

Сведения о выполненных работах в 2020 году
по проекту «**Неинвазивная визуализация естественного и
индуцированного нейрогенеза**», поддержанному Российским научным фондом
Соглашение № 18-15-00229

Руководитель Ходанович Марина Юрьевна, д-р биол. наук

В 2020 отчетном году перед проведением основной запланированной масштабной серии экспериментов, посвященной МРТ визуализации нейрогенеза в условиях локальной ишемии мозга, детально проанализировали данные проведенной в 2019 году серии экспериментов с введением генетических векторов интактным животным. Результаты МРТ исследований, полученных на сверхвысокопольном сканере 11.7Т, показали перспективность введения векторов на основе аденоассоциированных вирусов (AAV-DCX-eGFP и AAV-DCX-FerrH), предназначенных для экспрессии генов-репортеров ферритина и eGFP в молодых нейронах. Неожиданным результатом стало подтверждение высокого уровня экспрессии eGFP и вызываемая им гипоинтенсивность МРТ сигнала на T2*-взвешенных изображениях для вектора AAV-pDCX-eGFP, не несущего ферритина в качестве трансгена. Необходимо было дальнейшее исследование данного феномена. На основе полученных результатов было заключено, что длительности наблюдения 14 суток, особенно в отношении лентивирусов, недостаточно для визуализации динамики изменений экспрессии генов-репортеров и миграции молодых нейронов. Поэтому для следующей серии МРТ исследований срок наблюдения был увеличен до 28 суток после введения векторов.

Дополнительно, для подтверждения экспрессии ферритина методом RT-PCR, в 2020 году была проведена серия исследований (n = 20) с введением в мозг векторов на основе аденоассоциированных вирусов и лентивирусов. Данные RT-PCR показали значимо более высокую экспрессию ферритина в corpus callosum и caudoputamen в левом полушарии головного мозга крысы на 7-й день после интрацеребрального введения AAV-pDCX-FerrH. Экспрессия ферритина увеличена в более чем 100 раз по сравнению с теми же структурами коллатерального полушария мозга, а также в сравнении с контрольной (интактной) группой. В то же время введение LV-pDCX-eGFP-T2a-FerrH не вызывало значимое повышение экспрессии ферритина в ипсилатеральном полушарии по сравнению с контралатеральном на этих сроках наблюдения. Эти результаты согласуются с данными МРТ и иммуногистохимии: области гипоинтенсивности сигнала T2* и экспрессии ферритина на флуоресцентно окрашенных микрофотографиях у крыс, которым вводили AAV-pDCX-FerrH, располагались в caudoputamen вблизи corpus callosum и зоны SVZ левого полушария.

Для основной серии экспериментов, запланированных на 2020 год, первоначально была проведена оптимизация параметров монофиламента для достижения нужного объема ишемического очага в стандартной модели инсульта – временной окклюзии средней мозговой артерии (МСаО). Исследование показало, что длина силиконового наконечника монофиламента при моделировании локальной ишемии у крыс существенно влияет на объем ишемического поражения, выживаемость животных и

выраженность неврологического дефицита. Объем ишемического очага оценивался на МРТ по T2-взвешенным изображениям, восстановление кровотока – с помощью МР ангиографии. Было показано, что сочетание МСАО с другими процедурами, включая интрацеребральные инъекции и наркотизацию при МРТ сканировании, возможно при моделировании подкоркового ишемического поражения среднего объема, с использованием наконечника филамента 5 мм для животных весом 360-490 г. По результатам опубликована научная статья (Кудабаева М.С., Акулов А.Е., Пищелко А.О., Светлик М.В., Ходанович М.Ю. Оптимизация параметров монофиламента при моделировании локальной ишемии мозга у крыс //В сборнике: Высокие технологии и инновации в науке: сборник избранных статей Международной научной конференции. Санкт-Петербург, 2020. С. 17-19. doi: 10.37539/VT187.2020.38.57.004).

Основной эксперимент был проведен на 42 взрослых крысах-самцах линии Sprague-Dawley (300–350 г). Часть экспериментальных животных (n = 21) подверглись временной ишемии головного мозга с использованием модели окклюзии средней мозговой артерии (МСАО); часть животных (n = 21) составили группу ложнооперированного контроля. Локальная ишемия головного мозга достигалась путем временной окклюзии средней мозговой артерии (МСАО).

У всех животных, подвергнутых МСАО, развивались обширные поражения мозга в областях, кровоснабжаемых средней мозговой артерией. Ишемический очаг, расположенный в caudoputamen и neocortex, четко идентифицировался как области повышения интенсивности МРТ сигнала на T2-, T2*- и диффузионно-взвешенных изображениях (DWI). После введения вирусных векторов для экспрессии генов-репортеров наблюдалось выраженное снижение интенсивности МРТ сигнала в зоне, расположенной около левого бокового желудочка и SVZ, начиная с 7-го дня после инъекции векторов. Эта гипоинтенсивность стала более выраженной на 14, 21 и 28 день после введения. Инъекция PBS не вызвала изменений МРТ сигнала. В группах FerrH-МСАО и eGFP-МСАО были отчетливо видны две зоны гипоинтенсивности в мозге крыс: одна зона рядом с левым боковым желудочком и SVZ, другая - внутри ишемического очага. Иммуногистохимическое исследование классифицировало клетки, экспрессирующие ферритин и eGFP вблизи бокового желудочка и SVZ как молодые и зрелые нейроны, а в районе ишемического очага – как макрофаги либо активированную микроглию. Количественная оценка МРТ сигнала в зонах гипоинтенсивности вблизи SVZ показала различия в динамике сигнала между ишемическим (ипсилатеральным) и неповрежденным (контралатеральным) полушариями на T2- и T2*-взвешенных изображениях. Значения T2 в ипсилатеральном полушарии значительно не изменились в течение всего периода наблюдений (1 месяц) в группах FerrH-МСАО и eGFP-МСАО. Напротив, интенсивность сигнала вблизи SVZ на T2*-взвешенных изображениях значительно снижались, начиная с 7-го дня после инъекции AAV-pDCX-eGFP и с 14-го дня после инъекции AAV-pDCX-FerrH, что говорит о накоплении генов-репортеров вблизи нейрогенной зоны после МСАО. Снижение интенсивности T2* в зоне около бокового желудочка составило $21,06 \pm 2,65$ % (группа FerrH-МСАО) и $17,70 \pm 1,64$ % (группа eGFP-МСАО) на 28-е сутки после инъекции вируса после ишемии и $19,93 \pm 5,94$ %.

(группа FerrH-Sham) и $21,53 \pm 7,07$ % (группа eGFP-Sham) после ложной операции в группе контроля без ишемии. Интенсивность сигнала в контралатеральном полушарии значимо не изменилась.

Иммуногистохимическое исследование мозга после последнего MPT сканирования и окрашивание по Перлсу выявило зоны накопления железа в области ишемического поражения во всех группах, независимо от типа инъекции, FerrH, eGFP и PBS. Клетки, накапливающие железо, были локализованы с зонами накопления макрофагов в ишемическом очаге. За пределами области ишемического очага накопление железа было обнаружено около бокового желудочка и SVZ, но только у животных, которым вводили AAV-pDCX-FerrH. Клетки с накоплением железа в этой зоне были слегка вытянутой формы и в дальнейшем были идентифицированы как нейроны последующим иммуногистохимическим исследованием. В других исследуемых группах накопление железа вне ишемического очага не наблюдалось. У животных в группе FerrH-MCAO основная часть ферритин-экспрессирующих нейронов располагалась вблизи бокового желудочка и SVZ, и только небольшое количество нейронов было обнаружено внутри ишемического поражения. В контрольной группе PBS-MCAO также наблюдалась зона гипоинтенсивности MPT сигнала в ишемическом очаге и было обнаружено накопление макрофагов в области поражения.

Количество зрелых нейронов, экспрессирующих ферритин, в зоне, прилегающей к SVZ, была ниже по сравнению с плотностью зрелых нейронов, экспрессирующих eGFP. eGFP-положительные нейроны образовывали большие сети около бокового желудочка и SVZ, небольшое количество eGFP-положительных зрелых нейронов было также обнаружено внутри зоны ишемического поражения. Важно, что значительное количество eGFP-положительных зрелых нейронов было обнаружено в обонятельной луковице как у животных после MCAO, так и у животных с ложной операцией, что указывает на их миграцию в эту зону по известному ростральному миграционному пути (RMS) и подтверждает, что наше исследование визуализирует известные процессы миграции молодых нейронов с помощью MPT.

Взаимосвязь между изменением интенсивности T2* сигнала и нормированной интенсивности флуоресценции (IF) ферритина и eGFP в одних и тех же областях мозга крыс оценивалась с помощью линейного регрессионного анализа. Статистически значимая корреляция между интенсивностью T2* сигнала и IF FerrH была обнаружена для зоны вблизи SVZ ($r = 0.83$, $r^2 = 0.70$, $p = 0.04$) и ишемического очага ($r = 0.79$, $r^2 = 0.62$, $p = 0.01$). Корреляция между процентными изменениями интенсивности сигнала T2* и IF eGFP была близка к значимой ($r = 0.75$, $r^2 = 0.57$, $p = 0.08$).

Введение векторов на основе лентивирусов, LV-pDCX-eGFP-T2a-FerrH, LV-pCMV-eGFP-T2a-FerrH и LV-pCMVeGFP также вызывало выраженную гипоинтенсивность на T2*-взвешенных изображениях (до 60 % в зоне около SVZ и до 40 % в зоне ишемического очага). Однако, как прояснили последующие иммуногистохимические исследования, большую часть клеток, экспрессирующих ферритин и eGFP составляет активированная микроглия\макрофаги (от 60 до 85 %), причем, даже в нейрогенной зоне вблизи SVZ, как в группах с моделированием

ишемии, так и у ложнооперированных животных. Процент зараженных молодых и зрелых нейронов в этой зоне был значимо меньше (в среднем 25-30 %), чем процент макрофагов. В то же время мы обнаружили, что количество колокализированных с ферритином и eGFP молодых нейронов при введении тканеспецифического вектора LV-pDCX-eGFP-T2a-FerrH значимо выше в сравнении с введением векторов с неспецифическим промотором во всех исследуемых группах и зонах, что подтверждает специфичность заражения молодых нейронов данным генетическим вектором.

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало возможность долговременной визуализации естественного и индуцированного ишемией нейрогенеза *in vivo* с помощью МРТ с применением генов-репортеров, экспрессируемых под промотором даблкортина. Уникальной особенностью настоящего исследования является комбинация МРТ маркеров и флуоресцентной визуализации молодых нейронов.

Основные выводы настоящего исследования:

1. Наши результаты показали, что мозг крысы можно успешно инфицировать вирусными векторами AAV-pDCX-FerrH и AAV-pDCX-eGFP для экспрессии ферритина или eGFP. Оба вектора вызывали 20%-ное снижение интенсивности сигнала в областях около SVZ на T2*-взвешенных МРТ изображениях через месяц после внутривенной инъекции вирусных векторов.

2. Расположение областей гипоинтенсивности сигнала, вызванного введением AAV-pDCX-FerrH и AAV-pDCX-eGFP, совпадает с зонами накопления ферритина и eGFP на иммуногистохимических препаратах и зонами накопления железа при окрашивании по Перлсу через месяц после введения вирусов. Данные RT-PCR подтвердили повышенную экспрессию ферритина в corpus callosum и caudoputamen в ипсилатеральном полушарии мозга крысы на 7-й день после внутримозгового введения векторов на основе аденоассоциированных вирусов.

3. Введение векторов на основе лентивирусов LV-pDCX-eGFP-T2a-FerrH, LV-pCMV-eGFP-T2a-FerrH и LV-pCMV-eGFP также вызывает гипоинтенсивность сигнала T2* на МРТ и экспрессию ферритина и eGFP согласно иммуногистохимическим исследованиям. Эта экспрессия менее выражена по сравнению с векторами на основе аденоассоциированных вирусов, поскольку RT-ПЦР анализ ее не зафиксировал, и наблюдается на фоне воспалительного ответа.

4. Генетический вектор LV-pDCX-eGFP-T2a-FerrH с тканеспецифическим промотором показывает значимо большую экспрессию ферритина и eGFP в молодых нейронах по сравнению с лентивирусными векторами с неспецифическим цитомегаловирусным промотором, в особенности, в условиях усиленного нейрогенеза при ишемическом поражении.

5. Основным источником гипоинтенсивности сигнала вблизи зон SVZ в группах AAV-pDCX-FerrH и AAV-pDCX-eGFP являются молодые и зрелые нейроны. Основным источником гипоинтенсивности сигнала вблизи зон SVZ в группах LV-pDCX-eGFP-T2a-FerrH, LV-pCMV-eGFP-T2a-FerrH и LV-pCMVeGFP являются макрофаги.

6. Основным источником гипоинтенсивности сигнала T2* в области ишемического поражения во всех группах, которым вводили вирусные вектора или PBS, являются макрофаги.

Результаты данного исследования были опубликованы в специальном выпуске журнала *International Journal of Molecular Science*, посвященному нейрогенезу (Khodanvich MY, et al. Tissue-specific ferritin- and GFP-based genetic vectors visualize neurons by MRI in the intact and post-ischemic rat brain. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):E8951. doi: 10.3390/ijms21238951. PMID: 33255702).

Исследование выявило также ряд вопросов, требующих дальнейших исследований. Первый вопрос - специфичность сигнала МРТ для молодых нейронов. Несмотря на первоначальное намерение маркировать молодые нейроны с помощью промотора DCX, процент молодых нейронов, меченных FerrN или eGFP, обнаруженных вблизи бокового желудочка (зона SVZ головного мозга крысы), был небольшим по сравнению с гораздо большим количеством зрелых нейронов в здоровом мозге. Было показано увеличение процента молодых нейронов у животных после МСАО, что согласуется с результатами других исследований, показывающих увеличение продукции новых нейронов после ишемии. Другое объяснение может заключаться в пластичности нейронов. Существует вероятность, что молодые нейроны, которые изначально были инфицированы трансгенами ферритина или eGFP, непрерывно экспрессировали эти белки даже после созревания. Кроме того, нельзя исключить возможность вторичной трансфекции зрелых клеток.

Во-вторых, зоны гипоинтенсивности были обнаружены не только вблизи SVZ в головном мозге крысы, но и внутри ишемического очага, что связано с накоплением макрофагов в области поражения. Окрашивание по Перлсу показало накопление железа в макрофагах, что подтверждается литературными данными, показывающими, что ключевыми метаболическими задачами макрофагов являются утилизация фрагментов погибших клеток и детоксикация свободного железа. Это вызывает дополнительные вопросы относительно специфичности гипоинтенсивности МРТ сигнала и дифференциация сигнала от живых клеток, экспрессирующих гены-репортеры от макрофагов, метаболизирующих богатые железом клетки. Выявленная нами специфичность T2* (в отличие от T2) для визуализации макрофагов в ишемическом очаге может быть использована в клинике для детекции воспаления.

В-третьих, неожиданным результатом стала гипоинтенсивность МРТ сигнала на T2*-взвешенных изображениях от клеток, экспрессирующих eGFP, причем величина изменения сигнала была сравнима с векторами, вызывающими экспрессию ферритина. eGFP - широко используемый флуоресцентный маркер, который легко идентифицировать на тканевых слайдах *ex vivo* или в живых клетках, однако экспрессия eGFP никогда не рассматривалась в качестве МРТ маркера. Необходимы дальнейшие исследования eGFP в качестве МРТ репортера.