

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(ИБР РАН)

УДК 577.25

Рег. № ГЗ 0108-2018-0011

Рег. № НИОКТР АААА-А18-118041690140-1



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
д-р биол. наук, чл.-корр. РАН

А.В. Васильев

«10» декабря 2018 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ФОРМИРОВАНИЕ МЕДИАТОРНОГО РАЗНООБРАЗИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ
НЕРВНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

по Программе Президиума РАН № 42

«Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий»

(заключительный отчет)

Руководитель НИР,
главный научн. сотр.,
д-р биол. наук

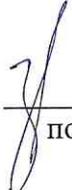

10.12.2018
подпись, дата

И.С. Захаров

Москва 2018

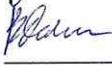
СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, главный научный
сотрудник, доктор биологических наук,


10.12.2018
подпись, дата

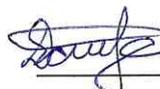
И.С. Захаров

Исполнители:
ведущий научный сотрудник, доктор
биологических наук


10.12.2018
подпись, дата

В.Е. Дьяконова

Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук


10.12.2018
подпись, дата

Д.В. Богуславский

Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук


10.12.2018
подпись, дата

Д.Д. Воронцов

Научный сотрудник, кандидат
биологических наук


10.12.18.
подпись, дата

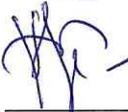
Э.Б. Дашинимаев

Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук


10.12.2018
подпись, дата

Т.И. Дьяконова

Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук


10.12.2018
подпись, дата

Т.А. Коршунова

Главный научный сотрудник, доктор
биологических наук


10.12.2018
подпись, дата

Д.А. Сахаров

Научный сотрудник, кандидат
биологических наук


10.12.2018
подпись, дата

К.К. Сухинич

Научный сотрудник, кандидат
биологических наук


10.12.2018
подпись, дата

И.А. Чистопольский

Нормоконтроль, ведущий научный
сотрудник, кандидат биологических наук


подпись, дата
10.12.2018

Е.Б. Абрамова

РЕФЕРАТ

Отчёт 33 с., 1 разд., 8 рис., 4 таб., источников -20, публикаций по теме – 6.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА, НЕЙРОНЫ, МЕХАНИЗМЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ, ГЕТЕРОХИМИЧЕСКИЕ АНСАМБЛИ, ИММУНОГИСТОХИМИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР, ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ

Цель проекта – выяснить закономерности формирования многообразия медиаторных фенотипов в культуре нервной ткани, полученной из ИПС клеток человека и разработать фармакологический подход к регуляции направления развития гетерохимической популяции нервных клеток. Эти результаты позволят более эффективно использовать клеточные культуры для моделирования заболеваний человека и подходы к компенсации нарушений при трансплантации ткани в поврежденные структуры нервной системы.

В данном исследовании использовались IPS-KYOU – линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, полученная в лаборатории Синъе Яманаки. (Линия IPS-KYOU была приобретена в клеточной банке ATCC (США), и IPS-DYP0730 – линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с трисомной 21-й хромосомой. (Линия IPS-DYP0730 была приобретена в клеточной банке ATCC (США).

Культура индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) IPS-KYOU использовалась в данной работе как базовая культура клеток, из которой были получены методом дифференцировки все остальные культуры и типы клеток. Линия IPS-KYOU была направлена в нейральную дифференцировку методом DUAL SMAD ингибирования, при помощи коммерческого набора Neural Induction Medium (PSC Neural Induction Medium, Life Technologies). Культивируя клетки в течение 4 пассажей, удалось получить однородную культуру нейральных стволовых клеток, которые пролиферировали далее на среде для культивирования нейрональных прогениторных клеток NPM (neural progenitor media) в течении нескольких пассажей (до 10). Терминальная дифференцировка нейральных стволовых клеток была достигнута при помощи обогащенной питательной среды N2B27 без ростовых факторов индукторов пролиферации (bFGF и EGF) и посадки клеток на пластик в низкой плотности, не более $20 \cdot 10^3$ клеток/см².

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	6
1. ВВЕДЕНИЕ	6
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	9
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	14
3.1. Проведение направленной дифференцировки ИПСК в нейральном направлении	14
3.2 Транскриптомный анализ экспрессии генов	19
3.3. Проведение направленной дифференцировки ИПСК в нейральном направлении с активным кальциевым индикатором	23
3.4. Модельные эксперименты	25
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	27
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	29
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ ЗА 2018 ГОД	31

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

ИПС-клетки - индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

РНК – рибонуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РВС – фосфатный буфер

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 ВВЕДЕНИЕ

Одно из перспективных направлений развития медицины связано с использованием тканеспецифических клеток из стволовых или дедифференцированных клеток. В отношении манипуляций с нервной тканью в медицинских целях наметился прорыв в разработке экспериментальных подходов несколько позднее, чем в других областях [1,2, 3, 4, 5, 6]. Одной из существенных проблем, стоящих перед всеми подходами, связанными с использованием нервных клеток и их предшественников, состоит в том, что для функционирования нейрона критически важны его индивидуальные свойства. Нервная система гетерогенна по своей природе. Даже морфологически сходные клетки, лежащие в слоистых структурах мозга различаются не только электрическими свойствами, морфологическими связями, но и набором медиаторов и рецепторов к ним.

Базовым функциональным элементом нервной системы, имеющим эндогенную активность можно считать гетерохимический ансамбль клеток [7]. Фенотипическое разнообразие в нервной ткани является ее качественной особенностью. В естественных условиях формирование фенотипических свойств нейрона в значительной степени определяется актуальной гетерохимической межклеточной средой (нишей), в которой оказываются клетки-предшественники (например, [5, 8, 9]). Эта среда, в свою очередь, является результатом секреции разных сигнальных молекул уже существующими клеточными структурами.

Несмотря на то, что о значении гетерохимической природы нервных клеток для функций нервной системы говорится уже со времен Х.С. Коштыянца, до сих пор не ясны механизмы и правила формирования такого фенотипического многообразия. Интересно, что при развитии нервной ткани в культуре из эмбриональных клеток, спонтанно формирующиеся аналоги (модели) тканевых структур (нейросферы, органоиды и т.д.), имеют в своем составе клетки многообразных фенотипов. Это заставляет искать механизмы такой дивергенции развития нервных клеток, а также способы управления фенотипическим разнообразием клеток. Это важно исследователям и для моделирования нарушений развития ткани (нейродегенеративные заболевания, болезнь Паркинсона, болезнь Дауна и т.д.) и для поиска компенсаций таких нарушений работы мозга через пересадки нервной ткани.

Как модель для выяснения фундаментальных закономерностей формирования гетерохимичности в нервной системе представляются особенно интересными клеточные культуры, полученные направленной дифференцировкой из индуцированных

плюрипотентных стволовых клеток человека. Особенность таких культур состоит в том, что вся предшествующая история генома соматических клеток, которые становятся предшественниками нервных клеток, не связана напрямую с механизмами дифференцировки нервной ткани. Это дает надежду обнаружить в экспериментах на таких клетках фундаментальные механизмы фенотипических дивергенций развивающихся нервных клеток.

По мере накопления феноменологии спонтанно возникающих гетерохимических ансамблей нейронов в стандартных условиях и при внесении изменений в медиаторном составе среды, а также получения информации о состоянии активности клеточных ассоциаций (с использованием кальциевого имаджинга), потребуется дополнительный инструментарий для анализа закономерностей и механизмов наблюдаемых в культуре процессов. С этой целью мы предполагаем использовать инструменты и подходы, развиваемые нами в смежных областях нейробиологии. В частности, при исследовании участия изменения уровня экспрессии нейронспецифических генов в механизмах переключения работы центральных генераторов паттернов в онтогенезе нервной системы на модельных животных – моллюсках [10, 11], а также на математических моделях [12] Подходы к математическому моделированию химических взаимодействий между нейронами, образующими мультитрансмиттерные сети, и к построению нейронных ансамблей с устойчивой ритмической активностью были предложены авторами ранее [12] в совместных исследованиях с коллегами из ИПУ РАН. Важными чертами развиваемого подхода является учет информационной роли трансмиттерных взаимодействий между нейронами. Необходимость этого все чаще отмечается в литературе [13], но не имеет до сих пор адекватной формализации. В наших исследованиях объектом моделирования является нейронный ансамбль: множество нейронов, находящееся в едином внеклеточном пространстве, в котором содержатся различные нейротрансмиттеры. Мы полагаем, что использование такого рода исследований поможет выявлению закономерностей формирования спонтанно активных гетерохимических ансамблей в культуре клеток.

Цель всего проекта – выяснить закономерности формирования многообразия медиаторных фенотипов в культуре нервной ткани, полученной из ИПС клеток человека и разработать фармакологический подход к регуляции направления развития гетерохимической популяции нервных клеток. Эти результаты позволят более эффективно использовать клеточные культуры для моделирования заболеваний человека и подходы к компенсации нарушений при трансплантации ткани в поврежденные структуры нервной системы.

В рамках этой цели проект предусматривает решение следующих задач:

1) В опытах *in vitro* исследовать динамику развития и самоорганизации транмиттерных фенотипов в культуре нервной ткани, полученной из ИПС клеток человека. Для этого предполагается проводить иммунохимическое окрашивание на основные медиаторы и гибридизацию *in situ*.

2) Исследовать влияние стрессирующих факторов на состояние генома нервных клеток в системе.

3) Теоретически и практически обосновать применение нейротрансммиттерных смесей в терапевтических целях.

На 2018 год планировалось:

- освоение методов создания и поддержания культуры нервной ткани из ИПС клеток человека от разных доноров;

- описание и подтверждение нейрональной природы исследуемых клеток при помощи нескольких независимых методов;

- описание гетерохимических фенотипов и популяций нейронов различных типов, возникающих при стандартных условиях нейральной дифференцировки ИПС клеток.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

- Ламинар (Labconco, Logic+ Class II, Type A2 Biosafety Cabinet),
- центрифуги (Eppendorf, Centrifuge 5810R с ротором для 96-луночных планшетов, Centrifuge MiniSpin Plus),
 - амплификатор для ПЦР в реальном времени (Applied Biosystems, 7500 Real-time PCR System),
 - амплификатор (Bio-Rad, C1000 Touch),
 - твердотельный термостат (BioSan, CH-100),
 - спектрофотометр (Implen, P360),
 - запечатыватель плат для ПЦР (Bio-Rad, PX1 PCR Plate Sealer),

Реактивы и расходные материалы

- «RNeasy Micro Kit» (Cat# 74004), «Qiagen»;
- «RNase free DNase Set» (Cat# 79254), «Qiagen»;
- РНазин (Cat# RNI0100), «Силекс»;
- «Обратная транскриптаза MMLV» (Cat# SK022), «Евроген»;
- «qPCRmix-HS SYBR+LowROX» (Cat# PK156L), «Евроген»;
- Этанол абсолютизированный;
- Вода, свободная от нуклеаз (Cat# 129114), «Qiagen».
- 96-луночные тонкостенные планшеты для ПЦР (Cat# SSI-3400-00), Ахуген;
- Крышки для 96-луночного планшета для ПЦР (Cat# PCR-2CP-LP-FLT-C), Ахуген;
- Тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл (Cat# PCR-02-C), Ахуген;
- Тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,5 мл (Cat# PCR-05-C), Ахуген;
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл (Cat# MCT-150-C), Ахуген;
- Наконечники для дозаторов 10 мкл (Cat# 4110), Corning;
- Наконечники универсальные для дозаторов объемом 200 мкл (Cat# T-200-Y-R), Ахуген;
- Наконечники для дозаторов объемом до 1000 мкл (Cat# T-1000-B-R), Ахуген.

Клеточные культуры

IPS-KYOU – линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, полученная в лаборатории Синъе Яманаки (университет г. Киото, Япония), путем

введения генов репрограммирующих факторов Oct4, Sox2, c-Мус, KLF4 в фибробласты кожи взрослого человека. Линия IPS-KYOU была приобретена в клеточной банке ATCC (США).

IPS-DYP0730 – линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с трисомной 21-й хромосомой. Линия IPS-DYP0730 была приобретена в клеточной банке ATCC (США).

Количественный ОТ-ПЦР в реальном времени

Тотальная РНК была выделена с использованием RNeasy Mini Kit (Qiagen, № 74106) с применением ДНК-нуклеазы (Qiagen, № 79254) в соответствии с инструкциями производителя. Обратную транскрипцию выполняли с использованием набора MMLV RT Kit (Evrogen, # SK021) и олиго (dT)-15 праймеров. В каждую реакцию обратной транскрипции добавляли 1 мкг тотальной РНК. ПЦР в реальном времени проводили с использованием готовой реакционной смеси qPCRMix-HS-SYBR + Low Rox (Evrogen, # PK156L) и ПЦР-амплификатора CFX96 (Bio-Rad). Температурный профиль реакции:

- 1) +95° С в течение 10 мин,
- 2) 40 циклов +95° С в течение 15с и +60°С в течение 1 мин,
- 3) анализ кривой плавления между +60 и +95° С.

Последовательности использованных праймеров приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1. - Последовательности использованных праймеров

№	Ген	Последовательность 5' ->3'
1.	SOX1	АТАСТGGAGACGAACGCCG
		ССТСТCGCCTCGTTTTGACT
2.	TUJ1	CCGAAGCCAGCAGTGTCTAA
		AAGACAGAGACAGGAGCAGC
3.	MUSASH1	GGGACTCAGTTGGCAGACTAC
		СТGGTCCATGAAAGTGACGAA
4.	MAPT	TTTGGTGGTGGTTAGAGATATGC
		CCGAGGTGCGTGAAGAAATG
5.	MAP2	СТCAGCACCGCTAACAGAGG
		CATTGGCGCTTCGGACAAG
6.	REEP5	ACTGCATGACTGACCTTCTGG
		AGTCCGATGACACCAAGAGC
7.	GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC
		GGCATGGACTGTGGTCATGAG

8.	HMBS	GGCAATGCGGCTGCAA
		GGGTACCCACGCGAATCAC
9.	C1ORF43	ACGCCTTTCAAGGGTGTACG
		CAAAGACCCCTGTCCCATAGC

В данном исследовании нами были рассмотрены несколько генов домашнего хозяйства REEP5, GAPDH, HMBS, C1orf43 для нормировки результатов ОТ-ПЦР. С помощью алгоритма geNorm мы установили, что гены GAPDH и C1orf43 демонстрируют наиболее стабильную экспрессию в изучаемых клеточных культурах (получены следующие значения для параметра оценки стабильности экспрессии M: GAPDH – 0.59, C1orf43 – 0.59, REEP5 – 1.18, HMBS – 1.88). Для нормировки результатов ПЦР в конечном итоге мы использовали два гена: GAPDH и C1orf43.

Иммуноцитохимическое окрашивание клеточных препаратов

Перед окрашиванием клетки промывали PBS и затем фиксировали в течение 15 мин в 4% параформальдегиде при комнатной температуре (22°C - 24°C). Затем культуры трижды промывали в PBS (5 мин при комнатной температуре), инкубировали с первичными антителами в блокирующем растворе (PBS с 10% FBS и 0,1% Tryton-X-100) в течение ночи (16-18 часов) при +4°C, промывали снова 3 раза и инкубировали с соответствующими вторичными антителами (Goat Anti-Chicken IgY H&L (Alexa Fluor® 488), Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594), Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488).) (разведенные в блок растворе в соотношении 1: 800, Molecular Probes) в течение 1 часа при 37°C. После этого ядра клеток контрастировали при помощи красителя DAPI (1 мг/мл в PBS). Изображения были получены с использованием флуоресцентного микроскопа (EVOS FL AUTO, Life Technologies и Keyence BZ-9000E). Первичные антитела приведены в таблице 2.

Таблица 2. 2. - Используемые в работе первичные антитела.

№	Антиген	Производитель	Животное	Разведение
1.	Oct4	Millipore	mouse	1/200
2.	Sox2	Millipore	mouse	1/200
3.	SSEA4	Abcam	mouse	1/100
4.	TRA-1-60	Abcam	mouse	1/100
5.	Nestin	Millipore	mouse	1/200
6.	Pax6	Millipore	mouse	1/200
7.	Tuj1	Millipore	mouse	1/100
8.	hNCAM	Abcam	rabbit	1/100
9.	SYN1	Abcam	rabbit	1/200
10.	SYP	Abcam	rabbit	1/200
11.	VE-Cadherin	Abcam	rabbit	1/200
12.	PECAM-1	Abcam	rabbit	1/200
13.	L Glutamate	Abcam	chicken	1/100
14.	Acetylcholine	Abcam	rabbit	1/300
15.	GABA A Receptor beta 3	Abcam	mouse	1/100
16.	NeuN	Abcam	rabbit	1/300
17.	Doublecortin	Abcam	rabbit	1/500
18.	synaptophysin	Abcam	rabbit	1/300
19.	Beta-III tubulin	Abcam	rabbit	1/300

Транскриптомный анализ экспрессии генов

Всего было получено 8 различных культур нейронов, от разных, генетически не связанных доноров. При помощи высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS) на приборе Illumina HiSeq4000 был сделан анализ транскриптома (RNA-

seq) каждой культуры (парноконцевые прочтения x 150 п.о, 75-100 млн прочтений на один образец). В результате были оценены уровни экспрессии генов ферментов синтеза и мишеней (рецепторов) следующих сигнальных молекул: глутамат, ГАМК, глицин, ацетилхолин, серотонин, дофамин, оксид азота.

Исследования на моделях

Важными чертами развиваемого в содружестве с математиками ИПУ РАН подхода к моделированию микросообществ нервных клеток, генерирующих паттерн активности, являются учет информационной роли транзиттерных взаимодействий между нейронами и использование характерных для информатики дискретных методов опирающихся на методы нелинейной динамики [12]. Нейроны обладают одним из трех заданных типов электрической активности: осциллирующий, тонический и реактивный. Осциллятор способен периодически генерировать пачку спайков. Реактивный нейрон активируется только за счет внешних возбуждающих воздействий. Тонический нейрон активен постоянно, если его не тормозят. Таким образом, осцилляторы и тонические нейроны обладают эндогенной активностью. Информационными входами нейрона являются рецепторы, каждый из которых чувствителен к одному транзиттеру. Система функционирует в непрерывном времени, в котором происходят события. Событием считается: 1) момент изменения состояния нейрона (переход из активного состояния в пассивное и наоборот); 2) дискретное изменение концентрации в ВКП (включая появление и исчезновение) существовавшего транзиттера. Задача состоит в разработке программы, которая реализует алгоритм, построенный на этой модели.

Важной составляющей дополнительных исследований являются эксперименты с реальными генераторами паттернов поведения модельных объектов нейробиологии – моллюсков. Мы меняем функциональное состояние животного путем нанесения стрессирующих воздействий или голодания, что приводит к переключению поведения. А затем оцениваем уровни экспрессии известных нам генов, включенных в регуляцию этих видов поведения и активность нервных клеток, включенных в соответствующие генераторы паттернов поведения.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Проведение направленной дифференцировки ИПСК в нейральном направлении.

Культура индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) IPS-KYOU была приобретена нами в клеточном банке ATCC и использовалась в данной работе как базовая культура клеток из которой были получены методом дифференцировки все остальные культуры и типы клеток. Линия IPS-KYOU была направлена нами в нейральную дифференцировку методом DUAL SMAD ингибирования, при помощи коммерческого набора Neural Induction Medium (PSC Neural Induction Medium, Life Technologies). Культивируя клетки в течении 4 пассажей, удалось получить однородную культуру нейральных стволовых клеток, которая пролиферировала далее на среде для культивирования нейрональных прогениторных клеток NPM (neural progenitor media) в течении нескольких пассажей (до 10). Далее культура нейральных стволовых клеток NS-KYOU была подвергнута терминальной дифференцировке с получением зрелых нейронов. Терминальная дифференцировка нейральных стволовых клеток была достигнута при помощи обогащенной питательной среды N2B27 без ростовых факторов индукторов пролиферации (bFGF и EGF) и посадки клеток на пластик в низкой плотности, не более 20*10³ клеток/см². Клетки далее культивировали в течении 14 дней, после чего культуры нейронов были охарактеризованы при помощи ИЦХ анализа по наличию маркеров зрелых нейронов, некоторых нейромедиаторов и рецепторов: Tuj1, hNCAM, Syn I, SYP, L Glutamate, Acetylcholine, GABA A Receptor beta 3, NeuN, Doublecortin, synaptophysin, Beta-III tubulin.

Иммуногистохимическое исследование подтверждает нейрональную природу полученных клеток NS-KYOU на 5 пассаже от начала дифференцировки. В культуре обнаруживаются незрелые нейроны, имеющие положительную иммуногистохимическую реакцию на Doublecortin и beta-III tubulin (Рисунок 3.1 и 3.2). Стоит отметить, что клетки формируют розетки, связанные между собой отростками. Наличие зрелых нейронов было подтверждено с помощью характерных маркеров synaptophysin и NeuN (Рисунок 3.3 и 3.4). Анализ показал, что в клетках синтезируются такие нейромедиаторы, как глутамат и ацетилхолин, а также рецептор к ГАМК (Рисунок 3.5, 3.6 и 3.7).

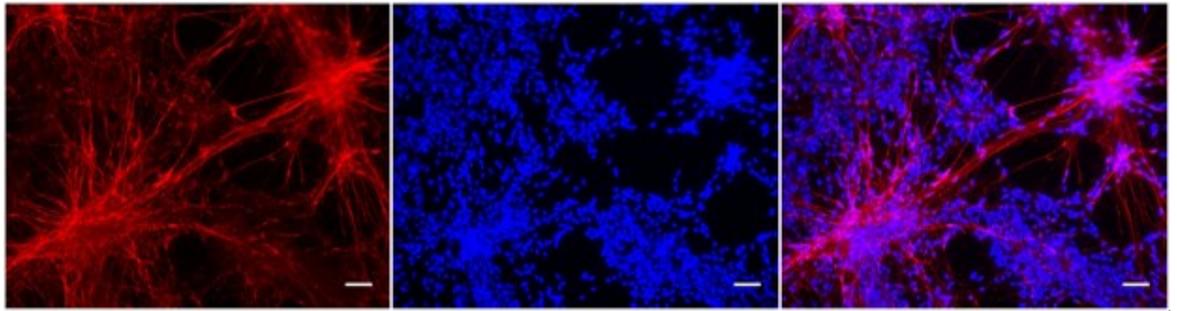


Рисунок 3.1. Положительная иммуногистохимическая реакция к Doublecortin.

Масштабный отрезок: 50 мкм.

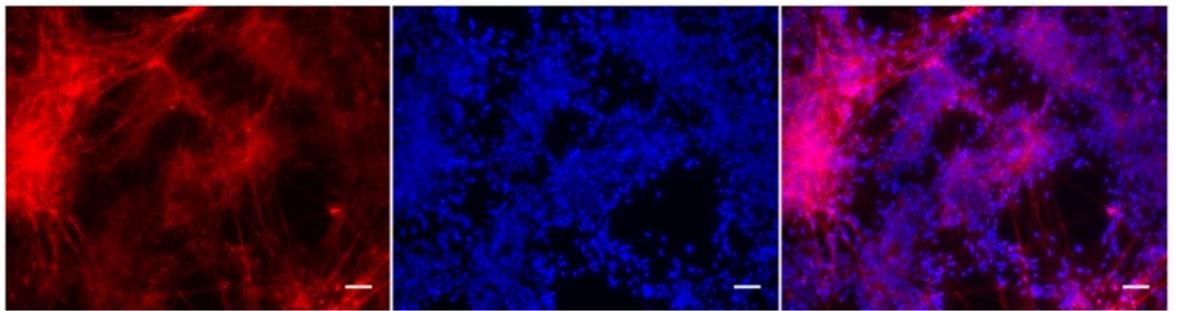


Рисунок 3.2. Положительная иммуногистохимическая реакция к biii. Масштабный

отрезок: 50 мкм.

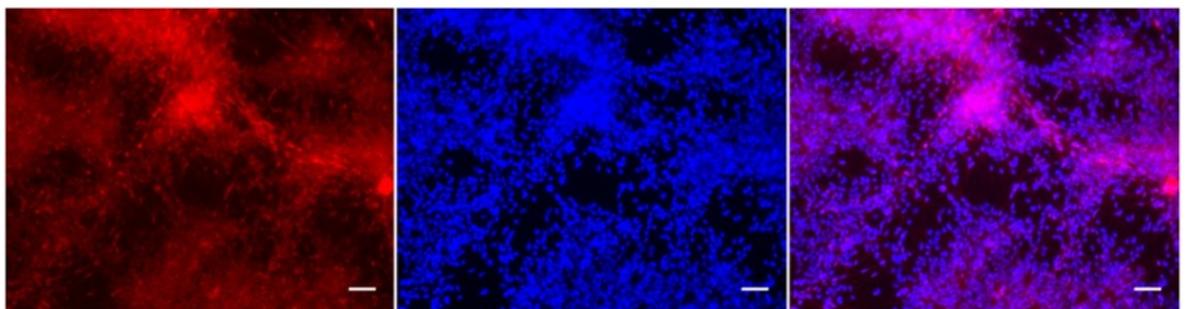


Рисунок 3.3. Положительная иммуногистохимическая реакция к NeuN.

Масштабный отрезок: 50 мкм.

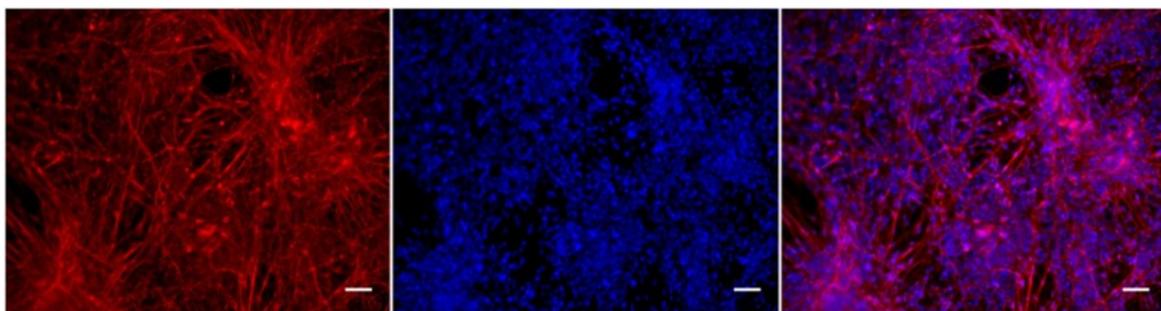


Рисунок 3.4. Положительная иммуногистохимическая реакция к synaptophysin.
Масштабный отрезок: 50 мкм.

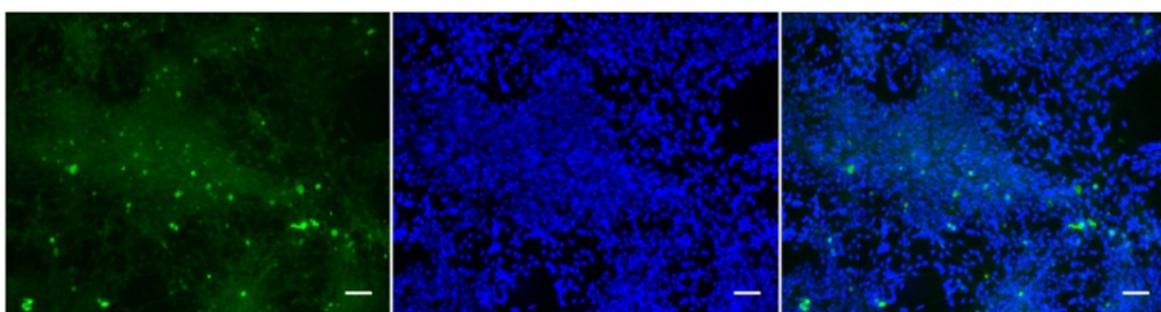


Рисунок 3.5. Положительная иммуногистохимическая реакция к L Glutamate.
Масштабный отрезок: 50 мкм.

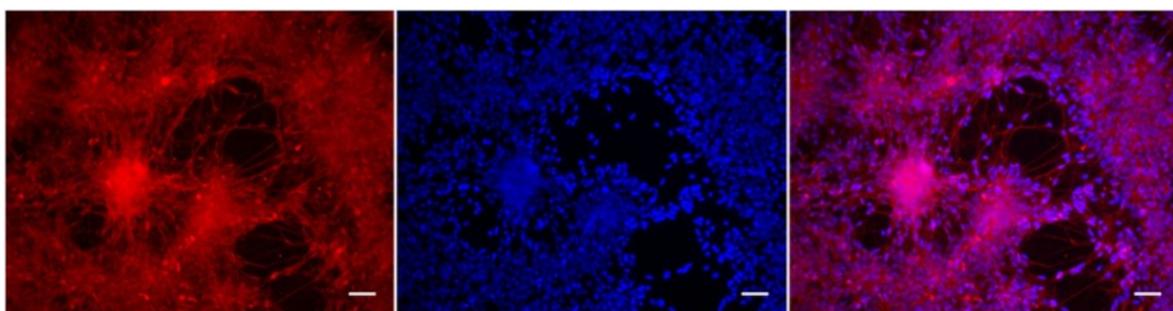


Рисунок 3.6. Положительная иммуногистохимическая реакция к Acetylcholine.
Масштабный отрезок: 50 мкм.

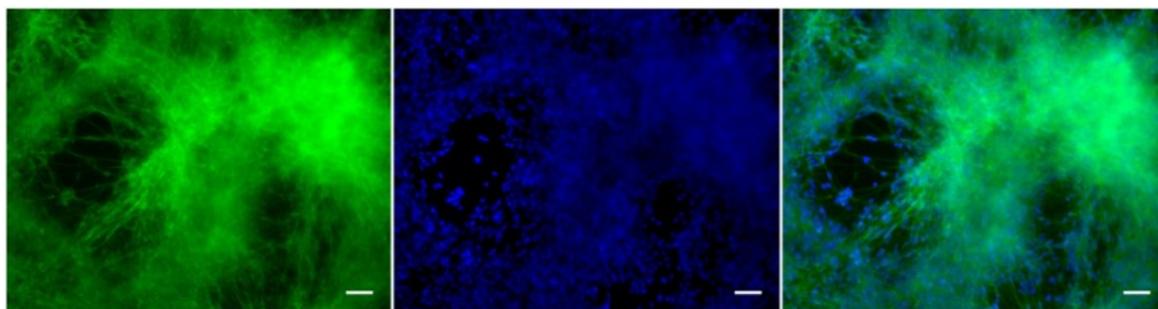


Рисунок 3.7. Положительная иммуногистохимическая реакция к GABA A Receptor beta 3. Масштабный отрезок: 50 мкм.

Все исследуемые культуры клеток – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки IPS-KYOU, нейральные стволовые клетки NS-KYOU, терминально дифференцированные нейроны N-KYOU были охарактеризованы нами при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени, который позволяет количественно измерить уровни экспрессии генов маркеров нейральных стволовых клеток *Nestin*, *Sox1*, *Musashi1*, а также генов маркеров дифференцированных нейронов *TUBB3*, *MAPT*, *MAP2* (Таблица 3.1). В результате данного анализа мы убедились в наличии экспрессии данных маркеров в исследуемых клетках, а также мы показали наличие достоверной разницы в уровнях экспрессии – наибольшую экспрессию гены *Nestin*, *Sox1*, *Musashi1* показывают в нейральных стволовых клетках, а гены *TUBB3*, *MAPT*, *MAP2* – в нейронах (Рисунок 3.8).

Таблица 3.1 - Уровень экспрессии генов маркеров нейральных стволовых клеток *Nestin*, *Sox1*, *Musashi 1* и маркеров зрелых нейронов *Tuj1*, *MAPT*, *MAP2* в разных типах клетках

	Уровень экспрессии		
	ISPC-KYOU	NSC-KYOU	N-KYOU
NESTIN	0,00158643	0,0097526	0,00604518
SOX1	0,00023582	0,1207420	0,06515411
MSI	0,00002750	0,0005570	0,00021851
TUBB3	1,75321144	5,5404379	8,05564440
MAPT	0,00031992	0,0056403	0,24655818
MAP2	0,00137153	0,0075464	0,02401367

	Погрешность измерения уровня экспрессии		
NESTIN	0,00025537	0,0007863	0,00042120
SOX1	0,00006118	0,0101726	0,00349717
MSI	0,00000158	0,0001290	0,00014674
TUBB3	0,17214439	0,4445016	1,07928937
MAP1	0,00002306	0,0006571	0,02164481
MAP2	0,00034838	0,0006084	0,00090198

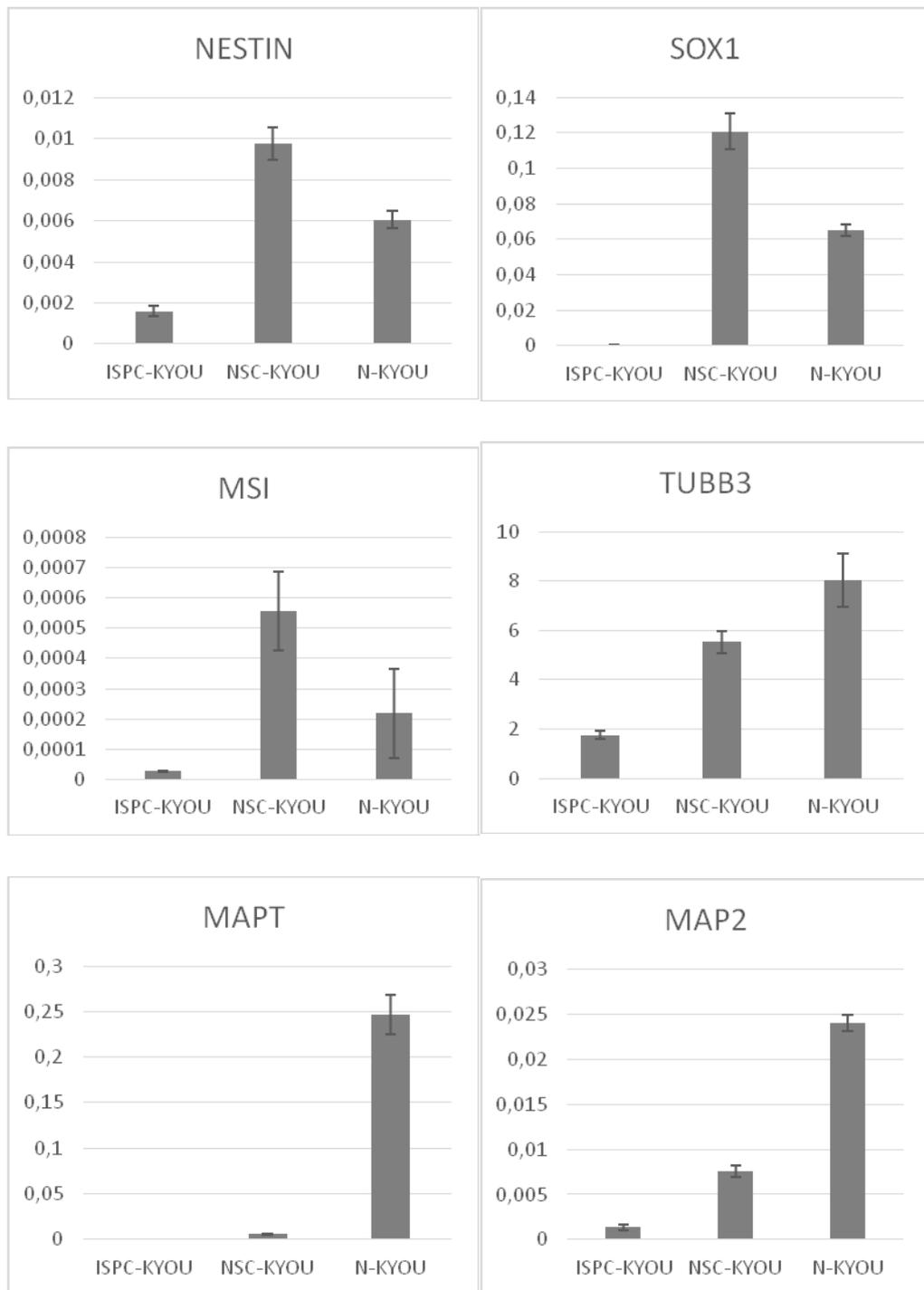


Рисунок 3.8 Измерение уровней экспрессии генов маркеров нейральных стволовых клеток Nestin, Sox1, Musashi 1, Tuj1, MAPT, MAP2 в клетках IPS-KYOU, NSC-KYOU, N-KYOU).

Таким образом, нами были освоены методы создания и поддержания культуры нервной ткани из ИПС клеток человека при помощи двух-стадийной направленной дифференцировки, а также полученные культуры клеток были описаны и

проанализированы при помощи двумя независимыми методами в полном соответствии с заявленным планом работ.

3.2 Транскриптомный анализ экспрессии генов

Используя данные транскриптомного анализа, проведенного на культурах нейронов человека, полученных направленной дифференцировкой из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, была проанализирована экспрессия генов, связанных с функционированием основных нейротрансмиттерных и нейромодуляторных систем мозга человека.

Всего было получено 8 различных культур нейронов, от разных, генетически не связанных доноров. При помощи высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS) на приборе Illumina HiSeq4000 был сделан анализ транскриптома (RNA-seq) каждой культуры (парноконцевые прочтения x 150 п.о, 75-100 млн прочтений на один образец). В результате были оценены уровни экспрессии генов ферментов синтеза и мишеней (рецепторов) следующих сигнальных молекул: глутамат, ГАМК, глицин, ацетилхолин, серотонин, дофамин, оксид азота.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гены всех исследованных нейротрансмиттерных систем экспрессируются в культурах. Этот результат согласуется с предположением о раннем формировании мультитрансмиттерности как основополагающей характеристики функционального нейронального ансамбля.

Были выявлены и существенные различия в уровне экспрессии разных систем. Наибольшее число транскриптов ферментов синтеза обнаружено для глутамата, ГАМК и NO. Несколько ниже экспрессия генов ацетилхолиновой и глициновой систем, и на порядок – два ниже по уровню экспрессии гены серотониновой и дофаминовой систем. Преобладание глутаматно-гамкэргической сигнализации характерно для мозга млекопитающих.

Уровень экспрессии ферментов синтеза всегда ниже уровня экспрессии мишеней (рецепторов или других белков, взаимодействующих с нейротрансмиттером). Однако при более низкой экспрессии генов фермента синтеза ниже оказывается и экспрессия рецепторов к этому нейротрансмиттеру. Это соответствие предполагает неслучайный характер, по-видимому, оно отражает степень развития единой нейротрансмиттерной системы.

Таблица 3.2. - Сравнительные данные по уровню экспрессии генов ферментов синтеза и рецепторов для выбранных сигнальных систем.

Глутаматергическая система	
Глутаминаза GLS	631,15
Глутаматный ионотропный рецептор АМПА типа, четыре субъединицы (GRIA 1-4)	
GRIA1	3254,09
GRIA2	536,67
GRIA3	649,77
GRIA4	564,45
ГАМК-ергическая система	
Глутамат декарбоксилаза (GAD) GAD1	377,77
GAD2	27,68
ГАМК рецепторы	
GABRA3	140,17
GABBR1	560,88
GABRB2	55,56
GABRB3	1057,30
GABRE	40,69
GABRG2	152,30
GABRG1	17,32
GABRG3	366,15
GABRP	26,37
GABRQ	10,51
GABRR1	3,49
GABRR2	5,41
Катаболизм ГАМК	
Аминобутират аминотрансфераза АВАТ	1616,47
Нитрергическая система, оксид азота (NO)	
NO - синтазы NOS	
(NOS1) NANOS	111
NOS2	43,37

NOS3	53,75
Взаимодействующий с NO синтазой белок (nitric oxide synthase interacting protein NOSIP)	575
CHRNA1Белок-адаптор NO-синтазы 1 (nitric oxide synthase 1 adaptor protein – NOS1AP)	523
Холинергическая система	
Холинацетил трансфераза CHAT	12,93
Ацетилхолинэстераза AChE	3,22
Мускариновые рецепторы (субъединицы)	
CHRM3-AS1	3,28
CHRM3-AS2	30,23
CHRM1	1,72
CHRM2	32,54
CHRM3	1098,79
CHRM5	33,93
Никотиновые рецепторы	
CHRNA1	18,18
CHRNA3	168,47
CHRNA4	5,24
CHRNA5	147,90
CHRNA9	13,47
CHRNA1	558,26
CHRNA2	100,39
CHRNA3	1,83
CHRNA4	39,33
CHRNA5	0,47
CHRNA6	4,49
Глицинергическая система	
Рецепторы к глицину	
GLRA1	34,52
GLRA2	168,39

GLRA3	27,07
GLRA4	106,76
GLRB	151,29
Дофаминергическая система	
Тирозингидроксилаза TH	4,93
Дофаминдекарбоксилаза (декарбоксилаза ароматических аминокислот) DDC	85,35
Дофаминовые рецепторы	
DRD1	6,77
DRD2	16,90
DRD3	1,54
DRD5P2	2,99
Серотонинергическая система	
Триптофангидроксилаза TPH1	3,77
Декарбоксилаза ароматических аминокислот DDC	85,35
Серотониновые рецепторы	
HTR2A	142,70
HTR2A-AS1	2,32
HTR3A	38,78
HTR1B	4,28
HTR3B	6,72
HTR7	7,70
HTR7P1	12,35
HTR1E	42,03
Моноаминоксидаза (катаболизм моноаминов)	
МАОА	417,62

3.3. Проведение направленной дифференцировки ИПСК в нейральном направлении с активным кальциевым индикатором.

Для дальнейшего изучения полученных культур клеток, в т.ч. при помощи кальциевого имаджинга нами было принято решение о получении трансгенной линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, экспрессирующих гена флуоресцентного кальциевого индикатора GCaMP6s. Данный белок является химерным белком состоящим из белка EGFP и белка кальмодулина, в результате слияния которых получил характерное свойство многократно усиливать интенсивность зеленой флуоресценции в присутствии иона кальция. Модификация GCaMP6s обеспечивает более медленную кинетику по сравнению с другими модификациями.

Для получения данной линии клеток, мы переклонировали открытую рамку считывания гена GCaMP6s в плазмидный вектор pT2/НВ, являющийся частью транспозонной системы трансгезена Sleeping Beauty, под промотером СAG. Далее мы провели электропорацию полученного вектора в линию ИПСК человека IPS-KYOU, одновременно с другой плазмидой (pSB100), которая кодирует транспозазу Sleeping Beauty. После чего мы провели три последовательных клеточных сортирования (FACS), с шагом 2-3 недели, при помощи проточного цитофлуориметра Bio-Rad S3e. Целью первого сортирования являлось увеличение эффективности трансфекции, которая составила всего 0,36%. Целью двух других сортирований являлся отбор клеток ИПСК, с работающим промотером СAG, поскольку одной из главных проблем трансгезиса в ИПСК, является чрезвычайно активный механизм метелирования всех «ненужных» клетке промотеров, в т.ч. СAG. (Рисунок 3.9). В конечном итоге после получения фракции светящихся клеток в 58% мы провели клонирование предельным разведением, в результате которого отобрали три клон ИПСК с постоянной экспрессией GCaMP6s.

В настоящий момент данные линии клеток направлены в нейральную дифференцировку для получения нейронов человека с активным кальциевым индикатором GCaMP6s.

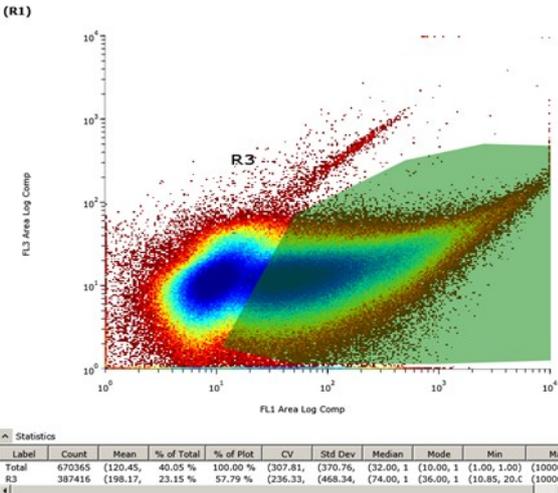
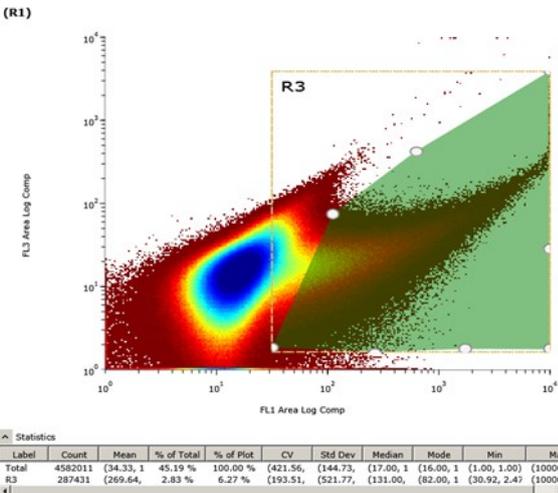
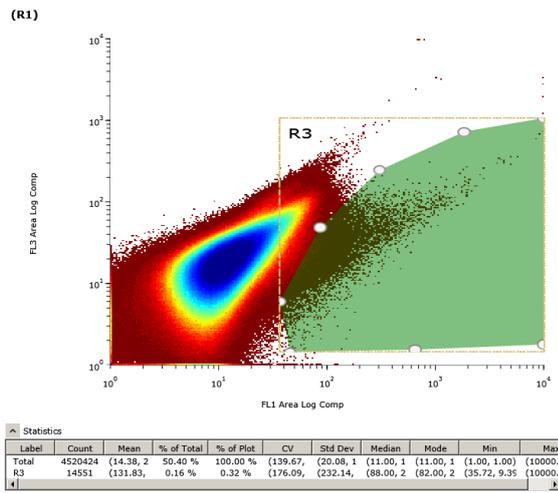


Рисунок 3.9. Три последовательных клеточных сортирования для получения линии ИПСК человека с экспрессией GCamP6s.

3.4 Модельные эксперименты.

В 2018 году при нашем участии разработана программа, реализующая алгоритм, основанный на модели [12], описывающей работу простых сетей с малым количеством нейронов, в которых каждый нейрон имеет специфические свойства. Типичным примером таких сетей являются центральные генераторы паттерна [7] – сообщества нейронов, генерирующие упорядоченную моторную выходную активность. В концептуальную основу модели положены следующие биологические принципы, определяющие ее базовые свойства:

- коммуникация нейронов имеет химическую основу; она осуществляется посредством выделения определенных веществ – транмиттеров – и реагирования на них, причем не только через синапсы, но и внесинаптически ;
- нейроны имеют различную транмиттерную специфичность (каждый выделяет определенный нейротранмиттер и способен воспринимать специфический набор химических сигналов);
- химическая коммуникация нейронов происходит через общее внеклеточное пространство - экстрасинаптическая коммуникация нейронов (volume transmission).

Предполагается использовать ее на последующих этапах описания и анализа процессов формирования нейронных ансамблей в клеточной культуре.

Кроме того, в 2018 году направлении исследования механизмов модулирующих влияний нейротранмиттеров на работу генераторов паттернов поведения у моллюсков в париетальных ганглиях виноградной улитки описаны две пары симметричных гигантских интернейронов, сходным образом участвующих в оборонительном поведении. Эти клетки имеют развитый гранулярный эндоплазматический ретикулум, свойственный секреторным клеткам. Ранее было обнаружено несколько препропептидов, синтезируемых в гигантских интернейронах: FMRF, HCS2 и HCS1, - причем последний выявляется только в двух клетках - LPa3 и RPa3. Ранее была описана первичная структура гена HCS1, который кодирует белок длиной 100 аминокислот, содержащий N-концевой гидрофобный лидерный пептид. Предположительно продукт этого гена представляет собой секреторируемый белок - нейропептид или фактор роста. Кроме LPa3 и RPa3 в церебральных ганглиях обнаружен относительно крупный симметричный нейрон MtC 6, в котором экспрессируется ген HCS1. Учитывая, что у экспрессирующих ген HCS1 клеток LPa3 и RPa3 обнаружены некоторые особенности привыкания мембраны, мы провели детальное изучения экспрессии HCS1 при различных воздействиях. Мы выполнили гибридизацию *in situ* на пяти группах изолированной ЦНС виноградной улитки (по три в

каждой). Первую (контрольную) группу инкубировали трое суток в физиологическом растворе, вторую и третью (опытные) в том же растворе, но с добавлением $MgCl_2$. На ЦНС третьей группы в течение десяти часов апплицировали серотонин (модель оборонительного поведения). Концентрация серотонина в физиологическом растворе была 10^{-5} в течение 30 мин. Четвертая опытная группа повторяла третью, но ЦНС инкубировали в растворе без $MgCl_2$. Пятая опытная группа – представляла собой модель оборонительного поведения *in vivo*. В течение трех дней по два раза в день животным инъецировали серотонин по 100 мкл 10^{-3} на 10 гр. веса (в среднем по 400 мкл).

В результате было показано, что в экспрессии гена HCS1 в командных нейронах прослеживается так называемая down-регуляция, когда ген слабо экспрессируется в отсутствие определенного типа поведения. Максимальная экспрессия HCS1 происходит лишь при оборонительном поведении или в состоянии его фармакологической имитации [17]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs) могут дифференцироваться в нейронные клетки-предшественники (NPC) при соответствующих условиях. Однако, характеристики клеток на различных этапах от клеток-предшественников к функциональным нейронам еще недостаточно полно описаны (например, [18]). Отсутствуют четкие представления о механизме формирования гетерохимических популяций из клеток, имеющих единое происхождение, что и обусловило необходимость постановки задач в настоящем проекте.

На первом этапе нами были описаны

- гетерохимические фенотипы и популяции нейронов различных типов, возникающие при стандартных условиях нейральной дифференцировки ИПС клеток;
- -на основе анализа транскриптома различных культурх были оценены уровни экспрессии генов ферментов синтеза и мишеней (рецепторов) - глутамата, ГАМК, глицина, ацетилхолина, серотонина, дофамина, оксида азота;
- - получены трансгенные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, экспрессирующих ген флуоресцентного кальциевого индикатора GCaMP6s; данные линии клеток направлены в нейральную дифференцировку для получения нейронов человека с активным кальциевым индикатором;
- - разработана асинхронная версия модели химических (нейротрансмиттерных) взаимодействий между нейронами, находящимися в едином внеклеточном пространстве, применение которой позволит более эффективно проводить анализ принципов взаимодействия развивающихся нейронных популяций.

Таким образом, полученные на этапе 2018 года результаты укладываются в указанные выше важнейшие направления нейробиологических исследований сегодняшнего дня. В ходе выполнения проекта, нами были освоены методы создания и поддержания культуры нервной ткани из ИПС клеток человека при помощи двух-стадийной направленной дифференцировки, а также полученные культуры клеток были описаны и проанализированы при помощи двух независимых методов в полном соответствии с заявленным планом работ. Описана и подтверждена нейрональная природа исследуемых клеток при помощи двух независимых методов (иммуоцитохимические методы, количественный ОТ-ПЦР в реальном времени).

На следующем этапе выполнения проекта мы полагаем получение данных о хронологии формирования гетерохимических фенотипов и связи с фармакологическим

окружением развивающихся клеток. Процесс формирования ассоциаций клеток будет оцениваться как через анализ гетерохимического состава клеток в культуре, но и по активности нервных элементов с использованием кальциевого имаджинга.

Это позволит оценить роль внешних (в том числе стрессирующих факторов) на состояние нервных клеток в системе и направление развития культуры.

Значение исследований клеточных культур из ИПС клеток человека может помочь в разработке моделей различных заболеваний и дать полезный инструмент для скрининга лекарственных препаратов (например, [18,19, 20]). С другой стороны исследования в культуре развивающихся нейронов дают понимание механизмов формирования фенотипических свойств нейрона в естественных условиях, поскольку этот процесс зависит от актуальной гетерохимической межклеточной среды (ниши), в которой оказываются клетки-предшественники. (например, [8, 18]). На основании наших экспериментов возможно будет проведение подбора различных комбинаций нейротрансмиттеров в культуральной среде, позволяющих управлять тонкой дифференцировкой нейронов (из одного типа в другой).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Deenen J.C., Arnts H., van der Maarel S.M., Padberg G.W., Verschuuren J.J., Bakker E., Weinreich S.S., Verbeek A.L., van Engelen B.G. Population-based incidence and prevalence of facioscapulohumeral dystrophy//Neurology - 2014.- Vol 16, No. 83. P. 1056 - 1059.
2. Zakharova V.V., Pletjushkina O.Y., Galkin I.I., Zinovkin R.A., Chernyak B. V., Krysko D.V., Bachert C., Krysko O., Skulachev V.P., and Popova E.N. Low concentration of uncouplers of oxidative phosphorylation decreases the TNF-induced endothelial permeability and lethality in mice//Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. – 2017. – Vol. 1863, No. 4. P. 968–977.
3. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury.J Neurosci. 2005 May 11;25(19):4694-705.
4. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, Gage FH, Anderson AJ. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 27;102(39):14069-74. Epub 2005 Sep 19.
5. Cizkova D, Kakinohana O, Kucharova K, Marsala S, Johe K, Hazel T, Hefferan MP, Marsala M. Functional recovery in rats with ischemic paraplegia after spinal grafting of human spinal stem cells. Neuroscience. 2007 Jun 29;147(2):546-60. Epub 2007 May 23.
6. Guest J, Santamaria AJ, Benavides FD. Clinical translation of autologous Schwann cell transplantation for the treatment of spinal cord injury. Curr Opin Organ Transplant. 2013 Dec;18(6):682-9. doi: 10.1097/MOT.0000000000000026.
7. Balaban, D. D. Vorontsov, V. E. D'yakonova, T. L. D'yakonova, I. S. Zakharov, T. A. Korshunova, O. Yu. Orlov, G. A. Pavlova, Yu. V. Panchin, D. A. Sakharov, M. V. Falikman. Central Pattern Generators. // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2015. Volume 45, Issue 1, P. 42-57.
8. Butts JC, McCreedy DA, Martinez-Vargas JA, Mendoza-Camacho FN, Hookway TA, Gifford CA, Taneja P, Noble-Haeusslein L, McDevitt TC. Differentiation of V2a interneurons from human pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 May 9;114(19):4969-4974.
9. Sternfeld MJ, Hinckley CA, Moore NJ, Pankratz MT, Hilde KL, Driscoll SP, Hayashi M, Amin ND, Bonanomi D, Gifford WD, Sharma K, Goulding M, Pfaff SL. Speed and segmentation control mechanisms characterized in rhythmically-active circuits created from

spinal neurons produced from genetically-tagged embryonic stem cells. *Elife*. 2017 Feb 14;6. pii: e21540. doi: 10.7554/eLife.21540.

10. Boguslavsky D.V., Zakharov I.S., Belyavsky A.V., Balaban P.M.. Novel gene is expressed in serotonin-containing neurons of *Helix lucorum*. “Simpler nervous systems” IX East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology. St.Peterburg, Russia, September 9-13, 2009. P.16

11. Богуславский Д.В., Захаров И.С. Педальные пептиды и их роль в центральной нервной системе моллюсков.// *Успехи современной биологии*. 2015. Т. 135. Вып. 3. С. 307-320.

12. Базенков Н.И., Воронцов Д.Д., Дьяконова В.Е., Жилиякова Л.Ю., Захаров И.С., Кузнецов О.П., Куливец С.Г., Сахаров Д.А.. 2017. Дискретное моделирование межнейронных взаимодействий в мультитрансмиттерных сетях // *Искусственный интеллект и принятие решений*, № 2, с.55-73.

13. Bargmann, C.I. 2012. Beyond the connectome: how neuromodulators shape neural circuits. *Bioessays* 34, 458–465.

14. Кузнецов О.П., Базенков Н.И., Болдышев Б.А., Жилиякова Л.Ю., Куливец С.Г., Чистопольский И.А. Асинхронная дискретная модель химических взаимодействий в простых нейронных системах // *Искусственный интеллект и принятие решений*. 2018. № 2. С. 3-20. DOI: 10.14357/20718594180201.(РИНЦ)

15. Bazenkov N., Dyakonova V., Kuznetsov O., Sakharov D., Vorontsov D., Zhilyakova L.. Discrete Modeling of Multi-transmitter Neural Networks with Neuronal Competition // *Advances in Intelligent Systems and Computing*. 2018. V. 636. P. 10–16. DOI 10.1007/978-3-319-63940-6_2. (Scopus)

16. Kuznetsov O.P., Bazenkov N.I., Boldyshev B.A., Zhilyakova L.Yu., Kulivets S.G., Chistopolsky I.A.. Discrete Model of Asynchronous Multitransmitter Interactions in Biological Neural Networks. // In: Kuznetsov S., Osipov G., Stefanuk V. (eds) *Artificial Intelligence. RCAI 2018. Communications in Computer and Information Science*, vol. 934. Springer, Cham, pp. 190-205. <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-030-00617-4>.

17. Захаров И.С., Богуславский Д.В. Особенности дифференциальной экспрессии белка предшественника в нейронах виноградной улитки *Helix lucorum* L.// *Материалы конференции с международным участием «Физиология и биохимия сигнальных систем»*, посвященной 100-летию со дня рождения академика Т.М. Турпаева, Москва, 23-25 октября 2018 г. – Москва:Издательство «Перо», 2018. С.37. ISBN 978-5-00122-668-0

18. Kang S, Chen X, Gong S, Yu P, Yau S, Su Z, Zhou L, Yu J, Pan G, Shi L. Characteristic analyses of a neural differentiation model from iPSC-derived neuron according to morphology, physiology, and global gene expression pattern. *Sci Rep.* 2017 Sep 25;7(1):12233.
19. Deshpande A, Yadav S, Dao DQ, Wu ZY, Hokanson KC, Cahill MK, Wiita AP, Jan YN, Ullian EM, Weiss LA. Cellular Phenotypes in Human iPSC-Derived Neurons from a Genetic Model of Autism Spectrum Disorder. *Cell Rep.* 2017 Dec 5;21(10):2678-2687.
20. Hansen SK, Stummann TC, Borland H, Hasholt LF, Tümer Z, Nielsen JE, Rasmussen MA, Nielsen TT, Daechsel JC, Fog K, Hyttel P. Induced pluripotent stem cell - derived neurons for the study of spinocerebellar ataxia type 3. *Stem Cell Res.* 2016 Sep;17(2):306-317.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ ЗА 2018 ГОД

*отчетные публикации по Государственному заданию

1 *Кузнецов О.П., Базенков Н.И., Болдышев Б.А., Жилиякова Л.Ю., Куливец С.Г., **Чистопольский И.А.** Асинхронная дискретная модель химических взаимодействий в простых нейронных системах//Искусственный интеллект и принятие решений - 2018. - № 2. С. 3 - 20. DOI: 10.14357/20718594180201. (РИНЦ)

2 *Bazenkov N., **Dyakonova V.**, Kuznetsov O., **Sakharov D.**, **Vorontsov D.**, Zhilyakova L.. Discrete Modeling of Multi-transmitter Neural Networks with Neuronal Competition//Advances in Intelligent Systems and Computing - 2018. - V. 636. P. 10 – 16. DOI 10.1007/978-3-319-63940-6_2. (WoS, Scopus). WOS:000454681600002

3 Kuznetsov O.P., Bazenkov N.I., Boldyshev B.A., Zhilyakova L.Yu., Kulivets S.G., **Chistopolsky I.A.** Discrete Model of Asynchronous Multitransmitter Interactions in Biological Neural Networks // In: Kuznetsov S., Osipov G., Stefanuk V. (eds) Artificial Intelligence. RCAI 2018. Communications in Computer and Information Science, vol. 934. Springer, Cham, pp. 190-205. <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-030-00617-4>.

4 Zhilyakova L., Kuznetsov O., Bazenkov N., Kulivets S., Boldyshev B., **Dyakonova V.** Model of multi-transmitter neural network as a tool for understanding the processes of volume transmission, neuromodulation, and rhythmogenesis in small neuronal ensembles - 11th FENS Forum of Neuroscience, Berlin, July 7-11, 2018. Тезисы докладов G -004. DOI 10.13140/RG.2.2.16337.38249.

5 Кузнецов О.П., Жилиякова Л.Ю., Базенков Н.И., Болдышев Б.А., Куливец С.Г., **Чистопольский И.А.** Асинхронное моделирование химических взаимодействий в простых нейронных системах//Восьмая международная конференция по когнитивной науке: Тезисы докладов. Светлогорск, 18–21 октября 2018 г. / Отв. ред. А.К. Крылов, В.Д. Соловьев. — М.: Изд-во «Институт психологии РАН» - 2018. - С. 1130 - 1132.

6 **Захаров И.С., Богуславский Д.В.** Особенности дифференциальной экспрессии белка предшественника в нейронах виноградной улитки *Helix lucorum* L.//Материалы конференции с международным участием «Физиология и биохимия сигнальных систем», посвященной 100-летию со дня рождения академика Т.М. Турпаева, Москва, 23-25 октября 2018 г. – Москва: Издательство «Перо» - 2018. - С.37. - ISBN 978-5-00122-668-0.

Отчет утвержден Ученым советом ИБР РАН, протокол № 11 от 28 ноября 2018 г.