

«Разработка методов, технологий и платформ для исследований функционирования нервных систем на основе создания высокоразрешающей информационной модели кортикальных структур мозга»

В Университете Лобачевского продолжаются работы по созданию «3D Атлас нейроглии кортикальных колонок мозга крысы/мыши» (Соглашение о предоставлении субсидии №14.581.21.0016 с Минобрнауки России в рамках ФЦП «Исследования и разработки»).

3D Атлас представляет собой программный комплекс, способный заложить основу трансляционных исследований в области функционирования центральной нервной системы млекопитающих (нейробиологических, фармакологических, токсикологических и иных исследований), а также базу для формирования нового класса стратегических технологий – искусственных когнитивных систем.

Из списка ключевых работ, выполненных на 3 этапе можно выделить следующие:

1. Разработаны Программа и методики испытаний экспериментального образца набора реагентов для трансфекции астроцитов.

2. Проведены исследовательские испытания экспериментального образца набора реагентов для трансфекции астроцитов *in vivo* в соответствии с разработанной программой и методиками испытаний ЭО НРТА. ЭО НРТА включают в себя 5 различных генноинженерных аденовирусных вирусных вектора. Показана оптическая (по наличию флуоресцентных белков) и химическая (с помощью моноклональных антител к белкам вирусного капсида) визуализация экспрессии НРТА в клетках НЕК 293FT для 5 вирусных векторов, входящих в состав ЭО НРТА. Выполнена оценка цитотоксичности ЭО НРТА, показано, что в рекомендованных концентрациях компоненты ЭО НРТА не цитотоксичны. Выполнена оценка специфичности ЭО НРТА к дифференцированным астроцитам с помощью иммуноцитохимического окрашивания. Специфичность вирусных векторов, входящих в состав ЭО НРТА составила от 97 до 98,5%. Проведены исследовательские испытания экспрессии ЭО НРТА *in vivo*. Испытания показали соответствие ЭО НРТА требованиям п. 4.1.6 Технического задания. Также проведено сравнение эффективности трансфекции методом инъектирования вирусного препарата в кору больших полушарий животным в возрасте 3-4 недель и методом электропорации на поздних сроках гестации, ранних сроках постнатального развития.

Рисунок 1. Экспрессия флуоресцентных белков, кодируемых вирусными векторами, входящими в состав ЭО НРТА в первичных культурах астроцитов коры головного мозга, (а) культура, трансдуцированная AVV-sGFAP-ChR2-Venus; (б) – AVV-sGFAP-opto β 21AR-YGP; (в) – AVV-sGFAP-opto α 1AR-YGP; (г) – AVV-sGFAP-Case12-eGFP; (д) – AVV-sGFAP-DREADD-GFP, шкала 20 мкм

3. Проведено исследование изменений в α - и β -адренергических, пуринергических и G-белок зависимых сигнальных путях *in vitro* в трансфецированных генетическими конструкциями клетках. Показано, что трансдукция клеток с помощью генноинженерных

конструктов, входящих в состав ЭО НРТА вызывает изменения в ответе сигнальных путей на активацию инициирующих данные каскады рецепторов, что проявляется в различиях кальциевого ответа их активации в контрольных и трансфицированных культурах астроцитов коры головного мозга, что проявляется в изменениях кальциевой активности. Таким образом, экспрессия генноинженерных рецепторов астроцитами приводит к интенсификации метаболического ответа при активации соответствующих сигнальных путей с помощью агонистов исследуемых рецепторов.

В серии экспериментов по фотостимуляции было продемонстрировано, что все разработанные оптогенетические конструкты (AVV-GFAP-ChR2-Venus, AVV-sGFAP-opto α 1AR-YGP, AVV-sGFAP-opto β 21AR-YGP) при воздействии синего света способны активировать три соответствующих типа молекулярных сигнальных каскадов (α -адренергических, β -адренергических и G-белок зависимых), о чем свидетельствует изменение кальциевого гомеостаза клеток при проведении фотостимуляции. Проведенные исследования электрического ответа астроцитов, трансфицированных генноинженерными конструктами, входящими в состав ЭО НРТА, также подтвердили функциональную полноценность кодируемых разработанными вирусными векторами ионных каналов.

Рисунок 2. Изображение флуоресценции вирусного вектора AVV-sGFAP-opto β 21AR-YGP

4. Разработаны Программа и методики испытаний экспериментальных образцов трехмерной нейроглиальной культуры клеток.

5. Проведены исследовательские испытания ЭО ТНКК. Проведенные испытания подтвердили соответствие разработанных ЭО ТНКК требованиям п. 4.1.4 и 4.2.3 Технического задания. Показано, что структура (скелет) скаффолда имеет микро- и наноразмерную структуру, обеспечивающую формирование и развитие трёхмерной клеточной культуры скаффолдов. Цилиндры, из которых состояли скаффолды, имели линейные размерами: ширина стенок от 10 до 30 мкм, диаметр отверстия от 80 до 100 мкм, высота от 130 до 150 мкм. Внешний размер образцов исследованных скаффолдов составил от 1 мм *1 мм *1 мм до 4 мм *4 мм *4 мм. Показано, что типы культивируемых клеток – кортикальные нейроны и глия; соотношение нейронов и глии в 3D культуре от 1:5 до 1:7 соответственно; минимальная плотность клеток в трехмерной культуре составила не менее $1,2 \cdot 10^6$ клеток/см³, ЭО ТНКК сохраняли жизнеспособность не менее 80% на протяжении трех недель. Результаты испытаний синаптического контакта в ЭО ТНКК представлены в разделе 6. Показано, что глиальные клетки в составе ЭО ТНКК делятся, а также продемонстрирован положительный тест на наличие функционального астроцитарного синцития – проведена оптическая регистрация кальциевой активности. Таким образом, полученные при выполнении ПНИЭР ЭО ТНКК успешно выдержали испытания и соответствуют требованиям ТЗ.

Рисунок 3. Микрофотографии нейрон-глиальных культур клеток коры больших полушарий головного мозга, культивируемых на матриксе на основе аллилхитозана на 7 день культивирования.

6. Проведена оценка организации синаптического контакта в ТНКК. Показаны формирования полноценных синапсов *in vitro* в 3D культурах. Исследования показали, что формирование различных типов синаптических контактов в ЭО ТНКК происходит на несколько более поздних этапах онтогенеза культур, чем в двумерных нейрон-глиальных культурах. Разработан протокол оценки организации синаптического контакта в ТНКК.

7. Разработана методика определения роли астроцитов в синапсе и симуляции синапса и его физиологической активности на основе феноменологической модели синаптического контакта с учетом воздействия астроцита. Феноменологическая модель строилась на основе известных экспериментальных фактов астроцитарной регуляции активности нейронной сети. Анализ модели показал, что астроцит способен эффективно регулировать частоту генерации электрических сигналов в зависимости от состояния активности нейронной сети. А именно, подавление астроцитом передачи сигналов в синапсе действует для диапазона низких частот синаптических событий, а усиление на высоких частотах. Показано, что, кроме этого, активация астроцита может приводить к появлению бистабильности в динамике нейронной сети.

Рисунок 4. Схематическое изображение модели регулирования астроцитом синаптической передачи

Таким образом, поставленные задачи третьего этапа выполнены полностью, работы проведены на высоком научно-методическом уровне, соответствуют актуальным направлениям мировых исследований в данной области и требованиям проекта.

Требования Технического задания были выполнены в полном объеме.