

Сведения о выполненных работах в 2019 году
по проекту «**Неинвазивная визуализация естественного и
индуцированного нейрогенеза**», поддержанному Российским научным фондом
Соглашение № 18-15-00229

Руководитель д-р биол. наук Ходанович Марина Юрьевна

В течение второго года выполнения проекта, в соответствии с планом работ на 2019 год, была проведена апробация методики визуализации нейрогенеза в мозге взрослых животных *ex vivo* и *in vivo* с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ), проведены исследования специфичности генетических векторов в отношении молодых нейронов и перекрестной специфичности с нервными клетками других фенотипов (взрослых нейронов, астроцитов, микроглии), а также сопоставление результатов МРТ и иммуногистохимических исследований.

Были разработаны протоколы сканирования для визуализации экспрессии ферритина в мозге грызунов. На первом этапе для исследований *ex vivo* использовался клинический томограф Philips 1.5T (МРТ Лидер, Томск). Протокол включал T2- и T2*-взвешенные импульсные последовательности, которые были оптимизированы с целью повышения чувствительности скана к ферритину, улучшения соотношения сигнал-шум и пространственного разрешения изображений, и сокращения времени сканирования. Время сканирования мозга *ex vivo* после оптимизации составило 75 минут. Получено приемлемое качество изображения на клиническом томографе, что позволило детектировать экспрессию ферритина и нейрогенез в мозге крыс.

На втором этапе для визуализации ферритина в мозге грызунов *in vivo* использовался сверхвысокопольный томограф Bruker Biospec 11.7T (ИЦиГ, г. Новосибирск).

Из-за неисправности томографа эксперименты были начаты только в ноябре 2019 года. На начальном этапе экспериментов количество первоначально выбранных импульсных последовательностей было сокращено с 5 до 3, оптимизированы их параметры для получения изображений более высокого качества. Оптимизированный протокол включал в себя следующие импульсные последовательности:

- 1) T2-MSME-PD – T2-взвешенная последовательность множественное эхо.
- 2) T2 TURBO RARE – T2-взвешенная последовательность турбо спин-эхо.
- 3) T2* MGE – T2*-взвешенная последовательность множественное градиентное эхо.

Для проведения МРТ исследований для визуализации ферритина здоровым лабораторным животным проводилось внутримозговое введение вирусных векторов, сконструированных в первый год работы над проектом, в частности:

- 1) Аденоассоциированный вирус, несущий кодирующую последовательность ферритина под контролем промотора даблкортина (AAV-DCX-FerrH);
- 2) Аденоассоциированный вирус, несущий кодирующую последовательность зеленого флюоресцентного протеина eGFP под контролем промотора даблкортина (AAV-DCX-eGFP);
- 3) Lentivirus, несущий кодирующие последовательности ферритина и eGFP под контролем промотора даблкортина (LV-DCX-eGFP-T2A-FerrH);
- 4) Lentivirus, несущий кодирующие последовательности ферритина и eGFP под контролем цитомегаловирусного промотора (LV-CMV-eGFP-T2A-FerrH);
- 5) Lentivirus, не несущий генов для экспрессии («пустой вектор», LV-empty).

Используемые вирусные вектора на основе лентивирусов (LV) и аденоассоциированных вирусов (AAV) содержат кодирующую последовательность белка ферритина (Ferr), накапливающего железо, что делает возможным визуализацию генетически-модифицированных клеток при помощи МРТ и иммуногистохимическим методом, с помощью антител к ферриту. Дополнительным контролем экспрессии генов является встроенная последовательность зеленого флюоресцентного белка (eGFP), который хорошо визуализируется флуоресцентной микроскопией без окрашивания.

Генетический вектор каждого типа вводили в перивентрикулярную зону мозга крыс в объеме 2 мкл с концентрацией порядка 10^8 вирусных частиц на 1 мл.

МРТ сканирование *ex vivo* проводилось на 14 день после введения векторов.

Для визуализации ферритина *in vivo* в мозге крыс МРТ сканирование проводилось до введения векторов, а также на 1-й, 3-й, 7-й, 14-й, 21-й и 30-й день после интрацеребральной инъекции.

В результате *ex vivo* и *in vivo* МРТ исследований были получены изображения, на которых хорошо визуализируется место инъекции вирусного вектора на уровне коры мозга. На изображениях T2, полученных *ex vivo*, заметно снижение интенсивности МРТ сигнала в нейрогенной субвентрикулярной зоне обоих полушарий на 14-й день после введения AAV-DCX-Ferr, а также в субвентрикулярной зоне полушария, ипсилатерального относительно микроинъекции, после введения LV-CMV-eGFP-T2A-FerrH. Это свидетельствует об экспрессии ферритина после введения вирусных векторов AAV-DCX-Ferr и LV-CMV-eGFP-T2A-FerrH. Однако качество изображения T2*, основного с точки зрения детектирования накопления железа, получаемое на томографе Philips Acheiva 1.5T, было недостаточно для получения четкого сигнала ферритина. Повышение напряженности магнитного поля с 1.5T до 11.7T и более высокий градиент магнитного поля приводили к значительному улучшению качества изображений, повышению отношения сигнал-шум, улучшению пространственного и временного разрешения изображений и, самое важное, позволяло проводить

неинвазивные исследования мозга крыс во множественных временных точках после введения вирусных векторов и отслеживать динамику изменения МРТ сигнала вследствие распространения и миграции экспрессируемых репортеров.

На всех полученных изображениях *in vivo* хорошо визуализируется место инъекции вирусного вектора в правом полушарии на уровне коры мозга, а также, в ряде случаев, в месте предполагаемом сверхэкспрессии ферритина в нейрогенной субвентрикулярной зоне. Использование T2-взвешенных импульсных последовательностей позволяет визуализировать зону воспаления, прилегающую к месту инъекции.

По результатам экспериментов на томографе Bruker Biospec 11.7T наиболее четкая картина экспрессии гена-репортера ферритина наблюдается после введения аденоассоциированного вектора с промотером DCX (AAV-DCX-Ferr). Так, на изображениях T2-MSME-PD и T2*-MGE визуализируется гипоинтенсивность сигнала непосредственно над мозолистым телом, в нейрогенной субвентрикулярной зоне. Зоны гипоинтенсивности МРТ сигнала также наблюдаются в зоне стриатума непосредственно под местом инъекции. Эта картина полностью согласуется с результатами исследований на томографе Philips Achieva 1.5T. После введения лентивирусного вектора LV-DCX-GFP-Ferr также наблюдалось снижение интенсивности МРТ сигнала на T2 и T2* взвешенных изображениях в зоне мозолистого тела, расположенного непосредственно под местом инъекции. При введении контрольного вектора AAV-DCX-GFP затемнения зоны стриатума не наблюдалось, что подтверждает специфичность гипоинтенсивного (темного) сигнала, связанного именно с накоплением ферритина в зоне нейрогенеза. После введения лентивируса с промотером CMV, не специфичному к молодым нейронам (LV-CMV-GFP-Ferr), зоны затемнения наблюдались в подкорковой области над мозолистым телом, причем в как в правом полушарии, куда производилась инъекция, так и в коллатеральном левом полушарии. Планируемые иммуногистохимические исследования мозга помогут определить, связано ли это изменения МРТ сигнала в данных зонах мозга с экспрессией ферритина.

Было сделано 24 операции по ведению вирусных векторов для оценки их специфичности к молодым нейронам и перекрестной специфичности в отношении других нервных клеток. Для этого на срезах мозга экспериментальных животных была исследована колокализация eGFP и ферритина с маркером молодых нейронов белком даблкортином (DCX), а также с маркерами зрелых нейронов (маркер NeuN), астроцитов (маркер GFAP) и микроглии (маркер Iba1). Иммуноокрашивание белков ферритина и флуоресценция eGFP на срезах мозга показало, что инъекция всех векторов вызывает в нейрогенной субвентрикулярной зоне вблизи бокового желудочка экспрессию соответствующих генов-репортеров. Анализ колокализации ферритина с даблкортином показал, что после заражения вектором AAV-DCX-FerrH доля молодых нейронов, экспрессирующих ферритин, высока и составляет в среднем 90,7 % на третьи сутки и 93.5 % на 14 сутки после введения вектора. Для векторов

LV-DCX-eGFP-T2A-FerrH и LV-CMV-eGFP-T2A-FerrH доля молодых нейронов составляет 63,3 % и 62,9 % на третьи сутки и 63,8 % и 63,2% на 14 сутки соответственно. В тоже время для вектора AAV-DCX-FerrH на 14 сутки после введения наблюдается значительное количество астроцитов, экспрессирующих ферритин.

Таким образом, эффективность аденоассоциированного вируса AAV-DCX-FerrH была выше как в целом, так и с точки зрения синтеза белка ферритина в молодых нейронах. Однако специфичность в отношении молодых нейронов выше для лентивирусов. Кроме того, индукция синтеза ферритина лентивирусными векторами не изменяется в зависимости от используемого промотора. Вероятно, полученный эффект связан с тем, что лентивирус включается только в делящиеся клетки, к которым относятся молодые нейроны, в то время как аденоассоциированный вирус заражает все клетки, в том числе неделящиеся.

Доля зараженных векторами зрелых нейронов, астроцитов и микроглиальных клеток в целом очень небольшая (около 10-15%). Учитывая площадь субвентрикулярной зоны на срезах и относительно остальных структур мозга, плотность экспрессирующих ферритин нейронов, астроцитов и микроглиальных клеток меньше плотности ферритина в субвентрикулярной зоне в десятки раз.

По результатам проведенных исследований по сопоставлению МРТ и иммуногистохимических экспериментальных данных, приводятся результаты линейного регрессионного анализа данных, полученных *ex vivo* на томографе Philips Achieva 1.5T. Значимая корреляция между изменением интенсивности МРТ сигнала и плотностью экспрессирующих ферритин клеток в этой зоне ($r = 0.75$, $p = 0.02$, $R^2 = 0.56$) позволяет гистологически валидировать выявленную гипоинтенсивность сигнала на T2-взвешенных изображениях. По результатам второго года выполнения проекта можно сформулировать ряд заключений:

1) Визуализирован и гистологически валидирован нейрогенез после внутримозгового введения генетических векторов AAV-DCX-Ferr и LV-CMV-eGFP-Ferr в исследованиях *ex vivo* на основе T2-взвешенных изображений, полученных на томографе Philips 1.5T.

2) Предварительные результаты, полученные в МРТ исследовании на сверхвысокопольном томографе Bruker BioSpec 11.7T при использовании T2*-взвешенных импульсных последовательностей показали четкую визуализацию экспрессии ферритина в нейрогенных зонах мозга крыс при введении AAV-DCX-Ferr.

3) Введение аденоассоциированного вирусного вектора со специфическим промотором DCX вызывает эффективное заражение субвентрикулярной зоны, что дает четко визуализируемый сигнал ферритина на МРТ изображениях. Однако ферритин также экспрессируется и в других типах нервных клеток, включая астроциты, что снижает специфичность данного вектора.

4) Для визуализации нейрогенеза с помощью введения векторов на основе лентивируса необходимо точное попадание вектора в субвентрикулярную зону и решение проблемы с отдельной экспрессией eGFP и ферритина.

5) Длительности наблюдения 14 суток недостаточно для визуализации всего пути миграции молодых нейронов в обонятельную луковицу. Неинвазивные исследования с использованием сверхвысокопольного сканера 11.7Т будут продолжены до 30 суток наблюдения с последующим иммуногистохимическим анализом срезов мозга.