ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2020, том 490, с. 24–26

УДК 577.25

ХЕМОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ КОРЫ ЮВЕНИЛЬНЫХ КРЫСЯТ СНИЖАЕТ ТРЕВОЖНОСТЬ

© 2020 г. Член-корреспондент РАН Н. Н. Дыгало[1,2,*], Д. А. Ланшаков[1], Н. П. Комышева[1], У. С. Дрозд[1,2], Е. В. Шабурова[1,2], Е. В. Сухарева[1,2], Г. Т. Шишкина[1]

Поступило 10.10.2019 г.
После доработки 10.10.2019 г.
Принято к публикации 10.10.2019 г.

С помощью хемогенетической активации глутаматергических нейронов префронтальной коры ювенильных крысят впервые установлено, что активация этих нейронов ослабляет проявления психоэмоциональной тревожности в ювенильный период онтогенеза. Этот результат свидетельствует о возможности целенаправленного управления активностью нейронов начиная с ранних этапов формирования головного мозга.

Ключевые слова: хемогенетика, префронтальная кора, глутаматергические нейроны, ювенильный период онтогенеза, тревожность

DOI: 10.31857/S2686738920010072

Возможности исследования и управления функциями мозга, в том числе и выявления участия конкретных нейронов и их ансамблей в регуляции психоэмоционального состояния, качественно расширились методами постгеномной нейробиологии. Один из таких методов – хемогенетика [1] – позволяет селективно изменять активность необходимых исследователю нейронов. Метод основан на экспрессии в желаемом типе нервных клеток новых для организма белков-рецепторов, воспринимающих необычную для организма химическую молекулу лиганда, связывающуюся с этим рецептором. При поступлении к клетке сигнала, воспринимаемого её новым рецептором, в зависимости от молекулярных особенностей рецептора частота разрядов нейрона повышается или, наоборот, снижается, что позволяет исследовать функции этих нейронов и выяснять возможность коррекции регулируемых ими систем и поведения. Так, недавно повышением с помощью этого подхода активности глутаматергических нейронов коры удалось улучшить психоэмоциональное состояние взрослых мышей [2]. Вместе с тем выполняют ли эти нейроны подобную функцию у ювенильных животных, нейронные сети психоэмоциональной регуляции которых ещё находятся в стадии формирования [3], остается неясным. Интерес к этому вопросу обусловлен критическими для последующей функции центральной нервной системы процессами формирования мозга [4], а также пиком начала проявления тревожных расстройств у людей [5] в ювенильный – подростковый период онтогенеза. В связи с этим целью работы явилось выяснение участия глутаматергических нейронов префронтальной коры в регуляции проявлений тревожности ювенильных животных путём хемогенетического управления их активностью в этот период онтогенеза.

Хемогенетический (Gq), активирующий нейрон, и контрольный (Egfp) AAVвекторы собирали на основе приобретенных в депозитарии Addgene (США) плазмид (pAAV-CaMKIIa-hM3D(Gq)-mCherry и pAAV-CaMKIIa-Egfp соответственно), как это описано ранее [6]. Экспрессия обоих векторов управляется специфичным для глутаматергических нейронов промотором CaMKIIa. В экспериментах использовали крыс линии Вистар с соблюдением правил гуманного обращения с экспериментальными животными (приказ № 755 Министерства здравоохранения СССР от 12 августа 1977 г.). Двухдневным крысятам стереотаксически под холодовым наркозом в префронтальную кору каждого полушария вводили по 10^9 AAV частиц в объёме 1 мкл со скоростью 0.3 мкл/мин. Дополнительную контрольную группу составляли интактные животные. Группы из восьми крысят мужского пола вскармливались самками до

[1] *Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской Академии наук, Новосибирск, Россия*

[2] *Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*

**e-mail: dygalo@bionet.nsc.ru*

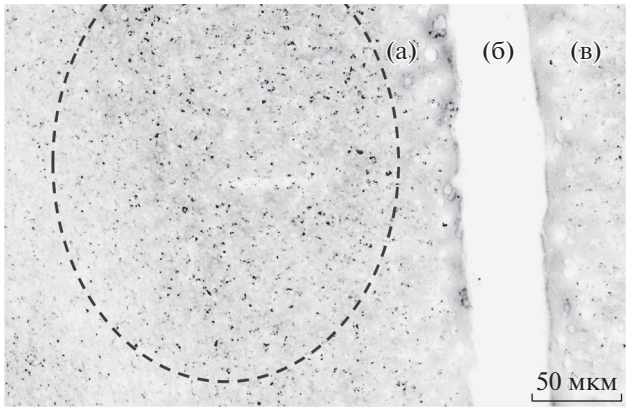

Рис. 1. Репрезентативная микрофотография экспрессии хемогенетического AAV вектора (pAAV-CaMKIIa-hM3D(Gq)-mCherry – чёрная зернистость) в основной области его распространения (штриховой овал) в префронтальной коре правого полушария – а, б – межполушарное пространство, в – левое полушарие, в которое также вводили этот AAV вектор.

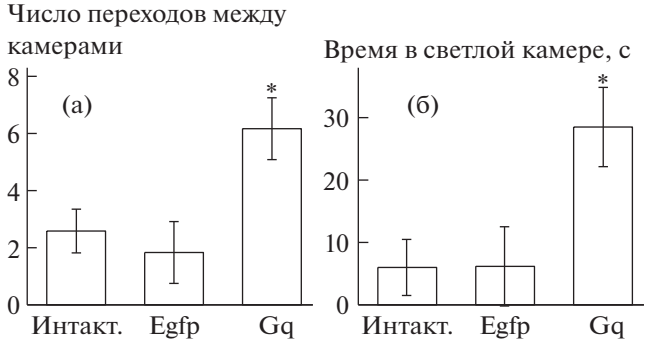

Рис. 2. Поведенческие проявления ослабления психоэмоциональной тревожности в тесте светлая/темная камера в результате хемогенетической активации глутаматергических нейронов префронтальной коры ювенильных крыс. а – число переходов между камерами, б – время нахождения в светлой камере. Интакт. – + физиол. раствор; Egfp + CNO; Gq – DREADD + CNO. * $p < 0.05$ с группами, не экспрессирующими DREADD.

22-дневного возраста. Далее животных содержали по четыре особи в клетке в течение восьми дней до истечения в сумме четырёх недель от введения AAV в мозг, времени, необходимого для наработки белков, кодируемых вектором в трансфицированных клетках [6].

В ювенильном возрасте (1 месяц) животным с неонатальным введением в кору вектора Gq, кодирующего хемогенетический дизайнерский рецептор, активируемый исключительно дизайнерским препаратом DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs), или контрольного вектора с последовательностью, кодирующей лишь флуоресцентный белок (Egfp), внутрибрюшинно вводили синтетический активирующий лиганд этого DREADD – Clozapine-N-oxide (CNO, Tocris, Англия) в дозе 3 мг/кг в объёме 0.5 мг/мл. Животным интактной группы (Интакт.) вводили эквивалентный объём физиологического раствора. Через 30 мин после введения препаратов животных помещали в центр светлой камеры тестовой установки, состоящей из двух камер (30 × 30 × 30 см каждая): одна – освещённая белая, а другая – тёмная чёрная, совмещённых по боковой грани, в центре которой имеется прилегающее к полу полуовальное отверстие, позволяющее животному свободно переходить из камеры в камеру. В течение 5 мин теста видеорегистрировали поведение животных.

Последующим анализом видеозаписей тестов эксперты, не знакомые с воздействиями, примененными к животным, определяли число переходов крысят между камерами, а также продолжительность их нахождения в светлой камере, воспринимаемой животными как угрожающая обстановка, степень избегания которой является общепринятым показателем проявления тревожности [7]. После завершения теста животных в состоянии глубокого наркоза транскардиально перфузировали, выделяли головной мозг и приготавливали срезы для выявления в нейронах префронтальной коры экспрессии векторов по флуоресценции содержащихся в их составе светящихся белков, как описано ранее [8].

Микрофотография, представленная на рис. 1, является первым свидетельством возможности получения заметного уровня экспрессии в коре ювенильных крысят хемогенетического рецептора после введения AAV вектора, кодирующего DREADD, в мозг неонатальных животных.

Достигнутый уровень экспрессии DREADD оказался достаточным для обусловленного хемогенетической активацией глутаматергических нейронов префронтальной коры снижения тревожности ювенильных животных. У крысят группы Gq, экспрессирующих DREADDs, активирующие глутаматергические нейроны их префронтальной коры после внутрибрюшинного введения CNO, число переходов между камерами (рис. 2а, $F(2, 21) = 4.259$; $p < 0.028$), свидетельствующее о большем числе выходов в опасную в восприятии животных светлую камеру, а также продолжительность нахождения в этой камере (рис. 2б, $F(2, 21) = 4.098$; $p < 0.031$) были значительно выше по сравнению с обеими контрольными группами. Животные с неонатальным введением в мозг AAV вектора, кодирующего лишь флуоресцентный белок Egfp, и получавшие перед тестом внутрибрюшинные инъекции CNO не различались по обоим показателям тревожности от интактных крысят, которым вместо CNO вводили физиологический раствор. Следовательно, ни введение вектора в мозг, ни лиганд DREADD сами по себе на поведение животных не влияли.

Формирование, извлечение, модификация и стирание связанных со страхом воспоминаний регулируются сетью переднего мозга в составе префронтальной коры, миндалины и гиппокампа. Эти регионы претерпевают в подростковом возрасте серьёзные онтогенетические изменения структур и функций. Клинические наблюдения свидетельствуют, что нервные процессы, лежащие в основе подавления чувства страха, временно, но серьезно ослаблены в подростковом возрасте [5]. Результаты данной работы свидетельствуют о "нормальной", такой же, как и у взрослых животных [2] функции глутаматергических нейронов префронтальной коры ювенильных крысят в регуляции тревожности. Очевидно, причины возрастных проявлений этого психоэмоционального состояния могут определяться онтогенетическими особенностями функций миндалины и гиппокампа. Кроме этого, отсутствие видимых негативных эффектов введения AAV векторов в неонатальный мозг так же, как и показанная безопасность доставки AAV в мозг взрослых людей [9], позволяет надеяться на уже обсуждаемые [10] возможности применения хемогенетики в клинике.

В целом результаты работы свидетельствуют, что активность глутаматергических нейронов префронтальной коры способна снижать проявления тревожности в ювенильный период еще до завершения онтогенетического формирования нейронной сети психоэмоциональной регуляции.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 19–15–00093.

ДЕКЛАРАЦИЯ О КОНФЛИКТЕ ИНТЕРЕСОВ

Все авторы декларируют отсутствие каких-либо конфликтов интересов, связанных с рукописью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sternson S.M., Roth B.L.* Chemogenetic Tools to Interrogate Brain Fnctions // Annu. Rev. Neurosci. 2014. V. 37. P. 387–407. https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-014048
2. *Yun S., et al.* Stimulation of Entorhinal Cortex-Dentate Gyrus Circuitry is Antidepressive // Nat. Med. 2018. V. 24. P. 658–666. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0002-1
3. *Selleck R.A., et al.* Limited Prefrontal Cortical Regulation over the Basolateral Amygdala in Adolescent Rats // Sci. rep. 2018. V. 8. 17 171. https://doi.org/10.1038/s41598-018-35649-0
4. *Spear L.P.* The Adolescent Brain and Age-Related Behavioral Manifestations // Neurosci. Biobehav. Rev. 2000. V. 24. P. 417–463. https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00014-2
5. *Zimmermann K.S., Richardson R., Baker K.D.* Maturational Changes in Prefrontal and Amygdala Circuits in Adolescence: Implications for Understanding Fear Inhibition during a Vulnerable Period of Development // Brain sci. 2019. V. 9(3). pii: E65. https://doi.org/10.3390/brainsci9030065
6. *Lanshakov D.A., Drozd U.S., Dygalo N.N.* Optogenetic Stimulation Increases Level of Antiapoptotic Protein Bcl-xL in Neurons // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. P. 340–344. https://doi.org/10.1134/S0006297917030129
7. *Bourin M., Hascoët M.* The mouse light/dark box test // Eur. J. Pharmacol. 2003. V. 463(1-3). P. 55-65. https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01274-3
8. *Lanshakov D.A., Sukhareva E.V., Kalinina T.S., Dygalo N.N.* Dexamethasone-Induced Acute Excitotoxic Cell Death in the Developing bBain // Neurobiol. dis. 2016. V. 91. P. 1–9. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.02.009
9. *Chtarto A., et al.* A Next Step in Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Therapy for neurological Diseases: Regulation and Targeting // Br. J. Clin. Pharmacol. 2013. V. 76(2). P. 217-232. https://doi.org/10.1111/bcp.12065
10. *Lieb A., Weston M., Kullmann D.M.* Designer Receptor Technology for the Treatment of Epilepsy // EBioMedicine. 2019. V. 43. P. 641–649. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.059

CHEMOGENETIC ACTIVATION OF GLUTAMATERGIC NEURONS IN THE JUVENILE RAT CORTEX REDUCES ANXIETY

Corresponding Member of the RAS N. N. Dygalo[a,b,#], D. A. Lanshakov[a], N. P. Komysheva[a], U. S. Drozd[a,b], E. V. Shaburova[a,b], E. V. Sukhareva[a,b], and G. T. Shishkina[a]

[a] *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

[b] *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation*

[#] *e-mail: dygalo@bionet.nsc.ru*

Chemogenetic activation of glutamatergic neurons of the prefrontal cortex reduces the manifestations of psychoemotional anxiety during the juvenile period of ontogenesis. This result is the first evidence of feasibility of targeted chemogenetic control of neuronal activity during the early stages of brain development.

Keywords: chemogenetics, prefrontal cortex, glutamatergic neurons, juvenile period of ontogenesis, anxiety