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Россия, Москва
ФГБУ «Федеральный Центр Мозга и Нейротехнологий»
ФМБА России, институт фундаментальной неврологии,
лаборатория нейротехнологий, Россия, Москва
nastya2001673@gmail.com, nosov.g@fccps.ru

Введение

Химический синапс состоит из пре- и постсинапса, связанных друг с другом в единое целое посредством белков синаптической адгезии. Более того, белки синаптической адгезии участвуют в индукции синаптогенеза. Показано, что экспрессия белков синаптической адгезии в не-нервных клетках может запускать формирование пре- или постсинапсов нейронами, в зависимости от типа адгезивных молекул (1—4). Нейрексыны и нейролигины — главные молекулы синаптической адгезии синапсах в мозге позвоночных.

Нейрексин-нейролигиновые взаимодействия помогают сформировать транс-синаптическую функциональную асимметрию, необходимую для стабилизации и поддержания нормальной передачи сигнала. При этом каждый из белков может инициировать формирование синапса: нейролигины запускают пресинаптическую дифференцировку, а нейрексыны — постсинаптическую.

Помимо их внеклеточного связывания друг с другом, нейрексыны и нейролигины внутриклеточно взаимодействуют с целой сетью адаптерных белков и каркасных структур, что, во взаимодействии с актиновым цитоскелетом, помогает правильно локализовать необходимые компоненты для осуществления синаптической передачи. Например, первый обнаруженный нейролигин (NLGN1), идентифицированный по его PDZ-домену, связанному с хорошо известным каркасным белком PSD95 в глутаматэргических синапсах, функционально связывает NMDA-рецепторы с локусом на постсинаптической мембране. Схожим образом другая изоформа ней-

ролигина (NLGN2) взаимодействует с каркасным белком гефирином, специфическим для ГАМК-эргических синапсов, и отвечает за активацию адаптерного синаптического белка коллибистина. Внутриклеточные взаимодействия нейрексынов не менее важны в осуществлении важнейших механизмов синаптической передачи. Как и нейролигины, нейрексыны обладают PDZ-доменом, связанным с кальций-кальмодулин-зависимой киназой. В дополнение к способности фосфорилировать саму себя и нейрексин, кальмодулин-зависимая киназа способствует взаимодействию между нейрексынами и актин-связывающими белками, обеспечивая прямую связь, посредством которой нейрексыны модулируют динамику цитоскелета, что, в конечном итоге, имеет важное значение для синаптической пластичности и стабильности. Нейрексин может также связывать синаптотамин, белок, встроенный в мембрану синаптических пузырьчков; помимо этого, он способствует связыванию с потенциал-зависимыми кальциевыми каналами, которые опосредуют ионный ток, необходимый для экзоцитоза нейротрансмиттеров. Таким образом, нейрексин и нейролигин координируют морфологические и функциональные аспекты синапса, что, в свою очередь, позволяет возникающим, незрелым контактам стабилизироваться в полноценные функциональные платформы для нейротрансмиссии.

Основной задачей этой работы является создание системы гетерологической индукции нейрогенеза посредством белков синаптической адгезии — нейрексынов и нейролигинов.

Материалы и методы

Получали первичную культуру гиппокампальных нейронов от эмбрионов мыши. Затем на 7 день культивирования (div) проводили заселение культуры нейронов клетками HEK293TN. На 8 DIV проводили избирательную трансфекцию клеток HEK293TN векторами для экспрессии рекомбинантных пресинаптических МКА *neurexin 1 alpha* или *neurexin 1 beta*, либо постсинаптическими *neuroligin 1 beta*, содержащих ha-tag. После чего проводили иммуоокрашивание и подготовку препаратов для микроскопии. Микроскопический анализ индукции синаптогенеза, а именно экспрессии клетками поверхностных пресинаптических белков *neurexin 1 alpha*, *neurexin 1 beta* и постсинаптических *neuroligin 1 beta* определяли посредством конфокальной микроскопии в клетках линий HEK293NT и первичной культуре мышечных гиппокампальных нейронов.

Результаты

Были получены молекулярно-генетические конструкторы для экспрессии пресинаптических (Neurexin 1 alpha, neurexin 1 beta) и постсинаптических (Neurologin 1 beta) адгезивных белков для экспрессии в клетках НЕК293ТН и мышечных астроцитах.

Конфокальная микроскопия показала высокий уровень экспрессии рекомбинантных адгезивных молекул в не-нервных клетках. При совместном культивировании не-нервных клеток с гиппокампулярными нейронами мыши, было подтверждено формирование синаптических контактов нейронов с не-нервными клетками.

Выводы

С использованием гетерологической клеточной системы были получены индуцированные синаптические контакты между нейронами и не-нервными клетками. Следующим этапом будет функционализация постсинаптических клеток путём экспрессии в них рецепторов нейромедиаторов.

Список литературы

1. Ushkaryov YA, Petrenko AG, Geppert M, Sudhof TC. Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science* 1992;257:50—56. DOI: 10.1126/science.1621094.
2. Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T. Neurologin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 2000;101:657—669. DOI: 10.1016/s0092—8674 (00)80877—6.
3. Tabuchi K, Sudhof TC. Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. *Genomics* 2002;79:849—859. DOI: 10.1006/geno.2002.6780.
4. Tabuchi K, Sudhof TC. Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. *Genomics* 2002;79:849—859. DOI: 10.1006/geno.2002.6780.
5. Squire, Larry R. *Encyclopedia of neuroscience*. 2009.
6. Zhang C., Atasoy D., Araç D., Yang X., Fucillo M. V., Robison A. J., Ko J., Brunger A. T., Südhof T. C. Neurexins physically and functionally interact with GABA (A) receptors. 2010.

УДК 616—073.524 (075.8)

БИОФОТОНИКА В РЕШЕНИИ ЗАДАЧ НЕВРОЛОГИИ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-175-179

Дунаев А. В.¹

¹ Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева, Орел, Россия
e-mail: dunaev@bmecenter.ru

Аннотация: Современные методы биофотоники обладают большим потенциалом при решении различных задач в неврологии, как диагностических, так и терапевтических. Показана эффективность мультимодального подхода при анализе параметров микроциркуляторно-тканевых систем при нейродегенеративных заболеваниях. Также продемонстрирована перспективность исследования механизмов воздействия прямой генерации синглетного кислорода на клетки мозга при фотобиомодуляции с применением длины волны 1267 нм.

Ключевые слова: биофотоника, микроциркуляторно-тканевые системы, нейродегенеративные заболевания, транскраниальный мониторинг, мониторинг сна, фотобиомодуляция, синглетный кислород.

Последние достижения в области технологий биофотоники, особенно применяемых на практике на основе мультимодального подхода, а также существенная роль микроциркуляторно-тканевых систем (МТС) организма в патогенезе различных заболеваний человека, привели к неуклонному росту интереса к проблемам неинвазивного исследования особенностей и нарушений периферического кровотока и связанного с ним метаболизма в тканях [1]. Функциональное состояние МТС оказывает влияние на развитие различных заболеваний головного мозга, поскольку функционально микроциркуляция крови тесно связана с деятельностью клеток нервной системы, и микроциркуляторные нарушения могут сопровождать или предшествовать потере нейронов при ряде нейродегенеративных заболеваний (НДЗ).

Регуляция мозгового кровотока и энергетического обмена, передача нервных импульсов и доставка кислорода к отделам головного мозга осуществляется в результате взаимодействия клеток нейроваскулярной единицы: нейронов, глиальных клеток (астро-

цитов) и микрососудов, в том числе выстилающих их внутреннюю поверхность эндотелиоцитов. Данное взаимодействие в специализированных зонах контактно опосредовано сложными электрическими и химическими стимулами, в которые вовлекаются множество нейромедиаторов (дофамин, норадреналин, NO, ионы Ca²⁺ и K⁺ и др.). Для выявления путей регуляции мозгового кровотока и оценки фармакологических препаратов в качестве нейропротекторов для защиты клеток мозга от повреждающих воздействий и предотвращения их гибели оценено влияние индуцированного адреналином кальциевого сигнала в астроцитах на изменение параметров МТС сосудов головного мозга. Регистрация параметров МТС сосудов головного мозга осуществлялась с применением экспериментальной установки мультимодальной оптической диагностики, реализующей методы флуоресцентной спектроскопии (с длиной волны возбуждения 455 нм) и видеокапилляроскопии, и фармакологической пробы в виде добавления адреналина. Исследования на срезах коры головного мозга взрослых крыс линии Wistar, содержащих неповреждённые разрезом сосуды, показали, что применение 1 мкмоль/л адреналина вызывало уменьшение диаметра кровеносных сосудов и наблюдалось преимущественно увеличение амплитуды сигнала флуоресценции ФАД. В то же время инкубация срезов с 20 мкмоль/л ингибитора моноаминоксидазы селегилина в течение 8—10 мин значительно снижала эффект адреналина на вазоконстрикцию, при этом изменений амплитуды сигнала флуоресценции не происходило. Учитывая влияние кальциевого сигнала на вазоконстрикцию, подавление кальциевого сигнала в астроцитах селегилином может быть наиболее возможным механизмом ингибирования вазоконстрикции сосудов головного мозга за счет предотвращения нерцепторного пути воздействия адреналина в результате его окислительного дезаминирования под влиянием моноаминоксидазы. Применение данного подхода для оценки вклада сосудистой компоненты является важным в неврологии при исследовании изменений параметров МТС сосудов головного мозга при НДЗ и оценке нейропротекторных свойств фармакологических препаратов для защиты клеток мозга от повреждающих воздействий и предотвращения их гибели при проведении клинических испытаний [2].

Также продемонстрирована перспективность применения лазерной спекл-контрастной визуализации (ЛСКВ) для транскраниального мониторинга лабораторного животного для исследований

физиологических механизмов регуляции микрокровотока (например, при воздействии фармпрепаратами). В настоящее время данный метод активно развивается и находит всё большее применение в медицине за счёт преимуществ в виде визуализации всей области исследования с высоким пространственным и временным разрешением. Кроме визуальной информации возможно регистрировать сигнал спекл-контраста во времени, что позволяет проводить спектральный анализ данных при помощи вейвлет-преобразования. Спекл-контраст в областях интереса усредняется и пересчитывается в ЛСКВ-перфузию для получения частотно-временных спектров сигнала — карт колебаний кровотока в частотных диапазонах, соответствующих регуляторной деятельности сердечных, дыхательных и миогенных механизмов [3]. Таким образом, применение данной технологии для визуализации церебральных кровеносных микрососудов позволяет установить, в каких регионах головного мозга лабораторного животного преобладают осцилляции различного диапазона, что открывает новые перспективы ЛСКВ в решении задач неврологии.

Кроме того, в портативном (носимом) варианте исполнения мультимодальных устройств биофотоники показаны возможности для исследования функционального состояния МТС (например, в области мозга) как при экстремальных условиях (невесомость), так и при длительном мониторинге сна (в сомнологии) [4].

Стоит отметить, что помимо применения в диагностике, в последнее десятилетие всё активнее развивается направление фотобиомодуляции, основанное на прямой генерации синглетного кислорода с помощью лазерного излучения с длиной волны 1267 нм, в том числе для задач нейробиологии [5]. Исследованиями показаны возможные механизмы воздействия прямой генерации синглетного кислорода на биоэнергетику клеток за счет увеличения эффективности продукции АТФ путем окислительного фосфорилирования, что может как защищать клетки при нейродегенеративных процессах (как, например, это показано в токсической модели болезни Альцгеймера, а также в наследственных формах болезни Паркинсона), так и способствовать регуляции их физиологической функции (например, продукции инсулина в организме животного). Кроме того, прямая генерация синглетного кислорода может служить инструментом селективного запуска апоптоза в раковых клетках за счет стимулирования открытия митохондриальной поры, которое не происходит в здоровых клетках [6].

Таким образом, современные методы биофотоники показывают высокий потенциал их применения в неврологии при решении как диагностических, так и терапевтических задач.

*Работа выполнена при поддержке гранта
Правительства Российской Федерации
№ 075—15—2022—1095.*

Список литературы

1. Мультимодальная оптическая диагностика микроциркуляторно-тканевых систем организма человека: монография/А. В. Дуняев. — Старый Оскол: ТНТ, 2022. — 440 с.: ил.
2. Novikova, I. et al. Adrenaline induces calcium signal in astrocytes and vasoconstriction via activation of monoamine oxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, 159, 15—22 (2020).
3. Golubova, N. et al. Time–frequency analysis of laser speckle contrast for transcranial assessment of cerebral blood flow. *Biomedical Signal Processing and Control*, 85, 104969 (2023).
4. Dunaev, A. V. Wearable Devices for Multimodal Optical Diagnostics of Microcirculatory-Tissue Systems: Application Experience in the Clinic and Space. *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, 9 (2), 1—10 (2023).
5. Sokolovski, S.G. et al. Singlet oxygen stimulates mitochondrial bioenergetics in brain cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 163, 306—313 (2021).
6. Novikova, I. et al. Laser-induced singlet oxygen selectively triggers oscillatory mitochondrial permeability transition and apoptosis in melanoma cell lines. *Life Sciences*, 304, 120720 (2022).

BIOPHOTONICS IN SOLVING THE PROBLEMS OF NEUROLOGY

Dunaev A. V.¹

¹Orel State University, Orel, Russia

Annotation. Modern methods of biophotonics have great potential for solving various problems in neurology, both diagnostic and therapeutic. The effectiveness of the multimodal approach in the analysis of the microcirculatory-

tissue system parameters in neurodegenerative diseases has been shown. The prospects of studying the mechanisms of the effect of direct generation of singlet oxygen on brain cells during photobiomodulation using a wavelength of 1267 nm have also been demonstrated.

Keywords: biophotonics, microcirculatory-tissue system, neurodegenerative diseases, transcranial monitoring, sleep monitoring, photobiomodulation, singlet oxygen.

ПОВЫШЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОРЕДОКСИНРЕДУКТАЗНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КАК ФАКТОР УСТОЙЧИВОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ К ХИМИОТЕРАПИИ

DOI 10.24412/CL-37124-2023-180-183

Кордюкова М. Ю.¹, Мещерякова В. И.², Пешкова Е. С.²,
Абакумова Т. О.², Белоусов В. В.^{1,2}

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва, Россия,

² Центр высокоточного редактирования и генетических технологий
для биомедицины РНИМУ им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия¹

e-mail: kordyukova.maria@yahoo.com

Аннотация: Было показано, что наиболее химиорезистентные стволовые клетки глиобластомы устойчивы также к окислительному стрессу и имеют повышенную активность тиоредоксиновой антиоксидантной системы. Ингибирование тиоредоксинредуктазы ауранофином сенсibiliзирует клетки к действию темозоломида.

Ключевые слова: стволовые клетки глиобластомы, химиорезистентность, тиоредоксинредуктазная антиоксидантная система

Глиобластома — опухоль головного мозга, характеризующаяся агрессивностью и резистентностью к лечению. Стандартное лечение глиобластомы включает в себя хирургическое удаление, лучевую и химиотерапию препаратом темозоломидом. Терапия вызывает окислительный стресс, приводящий к гибели преимущественно опухолевых клеток. Глиобластома характеризуется высокой резистентностью к химиотерапии. Одним из ключевых факторов резистентности раковых клеток к химиотерапии является повышение их устойчивости к окислительному стрессу [1]. Известно, что популяция стволовых клеток опухоли наиболее химиорезистентна и является движущей силой рецидивов [2]. Содержание активных форм кислорода в СКГ ниже чем в более дифференцированных клетках опухоли, несмотря на повышенную активность митохондрий [3].

Механизмы толерантности к окислительному стрессу стволовых клеток глиобластомы (СКГ) до сих пор не изучены. Известно, что клетки многих видов рака могут приобретать резистентность к терапии путём активации антиоксидантных систем, тиоредоксиновой и глутатионовой. Поэтому целью данной работы стало изучение редокс статуса СКГ и состояния антиоксидантных систем и выявление взаимосвязи этих параметров с устойчивостью первичных культур СКГ к химиотерапевтическим препаратам. для разработки подходов для преодоления их устойчивости к химиотерапии.

Для этого были получены первичные культуры СКГ из послеоперационного материала пациентов с диагнозом глиобластома. Было показано, что клетки культур положительно на маркеры стволовых клеток Sox2 и Nestin. Была определена чувствительность культур к основному химиотерапевтическому препарату темозоломиду, при этом полувзлетельная доза LC50 для разных линий СКГ довольно сильно варьировала — от 250 до 1725 μM .

Далее мы исследовали окислительно-восстановительный статус клеток и его корреляцию с устойчивостью к химиотерапии. Для этого мы определяли содержание основной активной формы кислорода — пероксида водорода (H_2O_2) с помощью генетически кодируемого сенсора к пероксиду водорода HyPer7 [4]. Было показано, что базовые значения содержания H_2O_2 одинаковы для всех культур. Чтобы изучить способность клеток противостоять окислительному стрессу, мы добавляли к клеткам H_2O_2 . При этом у большей части культур в клетках наблюдался ответ сенсора, содержание H_2O_2 в цитоплазме увеличивалось, однако для одной из культур — GBM10, ответа не наблюдалось. Это может говорить о повышенной активности антиоксидантных систем в клетках данной культуры. И действительно культура GBM10 показывала большую устойчивость к ингибитору тиоредоксинредуктазной антиоксидантной системы ауранофину, чем другие культуры. При этом клетки всех культур были чувствительны к действию ауранофина, хотя чувствительность сильно варьировала. После добавления ауранофина к клеткам GBM10 они приобретали способность отвечать на действие H_2O_2 , что подтверждает участие тиоредоксиновой системы в формировании устойчивости клеток к окислительному стрессу. Также мы напрямую измерили активность тиоредоксинредуктазы в лизатах СКГ и показали, что в клетках GBM10 активность была выше почти в три раза, чем в других линиях. Причем данная культура также была более устойчива к темозоломиду чем другие культуры.

Таким образом мы показали, что повышенная активность тиоредоксинредуктазной системы в клетках СКГ коррелирует с устойчивостью клеток к химиотерапии.

Далее мы выявили, что при совместном применении ауранофина в сублетальной дозе с темозоломидом в различных дозировках наблюдалось достоверное увеличение цитотоксического действия последнего для клеток GBM10, а также для других культур СКГ. Таким образом ауранофин сенсibiliзирует клетки культуры GBM10 а также других культур СКГ к действию темозоломида. При этом анализ полублетальных доз по методу [5] показал, что взаимодействие эти веществ носит синергетический характер, то есть они усиливают действие друг друга.

Также мы исследовали участвует ли глутатионовая система в защите СКГ от окислительного стресса. Мы показали, что ингибиторы глутатионовой системы BSO и эрастин не оказывали выраженный цитотоксический эффект на СКГ. С помощью сенсора Нупег7 было показано, что при инкубации клеток с ингибитором глутатионовой системы BSO не наблюдалось существенного увеличения содержания пероксида водорода в клетках. При этом в части линии при инкубации клеток с комбинацией BSO и ауранофина наблюдался больший уровень накопления пероксида водорода, чем при инкубации клеток с одним ауранофином. Эти линии также были более устойчивы к ауранофину и относились к мезенхимальному подтипу. Таким образом для этого типа клеток было показано участие глутатионовой системы в защите СКГ от окислительного стресса, однако в целом глутатионовая система не является ключевой для антиоксидантной защиты СКГ.

Таким образом мы показали, что одним из факторов повышенной химиорезистентности СКГ является усиление активности тиоредоксиновой системы. При этом некоторые типы СКГ используют также глутатионовую систему для защиты от окислительного стресса, однако она не является ключевой. Ингибитор тиоредоксинредуктазной системы ауранофин сенсibiliзирует СКГ к действию химиотерапии. Полученные данные о снижении резистентности СКГ к терапии под действием ауранофина могут служить основой для создания новых схем лечения глиобластомы.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ
(грант № 22—75—10151).*

Список литературы.

1. *Olivier C, Oliver L, Lalier L, Vallette FM.* Drug Resistance in Glioblastoma: The Two Faces of Oxidative Stress. *Front Mol Biosci.* 2021 Jan 27;7:620677.
2. *Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 2006 Dec 2;5:67.
3. *Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, Matsutani T, Masui K, Poulou M, Popescu R, Della Donna L, Evers P, Dekmezian C, Reue K, Christofk H, Mischel PS, Pajonk F.* Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Sep 20;108(38):16062—7.
4. *Pak V. V., Ezerina D., Lyublinskaya O. G. et al.* Ultrasensitive genetically encoded indicator for hydrogen peroxide identifies roles for the oxidant in cell migration and mitochondrial function // *Cell metabolism.* — 2020. — V. 31, № 3. — P.642—653
5. *Chou TC.* Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 2010 Jan 15;70(2):440—6.

INCREASED THIOREDOXINE REDUCTASE ANTIOXIDANT SYSTEM ACTIVITY AS A FACTOR IN GLIOBLASTOMA STEM CELL RESISTANCE TO CHEMOTHERAPY

**Kordyukova M. Yu.¹, Mescheryakova V. I.², Peshkova E. S.²,
Abakumova T. O.², Belousov V. V.^{1,2}**

¹ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia,

² Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, ³Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

e-mail: kordyukova.maria@yahoo.com

It has been shown that the most chemoresistant glioblastoma stem cells are also resistant to oxidative stress and have increased thioredoxin antioxidant system activity. Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin sensitizes cells to temozolomide.

МУЛЬТИОМИКСНЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ФЕРРОПТОЗА

DOI 10.24412/CL-37124-2023-184-187

Ледяева В. С.^{1*}, Сулягин В. К.¹, Корженевский Д. А.²,
Кудряшова О. М.², Шохина А. Г.^{1,2,3},

¹ Лаборатория экспериментальной онкологии НИИ трансляционной медицины
РНИМУ им. Н. И. Пирогова, 117997, Москва, Россия

² Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, 117997,
Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
РАН, 117997, Москва, Россия

*e-mail: *veronika.s.ledyaeva@gmail.com*

Аннотация: Ферроптоз был выделен как отдельный вид программируемой клеточной гибели на основании следующих характерных черт: зависимость от внутриклеточного железа и накопление продуктов перекисного окисления липидов [1]. Нарушение целостности клеточной мембраны, изменение редокс-статуса клетки, взаимодействие ферментных систем с образующимися свободными радикалами являются основными причинами гибели клеток. Установлено, что в гиппокампе пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, регистрируется повышенный уровень содержания железа и накопление активных форм кислорода [2, 3]. Есть основания полагать, что внутри ферроптоза, как фундаментального механизма клеточной гибели, можно выделить субмодальности: так, при индукции ферроптоза путем ингибирования синтеза глутатиона особенности и динамика постепенной гибели клеток отличны от той, что наблюдается при индукции ферроптоза путем ингибирования компонентов системы синтеза жирных кислот [4]. На данный момент существует ряд работ, указывающих, что мембранные белки отдельных клеточных компартментов, например, митохондрий, ЭПР или эндосом могут приносить специфический вклад в развитие ферроптоза. Анализ изменения профиля белковой экспрессии мембранных белков определенных клеточных компартментов в условиях индукции ферроптоза возможен при использовании методики proximity labelling, в основе которой лежит реакция биотинилирования близлежащих белков рекомбинантной аскорбатпероксидазой — APEX2 [5].

Ключевые слова: ферроптоз, GPX4, APEX2, протеомический анализ.

Целью данной работы является анализ изменений транскриптомного и протеомного профилей клеток при индукции ферроптоза генетически и различными химическими агентами. В качестве модельной использовали клеточную линию Pfa1 — 4-ОН-ТАМ-индуцибельные Gpx4^{-/-} иммортализованные мышечные фибробласты. Ферроптоз индуцировали внесением тамоксифена, приводящего к нокауту гена глутатионпероксидазы-4. Помимо тамоксифена для индукции ферроптоза использовали ML210, как селективный ингибитор GPX4, BSO — ингибитор биосинтеза глутатиона и эрастин — ингибитор транспортной системы х_c⁻, опосредующей регуляцию количества внутриклеточного цистеина. Анализ тотального протеома клеточной линии Pfa-1 проводили методом тандемной масс-спектрометрии. Для анализа выбрали три временные точки — 0, 24 и 48 часов после индукции ферроптоза. Для мониторинга изменений с помощью метода Proximity Labeling в белковой фракции мембран ЭПР и митохондрий при индукции ферроптоза создали и охарактеризовали модельные клеточные линии Pfa1-APEX2-ERM и Pfa-1-APEX2-MICU1, соответственно.

Клеточные линии, несущие APEX2, локализованный на внешней мембране ЭПР (Pfa1-APEX2-ERM) и в межмембранном пространстве митохондрий (Pfa1-APEX2-MICU1) получили с помощью лентивирусной трансдукции. В ходе моноклональной селекции отобрали по 6 клонов каждой клеточной линии. Оптимальный уровень экспрессии определили методом qRT-PCR, на основании полученных данных для дальнейшей работы выбрали по 1 клону каждой линии. Локализацию рекомбинантного белка в пределах митохондрий и ЭПР подтвердили методом иммуоцитохимии. Качественный анализ наличия белкового продукта APEX2 провели методом Western Blotting. Для подтверждения функциональной активности APEX2 в полученных клеточных линиях в культуральную среду PRMI1640 добавляли 1 мМ биотинфенола и 0,5 мМ H₂O₂ для индукции свободорадикальной реакции и функционального цикла биотинилирования близлежащих белков [5]. Результаты валидировали методом иммуоцитохимии с использованием конъюгатов нейтравидин-FITC, высокоаффинно связывающихся с биотиновой меткой, и методом Western Blotting с использованием конъюгата стрептавидин-HRP. Эффективность обогащения биотинилированных фракций мембранных белков выбранных клеточных компартментов проверили методом Western Blotting.

Анализ транскриптома и протеома клеточной линии Pfa1 в условиях индукции ферроптоза путем воздействия на разные компоненты цистеин/глутатион/Grx4 оси позволил выделить отдельные паттерны генов-ответчиков. Среди последних мы обнаружили как общие, так и специфические для определенных способов индукции ферроптоза. Полученные данные позволяют предположить, что воздействие на различные компоненты цистеин/глутатион/Grx4 оси активирует специфические внутриклеточные каскады, которые могут не совпадать для разных способов индукции, но в конечном счете приводят к одному результату — гибели клетки в ферроптозной модальности. Дальнейший анализ обогащенной фракции мембранных белков ЭПР и межмембранного пространства митохондрий позволит уточнить вклад данных внутриклеточных компартментов в процесс инициации ферроптоза.

Список литературы

1. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, Fulda S, Gascón S, Hatzios SK, Kagan VE, Noel K, Jiang X, Linkermann A, Murphy ME, Overholtzer M, Oyagi A, Pagnussat GC, Park J, Ran Q, Rosenfeld CS, Salnikow K, Tang D, Torti FM, Torti SV, Toyokuni S, Woerpel KA, Zhang DD. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*. 2017 Oct 5;171 (2):273–285.
2. Raven, E. P., Lu, P. H., Tishler, T. A., Heydari, P. & Bartzokis, G. Increased iron levels and decreased tissue integrity in hippocampus of Alzheimer's disease detected in vivo with magnetic resonance imaging. *J. Alzheimers Dis.* 37, 127–136 (2013).
3. Lane, D. J. R., Ayton, S. & Bush, A. I. Iron and Alzheimer's disease: an update on emerging mechanisms. *J. Alzheimers Dis.* 64, S379–S395 (2018).
4. Jiang, X., Stockwell, B. R. & Conrad, M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 266–282 (2021).
5. Hung, V., Udeshi, N., Lam, S. et al. Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nat Protoc* 11, 456–475 (2016).

MULTI-OMICS APPROACH TO THE STUDY OF MOLECULAR FEATURES OF FERROPTOSIS

Ledyayeva V. S.^{1*}, Sulyagin V. K.¹, Korzhenevsky D. A.², Kudryashova O. M.², Shokhina A. G.^{1,2,3}

¹ Laboratory of Experimental Oncology of the Pirogov National Research Institute of Translational Medicine, 117997, Moscow, Russia,

² Federal Center of Brain and Neurotechnologies of the FMBA of Russia, 117997, Moscow, Russia,

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry 117997, Moscow, Russia
e-mail: *veronika.s.ledyaeva@gmail.com

Annotation. Ferroptosis was defined as a form of programmed cell death based on the following features: dependence on intracellular iron and accumulation of lipid peroxidation products. There is reason to believe that within ferroptosis, as a fundamental mechanism of cell death, submodalities can be distinguished. At the moment, there are a number of studies indicating that membrane proteins of individual cell compartments are differ in contribution to ferroptosis. Analysis of membrane protein expression profile of certain cellular compartments under conditions of ferroptosis induction is possible using the proximity labeling technique, which is based on the biotinylation reaction of nearby proteins with recombinant ascorbate peroxidase APEX2.

The study focused on multi-omics analysis of ferroptosis induced in model cell line Pfa-1 and validation of APEX2 functional activity and localization within cells.

Key words: ferroptosis, GPX4, APEX2, proteomic analysis.

Электронное научное издание

**НЕЙРОКАМПУС 2023: ЭВОЛЮЦИЯ.
НЕЙРОТЕХНОЛОГИИ БУДУЩЕГО**

**тезисы участников конференции
(19-24 августа 2023г.)**

Текстовое электронное издание

*Разработано с помощью программного обеспечения
Microsoft Office Word, Adobe Acrobat Pro*

Издано в авторской редакции.

Компьютерная верстка *В.Р. Хованской*
Дизайн обложки *В.Р. Хованской*

Подписано к использованию 07.11.2023. Объем издания 3,2 Мб.
Гарнитура Minion Pro.

Издательство ООО «Квант Медиа»
125475, г. Москва, ул. Дыбенко, д. 26, корп. 3, к. 80
www.kvantmedia.ru