

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФГБУН «ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН»

УДК 612.8.01

РК НИОКР 01201351271

№ ИС ГЗ 0108-2014-0008

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН

Член-корреспондент РАН

А.В. Васильев



«27» января 2017 г.

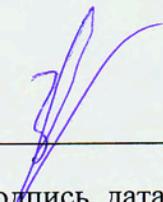
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ТЕМА 8. МЕДИАТОРНЫЕ ФАКТОРЫ И СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ В ОРГАНИЗАЦИИ  
ПОВЕДЕНИЯ И ИНДИВИДУАЛЬНОМ РАЗВИТИИ ЖИВОТНЫХ

(заключительный отчет)

Руководитель темы

Доктор биологических наук, зав. лаб.

  
\_\_\_\_\_

И.С. Захаров

подпись, дата

Москва, 2017

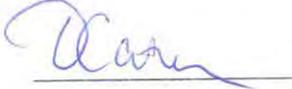
## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, д-р  
биологических наук

  
\_\_\_\_\_  
подпись, дата

И.С. Захаров (ведение, раздел 2  
заключение)

Исполнители темы:  
Доктор биол. наук, акад. РАЕН

  
\_\_\_\_\_  
подпись, дата

Д.А. Сахаров (раздел 1, заключение)

Доктор биол. наук.

  
\_\_\_\_\_  
подпись, дата

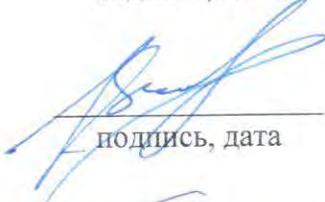
Е.Е. Воронежская (раздел 3)

Доктор биол. наук, профессор

  
\_\_\_\_\_  
подпись, дата

П.В. Авдонин (раздел 4)

Доктор биол. наук

  
\_\_\_\_\_  
подпись, дата

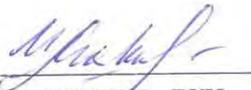
Ю.Б. Шмуклер (раздел 5)

Доктор биол. наук, профессор

  
\_\_\_\_\_  
подпись, дата

Б.Н. Манухин (раздел 6)

Доктор биол. наук

  
\_\_\_\_\_  
подпись, дата

И.Г. Макаренко (раздел 7)

УДК 612.8.01

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат	4
Определения, обозначения и сокращения	5
Введение	6
Раздел 1. Клеточные и молекулярные механизмы формирования поведения	8
Раздел 2. Роль экспрессии нейроспецифических генов в онтогенезе поведения	15
Раздел 3. Нейро-гуморальная регуляция развития и формирования адаптивных программ на примере личинок водных беспозвоночных и низших позвоночных	25
Раздел 4. Механизмы регуляции обмена ионов кальция в гладкомышечных и эндотелиальных клетках кровеносных сосудов и в клетках скелетной мускулатуры	38
Раздел 5. Нейротрансмиттерные механизмы в регуляции эмбриогенеза и нервного регуляторных процессах у взрослых организмов	48
Раздел 6. Анализ лиганд-рецепторных взаимодействий в физиологических и биохимических реакциях	54
Раздел 7. Развитие внутримозговых связей: афферентные и эфферентные связи преоптической области гипоталамуса	65
Заключение	70
Публикации по теме	71

## Реферат

Отчет 78 с., 7 ч, 37 рис., 103 источника (48 ссылки, 56 публикаций по теме)

**Ключевые слова:** медиаторы, сигнальные системы, сенсорные системы, индивидуальное развитие, нейротрансмиттеры, нейронные ансамбли, моноамины (серотонин, дофамин), FMRF-амид, генераторы поведения, лиганд-рецепторные взаимодействия, взаимодействие взрослый-зародыш, гипоталамус, внутримозговые связи, гладкомышечные и эндотелиальные клетки, кровеносные сосуды, обмен ионов кальция, моллюски, морские ежи, аннелиды, амперометрия

На модели выбора направления движения моллюска - большого прудовика - показано, что предварительная двигательная нагрузка облегчает и ускоряет выбор принятия решения.

Исследована экспрессия нейропептидов, ранее найденных у наземного моллюска (белки *preHelixSFamid* и *HCS2*), составлена карта экспрессии и физиологически идентифицированы нейроны, экспрессирующие различные пептидные кофакторы.

Впервые показано, что в отличие от всех других пресноводных двустворчатых моллюсков, личинки дрейсен имеют хорошо развитую нервную систему уже на самых ранних этапах развития. Личиночные нейроны, содержащие серотонин (5-HT) и пептид FMRFамид (FMRF), увеличивают синтез специфических медиаторов при неблагоприятных условиях среды (изменение солености), позволяя личинкам адаптироваться в широком диапазоне изменений и обеспечивая максимальное расселение вида.

Определены сигнальные пути, по которым передается воздействие от рецепторов на двупоровые кальциевые каналы в эндотелиальных клетках.

Исследовано влияние активации и ингибирования серотониновых рецепторов, бета-адренорецепторов и мускариновых рецепторов на связывание специфических антагонистов альфа<sub>1</sub>- и альфа<sub>2</sub>-адренорецепторов [3H]празозина и [3H]RX821002.

Описана экспрессия компонентов серотонергической системы и механизмы их функционирования в раннем развитии *Xenopus tropicalis*, а также морского ежа *Paracentrotus lividus*.

Методом диффузии липофильного карбоцианинового красителя DiI показано, что нормальное перинатальное развитие проекций латеральной преоптической области и латерального гипоталамуса с ядрами уздечки у крыс осуществляется посредством медуллярной полоски.

### Обозначения и сокращения:

АДФ-рибоза – циклическая аденозин дифосфат рибоза

АТII - ангиотензин II

АТФ-аза фермент синтеза аденозин три фосфорной кислоты

ГМК - гладкомышечные клетки

к-ДНК – компламентарная ДНК

ОТ ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЦР-РВ (RT-PCR) – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ЦГП – центральный генератор паттерна

ЦНС – центральная нервная система

сАМР – циклический аденозин монофосфат

АVP -вазопрессин

ДА – дофамин - 2-(3,4-дигидроксифенил)-этиламин

DiI – краситель

5-НТ – медиатор серотонин 5-гидрокситриптамин

5-НТР - предшественник синтеза серотонина – 5-гидрокси- L-триптофан

FMRF-амид – пептидный медиатор

L-DOPA – предшественник синтеза дофамина – L-Диоксифенилаланин (3,4-диоксифенилаланин)

NAADP – никотиновая кислота аденин динуклеотид фосфат (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate)

NET – транспортер серотонина

PCPA – параклорфенилалани, ингибитор фермента синтеза серотонина триптофангидоксилазы

SERT – транспортер серотонина

TPC - двупоровые кальциевые каналы (two-pore calcium channels)

VMAT – везикулярный транспортер моноаминов

## Введение

Выделение нейронами биологически активных веществ (медиаторов) играет ключевую интегрирующую роль в коммуникации между клетками, тканями и органами животного. Известно, что как синаптически, так и внесинаптически выделяемые в экстраклеточную среду медиаторы воздействуют на клетки эмбриона, регулируя развитие личинки, определяют сроки и порядок формирования клеточных генераторов поведения, активность сосудистых структур, функциональные взаимосвязи между регуляторными системами. Однако, общее представление о целостных механизмах интегрирующего влияния выделяемых факторов нервной системы еще не сложилось. В действующем проекте интегрирующая роль медиаторов в онтогенезе животных исследуется на широком спектре физиологических моделей: эмбриональное и постэмбриональное развитие морских и наземных беспозвоночных, экспрессия генов, кодирующих нейропептиды и экспрессия рецепторов к медиаторам, лиганд-рецепторные взаимодействия и регулирующая роль кальциевого обмена, развитие внутримозговых связей и организация поведенческих актов.

Ионы кальция играют ведущую роль в регуляции сократимости кровеносных сосудов, работы сердца, в тромбообразовании и свертывании крови. Однако нет оснований утверждать, что достигнуто достаточно полное и глубокое понимание этих процессов. В последние годы открыты новые механизмы регуляции внутриклеточного обмена ионов кальция. Идентифицированы десятки кальциевых каналов плазматической мембраны, относящихся к семейству TRP (transient receptor potential). Эти каналы ответственны за вазоконстрикцию и вазодилатацию сосудов в ответ на действие гормонов и нейротрансмиттеров, они обеспечивают вазодилатацию, вызванную увеличением скорости потока крови, в сердце с участием каналов TRP осуществляется регуляция ритма и силы сокращения, в тромбоцитах их активация является ключевым звеном агрегации. Достижением последних двух лет стало открытие в клетках сердца и сосудов еще одного типа каналов - лизосомальных кальциевых каналов. Они получили название двупоровые кальциевые каналы. Функциональная роль двупоровых каналов в регуляции системы кровообращения не ясна.

Актуальность проблемы, связанной с изучением кальциевых каналов плазматической мембраны и внутриклеточных мембран в клетках сосудов, сердца и тромбоцитов обусловлена их участием в реализации нормальных физиологических реакций и в патогенезе практически всех сердечно-сосудистых заболеваний. Принципиально важным является понимание механизмов регуляции этих каналов, поиск путей воздействия на их активность.

Закономерности и особенности развития нервной системы широко исследуются биологами и медиками различных специальностей. Одно из направлений в нейроморфологических исследованиях - это изучение организации внутримозговых связей. Существует ряд методических подходов: тимидиновая автордиография, иммуноцитохимические исследования, электронная микроскопия, позволяющих охарактеризовать время выселения нейронов-предшественников из герминативных областей мозга, описать пути их миграции к местам окончательной локализации,

выявить в нейронах и их отростках специфические нейротрансмиттеры, характерные для дифференцированных нейронов. Однако не во всех случаях иммуноцитохимические исследования дают объективную информацию о ранних этапах формирования аксональных связей, поскольку их результаты зависят от концентрации выявляемого антигена. Для изучения внутримозговых связей у позвоночных животных были разработаны специальные методы, основанные на ретро- и anterogradном транспорте маркеров по аксонам после их прижизненного введения. Подавляющее большинство из них не могут быть использованы при проведении пренатальных и ранних постнатальных исследований, т.к. невозможно точное прижизненное введение маркера в мозг плода, находящегося в матке. В результате большинство исследований внутримозговых связей млекопитающих проведено на взрослых и частично на молодых животных, тогда как сведения о пренатальном и раннем постнатальном развитии большинства проводящих систем мозга отсутствуют. Появление метода диффузии липофильных карбоциониновых красителей по мембране нейрона после нанесения красителя на предварительно фиксированный мозг дало возможность сделать предметом изучения эмбриональный мозг. Его использование позволит получить новые оригинальные данные о формировании еще одной проводящей системы мозга у крыс, начиная с самых ранних стадий пренатального развития.

Одной из фундаментальных проблем современной физиологии является изучение закономерностей и механизмов модуляции лиганд-рецепторного взаимодействия, функциональной взаимосвязи (cross-talk) регуляторных систем, путей реализации сигнала на органном, клеточном и внутриклеточном уровнях. Первым этапом в действии сигнальной молекулы на эффекторную клетку является ее присоединение к специфическому рецептору. Этот процесс исследуется на примере радиолигандных и физиологических реакций, подчиняющихся сходным закономерностям. Проводится сравнительный анализ методических и экспериментальных приемов и математических моделей для обработки полученных результатов. Большое внимание уделяется функциональной характеристике рецепторных структур.

Перспективным объектом для исследования функциональной активности регуляторных рецепторных систем и их модуляции биологически активными веществами является амнион куриного эмбриона. Отсутствие иннервации в амнионе позволяет анализировать прямые воздействия на рецепторы, участвующие в регуляции его сократительных реакций, исключив пресинаптические влияния. В рамках заявленной темы будут решаться две основные проблемы: 1) сравнительные характеристики нейротрансмиттерных механизмов в донервном эмбриогенезе беспозвоночных и позвоночных животных, 2) роль транзиттеров в несинаптических межклеточных взаимодействиях у взрослых млекопитающих.

Выполнение поставленных задач по заявленным темам исследовательской работы позволит изучить роль нейромедиаторов как регуляторов, действующих на протяжении всего онтогенеза у беспозвоночных и позвоночных животных.

## **Раздел 1. Клеточные и молекулярные механизмы формирования поведения.**

В последний период развития нейробиологии прочно установлено, что моторное поведение дискретно – оно представлено некоторым репертуаром поведенческих актов, и каждый такой акт продуцируется определенным паттерн-генерирующим ансамблем нейронов.

При этом обнаружилось, что паттерн-генерирующие ансамбли обладают свойством мультифункциональности: один и тот же центральный генератор паттерна (ЦГП) делает выбор из нескольких стабильных паттернов выходной активности (например, из репертуара локомоторных аллюров), два разных ЦГП могут по-разному координировать свою активность.

Кроме того, функциональное состояние нервной системы является контекстом, во многом определяющим выбор регуляторного ответа и/или координированность определенных поведенческих программ. К настоящему времени получены многочисленные подтверждения того, что активность определенной медиаторной системы, функциональный баланс между различными нейромедиаторами (например, дофамином и серотонином), и в целом, метаболическая активность всего «богатства» медиаторных систем является базовой составляющей, определяющей выбор регуляторного ответа и/или паттерн поведенческих программ.

В свою очередь реализованная программа является именно тем стартовым состоянием, которое влияет на последующий регуляторный акт со стороны нервной системы.

Взаимовлияние и взаимосвязь между «мишенями» нервной регуляции и характер активности нервной системы являются более объемлющей парадигмой, позволяющей выйти за крайне узкие и статичные рамки в виде простейших, стандартизированных ответных реакций по принципу «стимул – реакция».

### **1.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

*Активация гиперлокомоции.* У сверчка полет активировали струей воздуха, по методике Хоффманна и Стивенсона. На прудовике применена разработанная в коллективе методика активации циклической мышечной локомоции перемещением моллюска из воды на увлажненную поверхность.

*Анализ поведения.* Применяется стандартное оборудование для видеорегистрации поведения с последующим анализом на программном обеспечении. Кроме того, использовалась оригинальная система автоматизированной обработки данных (Д.Д. Воронцов), основанная на известных алгоритмах, но дающая такие преимущества, как предельная гибкость в добавлении требующихся по ходу исследования возможностей.

*Электрофизиология.* Исследование электрической активности редуцированных препаратов – изолированных нейронов, изолированных фрагментов ЦНС, а также полуинтактных препаратов

- проводилась стандартными методами нейроэтологии с использованием внутриклеточных микроэлектродов.

**Оценка экстраклеточной среды.** Применялась собственная методическая разработка - использование изолированного нейрона в качестве подвижного мультирецепторного биосенсора, позволяющего осуществлять как экстренный, так и длительный (часы) мониторинг нейроактивности экстраклеточной среды (Чистопольский, Сахаров, 2007; ).

**Фармакология.** Использовались средства коммерческих фирм-производителей нейро- и психофармакологии.

#### **Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ).**

Позволила зарегистрировать изменения в экспрессии генов ферментов синтеза и метаболизма серотонина при разных поведенческих состояниях.

#### **Объекты.**

В качестве объектов исследования использовали нейробиологические модели - сверчок *Gryllus bimaculatus*, а также модельные моллюски - пресноводный легочный моллюск большой прудовик *Lymnaea stagnalis* и крылоногий моллюск морской ангел (клион) *Clione limacina*.

Они обладают важными достоинствами:

- (1) доступностью - круглогодичное культивирование обоих видов;
- (2) высокой степенью изученности (включая собственный опыт коллектива);
- (3) эти два вида представляют две основные группы первичноротых животных - Ecdysozoa и Lophotrochozoa.

## **1.2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Исследования 2013 года были посвящены отбору модельных объектов, удобных для экспериментального анализа клеточных механизмов перестроек поведения.

Были выбраны три исходных нейробиологических модели мультистабильности - (1) буккальный генератор моторных ритмов пресноводного лёгочного моллюска прудовика *Lymnaea stagnalis*, (2) бистабильная координация генераторов локомоторного и дыхательного ритмов того же моллюска и (3) локомоторный генератор плавания морского ангела *Clione limacina*.

Были получены предварительные результаты, реализация которых стала предметом исследований последующих лет.

В 2014 году главное внимание было уделено экспериментальному исследованию механизмов, посредством которых два разных ЦПП могут по-разному координировать свою активность.

Изучалась присущая прудовику (*Lymnaea stagnalis*) и описанная нами ранее мультистабильная координация ритмов локомоции и дыхания.

Для изменения нейротрансмиттерных условий среды в препаратах изолированной нервной системы *Lymnaea*, а также в полуинтактных препаратах, включающих, помимо нервной системы, подключенную к ней дыхательную мускулатуру, повышали концентрацию метаболитических предшественников нейротрансмиттеров серотонина и дофамина, 5-НТР и L-DOPA, соответственно.

В более ранних работах группы неоднократно было показано, что применение метаболитических предшественников предпочтительнее аппликации на ЦНС самих нейротрансмиттеров, в то время как предшественники вызывают закономерное повышение уровня соответствующих нейротрансмиттеров, проходя последнюю стадию синтеза в нейронах.

Оба вещества оказывали на препарат сходное в целом, но не в деталях действие – приводили к активации локомоторной и дыхательной программ.

Дыхательная моторная программа с нерегулярной ритмической структурой во многих препаратах присутствовала спонтанно, в ответ на добавление вещества она активировалась. При отсутствии спонтанной дыхательной программы она включалась первой, а вскоре после её запуска возникала фиктивная локомоция.

Период фармакологически вызванного локомоторного ритма был различным для каждого из веществ:  $10.1 \pm 1.2$  с для 5-НТР,  $24.7 \pm 3.4$  с для L-DOPA (даны стандартные ошибки среднего).

Период дыхательной программы был менее стабильным по сравнению с локомоторным паттерном, и колебался в значительных пределах. В части опытов наблюдалась равнопериодическая синхронизация моторных программ.

Предварительный анализ полученных данных, а также более ранние наблюдения, позволили выделить как минимум два достоверно различающихся варианта координации дыхательной и локомоторной программ.

Мы предполагаем, что два типа координации соответствуют двум ранее описанным (Winlow, Haydon, 1986) формам циклической локомоции – водной (upside down, по поверхностной пленке) и наземной (по твердому субстрату вне воды).

По-видимому, каждая из привязок создает оптимальные условия для осуществления дыхательного акта при данной форме передвижения моллюска (Сахаров, Цыганов 1998, Цыганов, 2001).

Выбор между двумя вариантами координации вероятно зависел от того вещества, при помощи которого были индуцированы моторные программы. Однако результаты многих экспериментов оказались невозможно однозначно отнести к той или иной группе по типу координации – на протяжении записи наблюдалась неоднократная смена её типа в виде перескока между устойчивыми состояниями.

Полученные результаты указывают на то, что координация может иметь два устойчивых варианта, то есть совокупная система способна работать в двух дискретных режимах, каждый из которых может быть выбран в зависимости от нейротрансмиттерной ситуации.

Дополнительно в 2014 году на том же объекте (прудовик) исследовалась координация нейрона В2, контролирующего моторику пищевода, с центральным генератором моторики радулы. Были охарактеризованы эффекты нейротрансмиттерных веществ, ответственных за фазировку и модуляцию моторного ритма радулы (ацетилхолина, глутамата, серотонина), на упомянутый изолированный нейрон. Было показано, что полностью изолированный нейрон В2 буккального ганглия прудовика, чувствителен также к NO, FMRFамиду и метэнкефалину в физиологических концентрациях. Сопоставление этих эффектов с эффектами стимуляции *in situ* нейронов, высвобождающих соответствующие нейротрансмиттерные вещества, позволило удостовериться в широком вовлечении разнородных (по трансмиттерному фенотипу) клеточных элементов ансамбля в создание динамически меняющейся среды, определяющей характер моторных ритмов и их координации.

В 2015 году в центре внимания был анализ локомоторных перестроек у крылоногого моллюска клиона - *Clione limacina*. Этот моллюск плавает благодаря ритмическим движениям крыльев. При фоновом (круизном) плавании крылья совершают в среднем 40-60 взмахов в минуту. Ранее было показано, что введение в организм моллюска серотонина активизирует охотничье поведение, при котором частота взмахов крыльев возрастает до 120-150 в минуту. Введение дофамина приводит к снижению частоты взмахов вплоть до полного прекращения плавания.

Эксперименты проводили на препарате изолированной ЦНС клиона, регистрировали внутриклеточно активность нейронов локомоторного генератора.

После записи фоновой активности, в омывающий раствор добавляли серотонин (2,5, 5 или 10 мкг/мл) или дофамин (5, 10, 20, 30 или 40 мкг/мл) и продолжали регистрацию в течение часа и более.

Серотонин во всех испытанных концентрациях учащал локомоторный ритм. Дофамин оказывал тормозное влияние на нейроны локомоторного генератора, которое усиливалось с повышением концентрации вещества в омывающем растворе.

Установлено, что в зависимости от соотношения дофамина и серотонина в омывающей среде частота ритма фиктивного плавания, создаваемая генератором в педальном ганглии, смещается к одному из двух устойчивых значений: или в область частот круизного плавания (40-60 циклов в минуту) или в область частот охотничьего. Новостью явилась зависимость тормозного действия дофамина от фоновой частоты импульсации локомоторного нейрона. При фоновой частоте около 40-60 импульсов в минуту (что соответствует частоте взмахов крыльев клиона при круизном плавании) дофамин в концентрации 10 мкг/мл и выше эффективно снижал (или прекращал)

импульсную активность. Относительно низкие концентрации дофамина (10-30 мкг/мл) не оказывали существенного влияния на активность нейронов локомоторного генератора при фоновой частоте выше 90 импульсов в минуту (что соответствует охотничьему плаванию). Однако концентрация дофамина 40 мкг/мл оказалась эффективной и при такой высокой фоновой частоте – активность становилась реже и прекращалась, лишь позже наблюдалось ее спонтанное восстановление с частотой до 50-60 импульсов в мин.

Можно предположить, что дофамин оказывает на нейроны локомоторного генератора клиона не только тормозное, но и рассинхронизирующее действие.

Напротив, серотонин не только активирует, но и синхронизирует нейроны локомоторного генератора, делая его функционирование более эффективным.

В целом, полученные результаты указывают на то, что изменение нейроактивного состава внеклеточной среды локомоторного генератора может не только вызывать смену аллюра, но и способствовать удержанию генератора в исходном состоянии.

Генератор стремится реализовать одну из альтернативных локомоторных программ при сдвиге баланса в пользу одного из медиаторов группы моноаминов (серотонина или дофамина).

В ходе исследования локомоторных генераторов тема получила развитие – была разработана новая экспериментальная модель, позволившая проверить предположение, что предшествующая двигательная нагрузка может ускорять принятие решения. Это направление стало главной задачей экспериментов 2016 года. Исследовали поведение прудовика при попадании из воды на сушу. Попадание на сушу является необычной ситуацией для данного вида пресноводных моллюсков, однако не исключено в природе и предполагает наличие поведенческих механизмов для возвращения в естественную среду.

Исходя из этого, рассчитывали на повышенную активацию когнитивных способностей животного для принятия решения о правильном направлении движения для возвращения в водную среду.

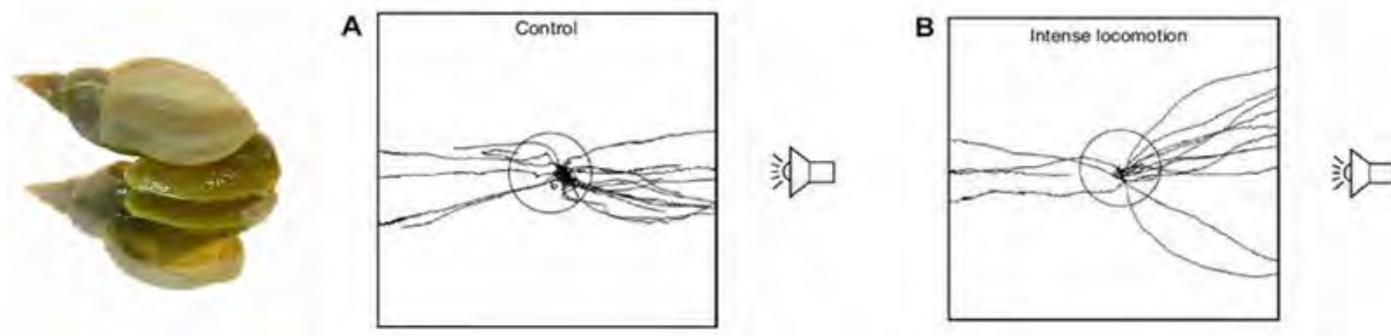
В разнообразных сериях опытов анализировали влияние предварительной двигательной нагрузки на поведение улитки на сухой стеклянной поверхности в градиенте освещения. Для этого прудовики были разделены на две группы, условия содержания которых были выровнены по освещенности и температуре.

Улитки экспериментальной группы в течение 2 часов ползали по влажному дну прямоугольной емкости, в которую было добавлено немного воды. Низкий уровень воды вынуждал животных проявлять интенсивную (мышечную) локомоцию.

Улитки контрольной группы (физиологическая норма) подобной двигательной нагрузке не подвергались, свободно двигаясь в воде, уровень которой с избытком покрывал моллюсков.

По истечении 2 часов каждую улитку тестировали в закрытой арене, стеклянное дно которой было сухим, а одна из коротких полупрозрачных стен была освещена снаружи.

Улитки после двигательной нагрузки достоверно раньше контрольных «начинали действовать», меньше вращались, быстрее двигались и быстрее доползли до условной границы, относительно чаще в меньшем времени выбора двигаясь к источнику света (рис. 1.1).



**Рис. 1.** Треки движения моллюсков после предварительной двигательной нагрузки (В) наглядно отражают более быстрый выбор направления движения, малое число поисковых поворотов на месте, чем у моллюсков физиологической нормы (А).

Полученные результаты показывают, что двигательная нагрузка может облегчать или ускорять принятие решения у нашего модельного беспозвоночного объекта.

Найденная поведенческая модель будет использоваться для фармакологического и молекулярно-биологического анализа механизмов принятия решения и влияния двигательной нагрузки.

Установлено, что нейрон, изолированный из ЦНС, длительное время сохраняет физиологические особенности, соответствующие функциональному состоянию в ЦНС до его изоляции.

В целом, полученные в 2016 году данные согласуются с рабочей гипотезой, согласно которой эффекты влияния двигательной активности на когнитивные функции, в частности на способность принимать решения, сформировались рано в эволюции, и были затем поддержаны и усилены естественным отбором.

У млекопитающих, включая человека, двигательная активность благоприятствует выполнению ряда когнитивных функций, снижая симптомы депрессии и облегчая принятие решения.

### 1.3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог исследованиям отчетного периода, можно заключить, что полученные данные подтверждают развиваемую коллективом оригинальную гипотезу о координирующей роли нейроактивного состава межклеточной среды, который социализирует индивидуальные нейроны и удерживает их в актуальном поведенческом контексте.

### 1.4 ССЫЛКИ

1. *Haydon P. G., Winlow W.* Shell movements associated with locomotion of *Lymnaea* are driven by a central pattern generator // *Сотр. Biochem. Physiol.* -1986. - № 11. P. 335-349.
2. *Сахаров Д.А., Цыганов В.В.* Трансмиттер-зависимое включение респираторного интернейрона в локомоторный ритм у легочного моллюска *Lymnaea* // *Российский физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* - 1998. Т.84. №10. С.1029-1037.
3. *Цыганов В.В.* Нейрональные корреляты серотонин-зависимого моторного поведения прудовика *Lymnaea stagnalis* / *Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук.* 2001.
4. *Чистопольский И.А., Сахаров Д.А.* Изолированный нейрон как биосенсор, реагирующий на высвобождение нейроактивных веществ. // *Росс. физиол журн* (2007). 93(10):1210-1213.
5. *Chistopol'skii IA, Sakharov DA* Isolated neurons as biosensors responding to the release of neuroactive substances. // *Neurosci Behav Physiol.* (2008) 38(7):703-5.

## **Раздел 2. Роль экспрессии нейроспецифических генов в онтогенезе поведения.**

Одним из механизмов, лежащих в основе модификации поведения, является изменение уровня экспрессии генов, кодирующих сигнальные факторы и их рецепторные системы. При анализе транскриптома в нервной системе животных, функциональное состояние которых изменилось либо при внешнем воздействии, либо при естественной биологической смене поведения, как правило обнаруживается изменение паттерна транскрипции генов в нервных клетках (см. например, Chen et al, 2016; Mikhail et al, 2017; Lynds, 2017, Zengin-Toktas, Woolley, 2017.). Однако механизм молекулярной машины пластичности нервной системы еще недостаточно изучен. В силу этого предполагаются весьма актуальными исследования роли экспрессии нейроспецифических генов при изменении функционального состояния и в онтогенезе поведения модельных животных с хорошо описанной нейробиологией.

### **2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

#### ***Объекты исследований***

Исследования проводились на моллюсках: морском крылоногом моллюске *Clione*, наземных брюхоногих *Helix aspersa* и *Helix lucorum* и пресноводном брюхоногом моллюске *Limnaea stagnalis*.

Модельный объект – пресноводный легочный моллюск большого прудовика - *Limnaea stagnalis* в течение последних 30-ти лет успешно культивируется авторами.

Пресноводные улитки, и в частности *L. Stagnalis*, являются классическим объектом экспериментальной эмбриологии, фармакологии, а также этологии.

Вторым модельным объектом являлись близкородственные вида наземных pulmonat – два вида виноградных улиток *Helix lucorum L.* и *Helix lucorum*.

Для формирования поведенческого состояния навязанной локомоции, применялась разработанная в нашем коллективе **методика активации локомоторных усилий** нашего модельного объекта (прудовик) перемещением животного из его естественной среды (вода) на увлажненную поверхность. Как показано нами ранее, два часа навязанной «гиперлокомоции» приводят к характерному комплексу изменений в поведении прудовика: подавлению пугливости, учащению ориентировочных движений, ускорению локомоции, облегчению принятия решения, и др. Это позволяет оценивать эффект гиперлокомоции как смену поведенческого состояния. **Анализ поведения.** В нашем распоряжении имеется стандартное оборудование для видеорегистрации поведения с последующим анализом на программном обеспечении. Применялась частично оригинальная (Д.Д. Воронцов) система автоматизированной обработки

данных, основанная на известных алгоритмах, но дающая такие преимущества, как предельная гибкость в добавлении требующихся по ходу исследования возможностей.

Исследование электрической активности редуцированных препаратов изолированной ЦНС или ее фрагментов, включая изолированные нейроны, проводилось **стандартными методами нейробиологии с использованием внутриклеточных микроэлектродов**.

Для анализа экспрессии генов нейронных сетей, управляющих моторными программами поведенческих актов, использовали **метод иммуногистохимического картирования с использованием конфокального микроскопа**.

Используя **метод ПЦР-РВ** (полимеразная цепная реакция в реальном времени) создавали систему определения профиля экспрессии генов медиаторных путей нейронов, **методом синтеза библиотек кДНК** определена геновая база нейронов париетовисцерального комплекса ганглиев мозга животных с моторной нагрузкой в открытом поле (опыт) и без нее (контроль).

**Программы для дизайна** Primer Quest, Primer Express, Oligo применялись для получения последовательности праймеров ряда генов интереса.

## 2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 2013 году основной задачей исследования было изучение роли гетерохимизма нейронов для функционирования нейронных сетей, управляющих моторными программами поведенческих актов. Применяя метод иммуногистохимического картирования экспрессии генов с использованием конфокального микроскопа, мы идентифицировали отдельные гомологичные нейроны в нервной системе виноградной улитки *Helix lucorum L* и прудовика *Lymnaea stagnalis L*. Обнаружены гомогичные серотонинсодержащие группы нейронов pedalных ганглиев, контролирующих различные способы локомоции.

Показано, что влияние микрогравитации в ходе длительного космического полета на поведение виноградной улитки связано с изменением уровня экспрессии нейрон-специфических генов, кодирующих секретлируемые пептиды в сенсорных клетках органа равновесия (Асеев Н.А., и др. 2013).

В 2014 году создана система определения профиля экспрессии генов медиаторных путей нейронов на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени. Синтезирована библиотека кДНК нейронов париетовисцерального комплекса ганглиев мозга животных с моторной нагрузкой в открытом поле (опыт) и без нее (контроль). С помощью программ для дизайна праймеров (Primer Quest, Primer Express, Oligo) были получены последовательности праймеров девяти генов.

Insulin

ACCAAAGCCTTCATGGTCAC  
GCTGAAAATTGACCCTCTGC

Beta-tubulin

AGGCGGAATCCAACATGAAC  
CCCCTCAGCTTCTTCCTCATC

Tryptophan hydroxylase

TCCGTGAACTCATGAAGCTG  
CTCAACCAGGAGTGGGATGT

FMRFamide

GATCAACAGACAGCGCAGAA  
CGAATCTCCCTTGACTIONGAA

Monoamine transporter

CACCAGCGAAGGAAGAGAAAAT  
GGGCTCTTGTCATTCTGATTGTATG

Acetylcholine transporter

CGAACTGTGAGATTGGTTTGATG  
TCACCCTCTGTTGTTCCATAACTT

Glutamate transporter

GGGTGGCAGTCAGGATTCTA  
AACCTCTCCTCCTCCGATA

Dopamine decarboxylase

CAAGAAAGACAACCCCCAAA  
CAACTGATGAATGGGCCTCT

Pedal peptide

TGACTCGTCACACGGGATTA  
AGGGCAGAGAACAACCAA

Эффективность праймеров проверена методом полимеразной цепной реакции.

Для исследования были взяты праймеры девяти генов. Ген бетта-тубулина – был взят в качестве контрольного (housekeeping genes), необходимого для поддержания важнейших жизненных функций организма, который экспрессируется практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне.

В 2015 году было создано восемь библиотек к-ДНК ЦНС контрольных и опытных животных при различных физиологических нагрузках. Были синтезированы и проверены праймеры для генов FMRF-амида, транспортера ацетилхолина, допамин декарбоксилазы,

педального пептида, триптофан гидроксилазы, транспортера моноаминов, транспортера глутамата, а также housekeeping гены (домашнего хозяйства) – инсулина и бета-тубулин.

Анализ транскриптома контрольных моллюсков и моллюсков с гиперлокомоцией включал измерение транскрипционной активности следующих генов: FMRF-амида, транспортера ацетилхолина, допамин декарбоксилазы, педального пептида, триптофан гидроксилазы, транспортера моноаминов, транспортера глутамата. Нормирование экспрессии производили по бета-тубулину.

Анализ транскрипционной активности при кратковременной гиперлокомоции моллюсков (0,5 и 1 час) не показал достоверных изменений экспрессии генов FMRF-амида, транспортера ацетилхолина, допамин декарбоксилазы, педального пептида, триптофан гидроксилазы, транспортера моноаминов, транспортера глутамата, хотя долго длящиеся физиологические изменения в нейронной активности наблюдались, что потребовало дальнейших исследований.

В 2016 году для выявления генов, которые могут участвовать в формировании стабильных состояний генератора локомоции, исследовалась экспрессия ранее выбранных генов в нервной системе контрольных улиток и улиток, которым навязывали повышенную локомоторную активность (Богуславский Д.В., Захаров И.С., Успехи современной биологии 2015, Богуславский Д.В., Захаров И.С. Молодые ученые медицины. 2015).

В независимой работе сотрудников нашей группы (Korshunova T.A., Vorontsov D.D. and Dyakonova V.E., 2016), была исследована поведенческая модель гиперлокомоции, в основе которой лежит включение поведенческой программы активного избегания или ориентировочно-поискового поведения при попадании моллюска в низкую воду, когда вода покрывает лишь нижнюю часть ноги.

Это потенциально опасное положение вынуждает животное совершать практически непрерывное перемещение в поисках более глубокой области водоема.

Для параллельно реализуемого проекта, которым руководит Д.А. Сахаров (раздел 1 темы), и в котором принимают участие некоторые из исполнителей настоящего проекта, было существенно установить временные рамки изменения экспрессии выбранных генов, кодирующих ряд существенно важных трансммиттеров.

Было получено, что заметное возрастание экспрессии некоторых из целевых генов наблюдается при локомоции животного в течение часа. Этим временным интервалом воспользовались при выполнении нашего проекта.

Изменения экспрессии данных девяти генов в зависимости от продолжительности активности прудовика оценивали с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени.

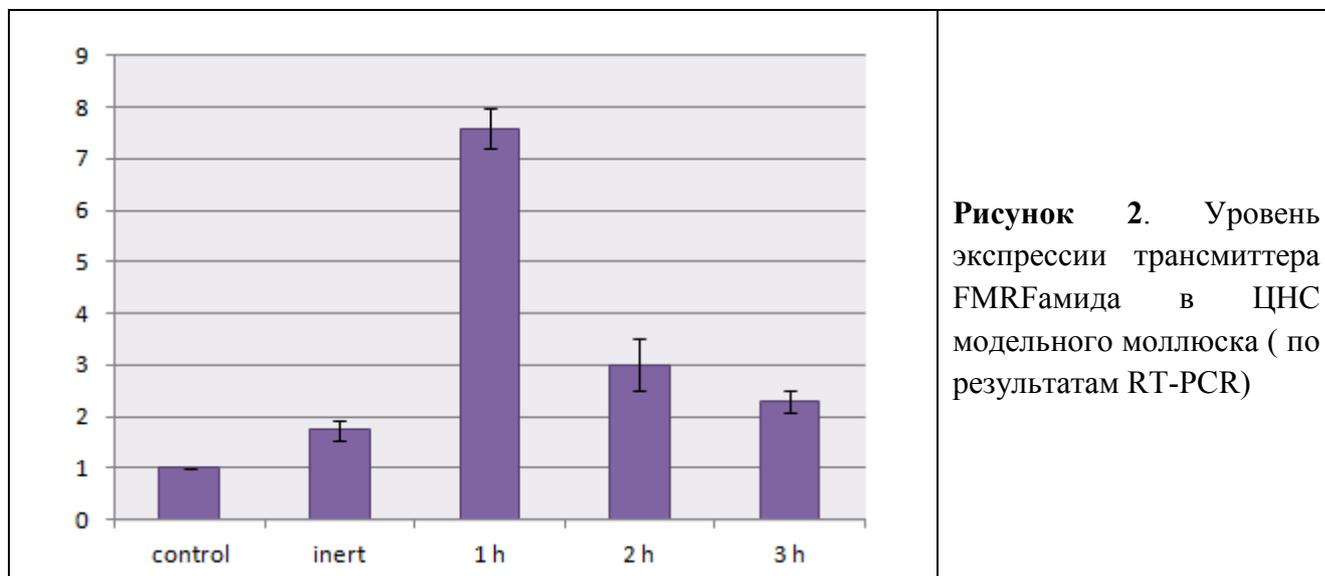
Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (RT-PCR) была выполнена на гибридайзере StepOne Plus (Applied biosystems, США), который оснащен модифицированным термоблоком VeriFlex, состоящим из шести независимо программируемых модулей, объединенных в стандартном 96-ти луночном формате, и обладающим возможностью детекции четырех красителей.

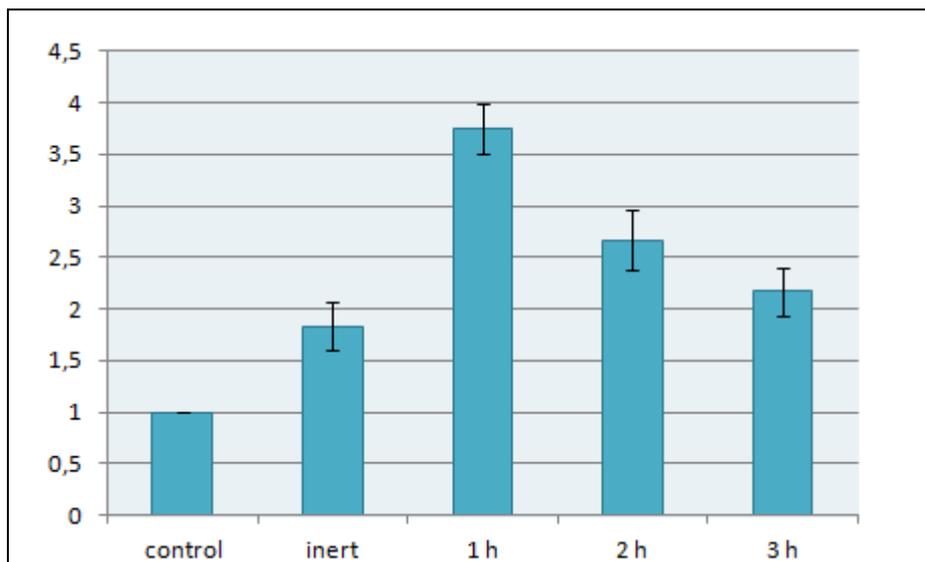
Нормирование экспрессии производили по бета-тубулину. Детекцию продуктов ПЦР осуществляли в реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I и референсного красителя ROX компании Синтол.

Была изучена экспрессия в ЦНС в трех временных точках – через 1 час, 2 часа и 3 часа после начала активности.

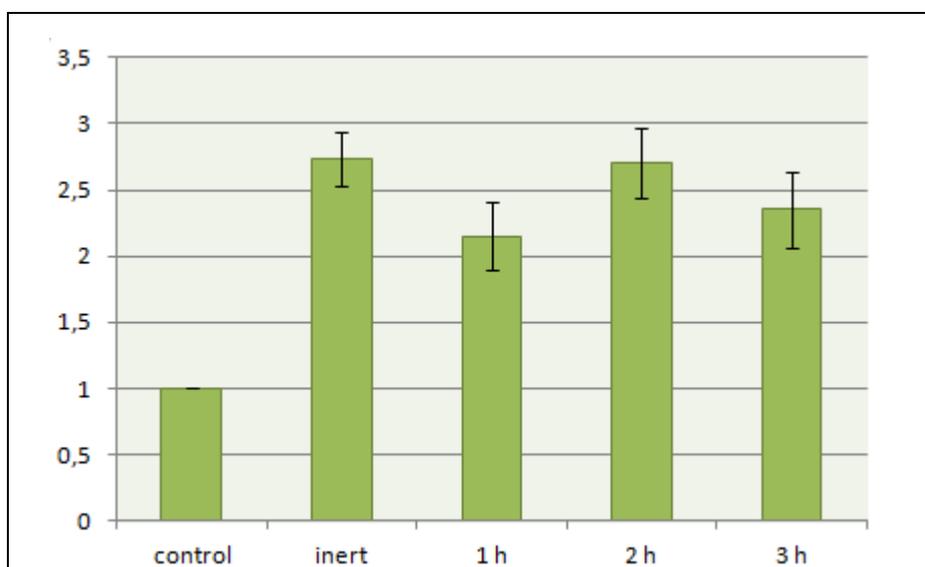
На представленных рисунках были возможности провести измерения экспрессии ферментов синтеза интересующих транмиттеров и их ведущих транспортеров.

Экспрессия существенно изменяется уже через час (рис.2 и 3) для транмиттера – FMRFамида и фермента синтеза другого медиатора - дофамина дофаминдекарбоксилазы, тогда как активность транспортеров катехоламинов и моноаминов (рис. 4 и 5), а также ключевого базового фермента синтеза серотонина – триптофан гидроксилазы (рис. 6) повышается через 2-3 часа после начала активности.

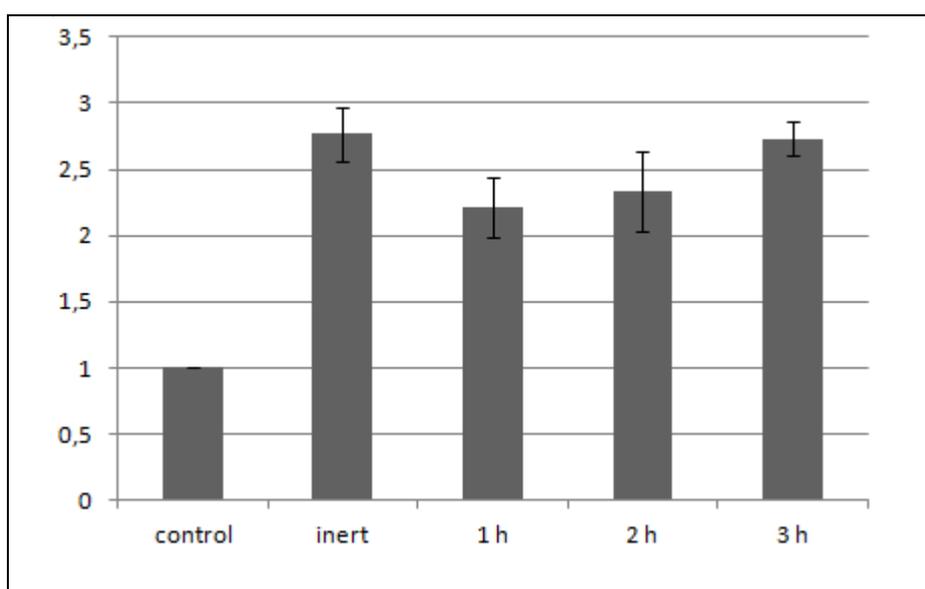




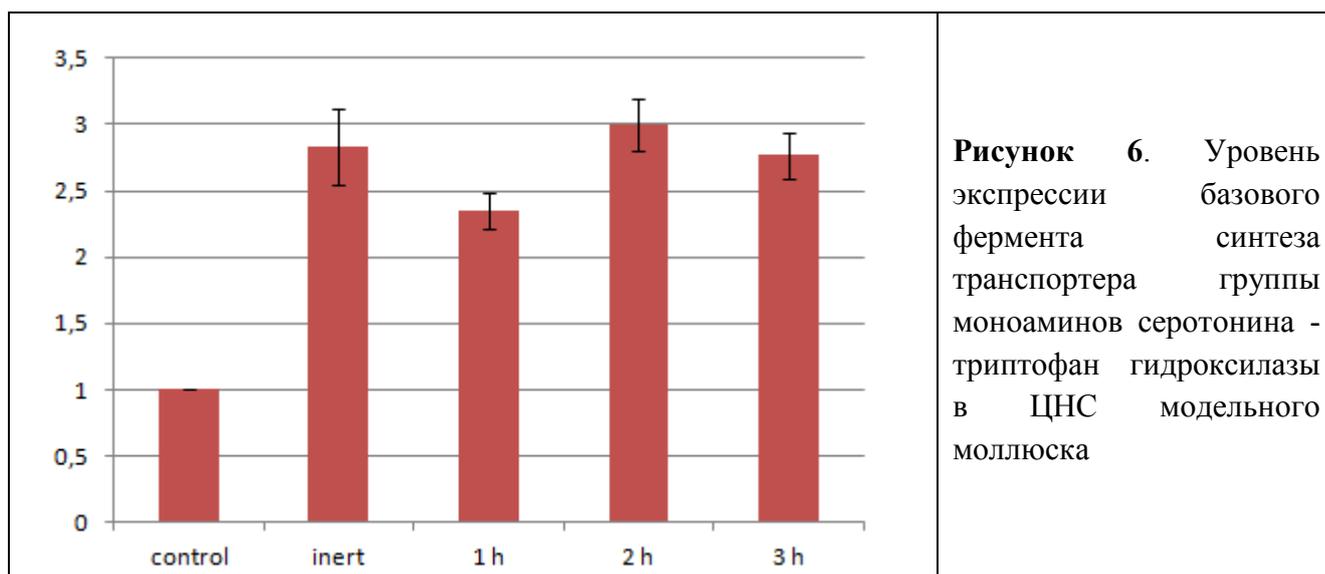
**Рисунок 3.** Уровень экспрессии фермента синтеза дофамина – дофамин декарбоксилазы в ЦНС модельного моллюска



**Рисунок 4.** Уровень экспрессии транмиттера группы катехоламинов - ацетилхолина в ЦНС модельного моллюска



**Рисунок 5.** Уровень экспрессии транспортера транмиттеров группы моноаминов (серотонина, дофамина) в ЦНС модельного моллюска



**Рисунок 6.** Уровень экспрессии базового фермента синтеза транспортера группы моноаминов серотонина - триптофан гидроксилазы в ЦНС модельного моллюска

На втором этапе исследований стояла задача локализовать область в ЦНС моллюска, в которой происходит изменение экспрессии после часовой активности.

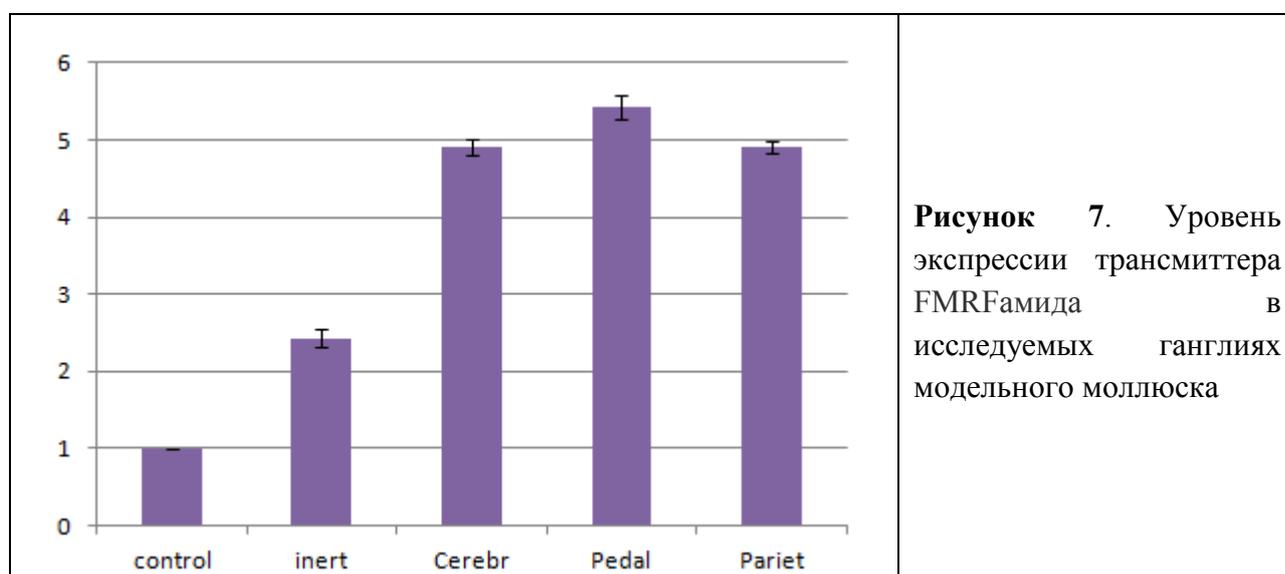
Для исследований нами было взято по три парных ганглия – церебральный, pedalный и париетальный.

Эти ганглии у данного модельного моллюска были выбраны по двум основным соображениям:

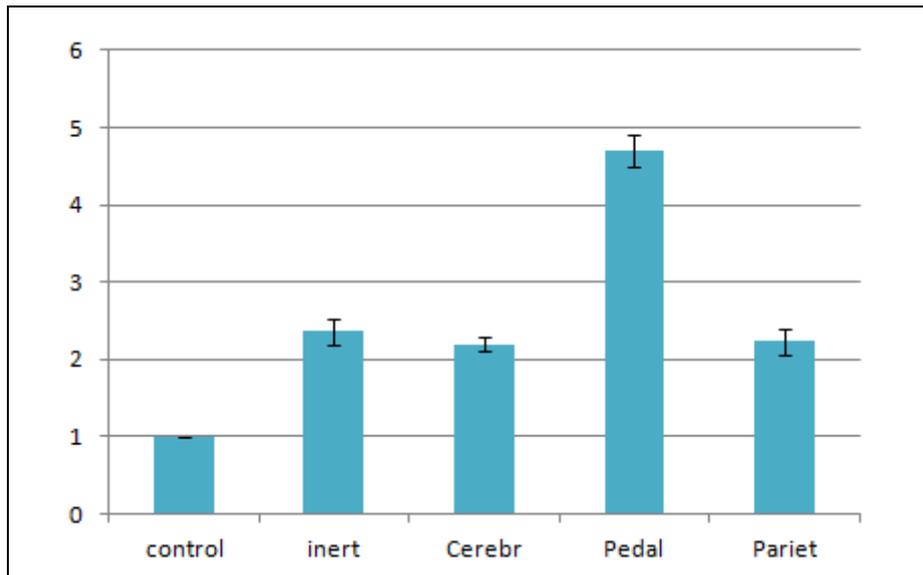
во-первых, в этих трех ганглиях значительное число нервных клеток картировано, что могло быть полезно при дальнейшем уточнении пула активирующихся нервных мишеней;

во-вторых, с позиций концепции клеточного генератора исследуемые функции перспективно локализованы именно в этих трех ганглиях модельного объекта.

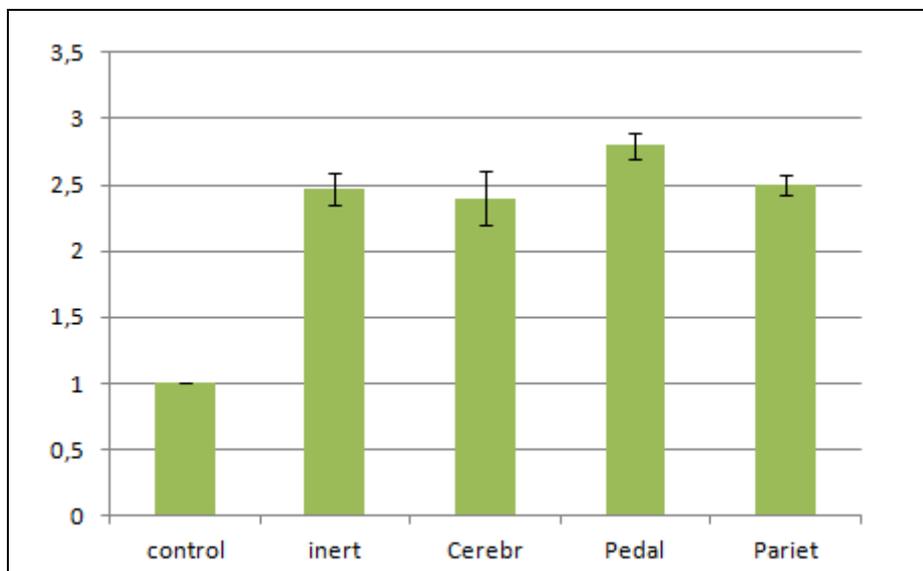
По результатам ПЦР видно, что изменения экспрессии изучаемых генов происходят в основном в pedalном ганглии (рис. 7, 8, 9, 10, 11).



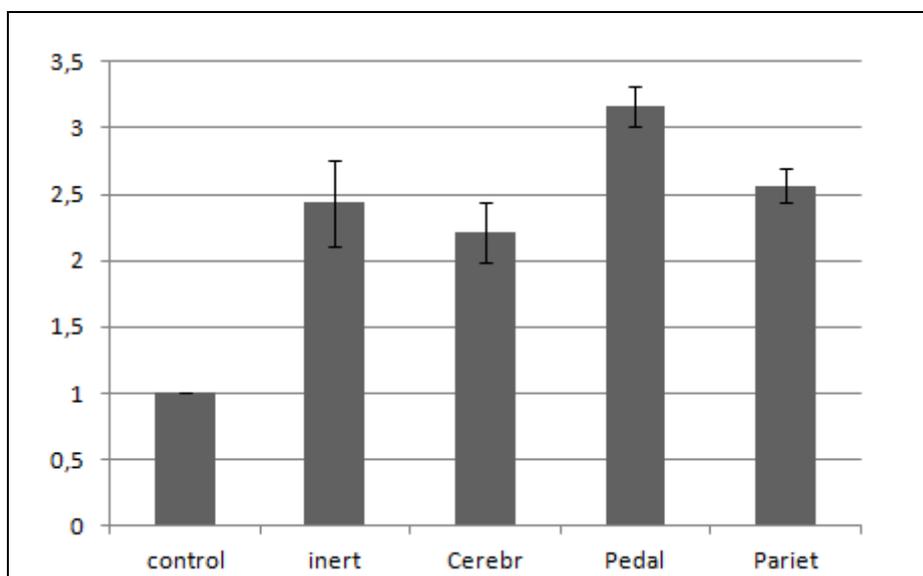
**Рисунок 7.** Уровень экспрессии транмиттера FMRFамида в исследуемых ганглиях модельного моллюска



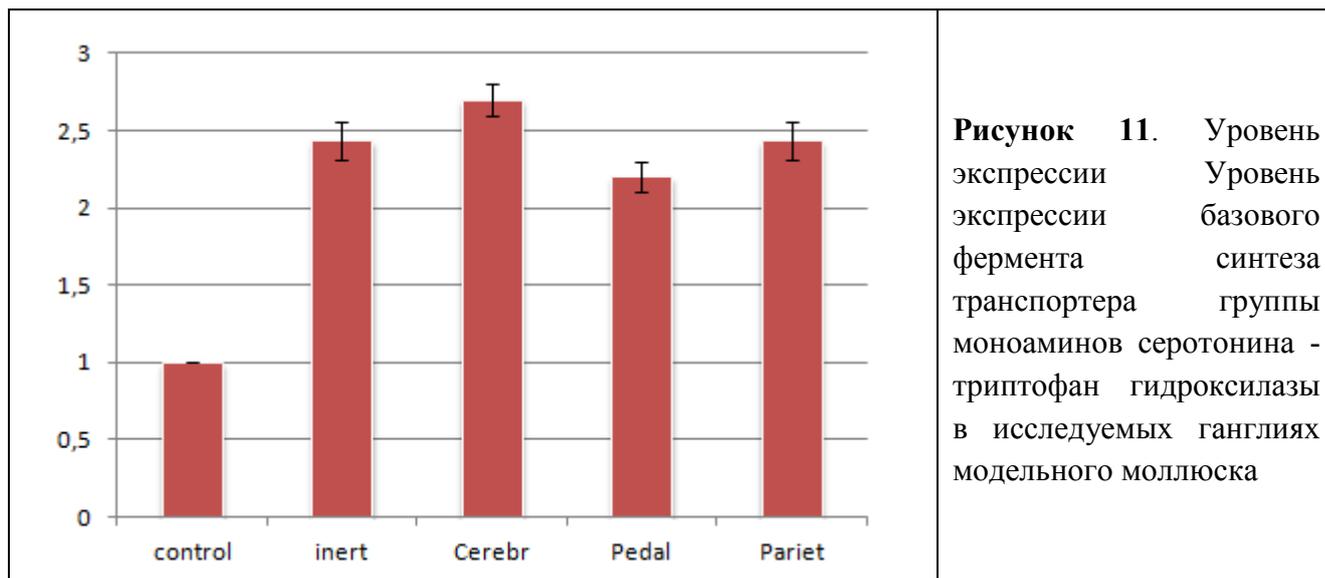
**Рисунок 8.** Уровень экспрессии фермента синтеза дофамина – дофамин декарбоксилазы в исследуемых ганглиях модельного моллюска



**Рисунок 9.** Уровень экспрессии транмиттера группы катехоламинов - ацетилхолина в исследуемых ганглиях модельного моллюска



**Рисунок 10.** Уровень экспрессии транспортера транмиттеров группы моноаминов (серотонина, дофамина) в исследуемых ганглиях модельного моллюска



**Рисунок 11.** Уровень экспрессии фермента транспортера моноаминов серотонина - триптофан гидроксилазы в исследуемых ганглиях модельного моллюска

### 2.3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прежде всего, следует отметить увеличение экспрессии гена, кодирующего FMRF амид – пептид, играющий важную роль в регуляции сердечной деятельности, дыхательной ритмики и двигательной активности. Кроме того, эти данные косвенно подтверждают гипотезу авторов о том, что FMRFамидергическая система принимает участие в реализации не только оборонительного поведения, но и поискового. Существенно, что FMRF амидергические нейроны хорошо описаны, многие из них идентифицированы. Это дает основание рассчитывать на успех в экспериментах на уровне отдельных нейронов.

Схожие функции выполняют и катехоламины, ключевым ферментом синтеза которых является дофамин декарбоксилаза. В отношении катехоламинергической системы полученные результаты в еще большей степени позволяют локализовать процессы, поскольку в ЦНС улитки, так как есть очень ограниченное число тел катехоламинергических нейронов. В частности, можно с большой уверенностью предполагать, что изменение уровня экспрессии декарбоксилазы в педальном ганглии обязано активности гигантского педального дофаминового нейрона, принимающего участие в контроле дыхательных движений улитки.

По результатам 2016 года готовится публикация. Полученные результаты показывают перспективность этого направления исследований, позволяя сформировать интегрированные представления о механизмах регуляции различных по иерархии и клеточной организации программ поведения.

## 2.4 ССЫЛКИ

1. Chen , Rahman , Guo, Rosbash. Genome-wide identification of neuronal activity-regulated genes in *Drosophila* // *Elife*. 2016 Dec 9;5. pii: e19942.
2. *Mikhail, Vaucher, Jimenez, Tafti*. ERK signaling pathway regulates sleep duration through activity-induced gene expression during wakefulness // *Sci Signal*. 2017 Jan 24;10(463). pii: eaai9219.
3. *Lynds, C. Lyu, G. Lyu, Shi, Rosén, Mustafa, Shi*. Neuronal plasticity of trigeminal ganglia in mice following nerve injury // *J. Pain Research*. 2017;10 349–357.
4. *Zengin-Toktas, Woolley*. Singing modulates parvalbumin interneurons throughout songbird forebrain vocal control circuitry // *PLoS ONE* 2017. 12(2): e0172944.

### **Раздел 3. Нейрогуморальная регуляция развития и формирования адаптивных программ на примере личинок водных беспозвоночных и низших позвоночных.**

Моноаминергическая система в классическом понимании – это комплекс из низкомолекулярного медиатора – биогенного амина, ферментов его обмена и рецепторов. По сути, именно через моноамины осуществляется значительная часть интеграционных функций организма. Это делает низкомолекулярные медиаторные и эндокринные молекулы одним из важнейших компонентов, определяющих адаптационные способности организма в непрерывно меняющихся условиях окружающей среды. Подобные адаптации выражаются во множестве изменений, происходящих в организме на протяжении всей жизни, как на уровне физиологии центральной нервной системы (память, обучение, эмоциональное состояние), так и во множестве самых разнообразных периферических процессов (иммунные реакции, воспаление, гормональные регуляции).

Каждый год выходит огромное количество работ, посвящённых регуляторным функциям моноаминов, ферментов их синтеза и деградации, транспортеров и рецепторов. Была показана роль серотонина и дофамина не только как классических нейромедиаторов, но и как факторов, участвующих в регуляции развития (Voronezhskaya et al., 2004), а также гуморальных факторов, регулирующих течение самых разных процессов, начиная с ранних стадий органогенеза (Levin et al., 2006) и заканчивая нормальными и патологическими процессами во взрослых организмах (Berger et al., 2009). Одним из наиболее изученных моноаминов является серотонин. Известно, что серотонин широко распространён среди эукариот. В том числе он выполняет регуляторные функции у растений (Murch et al., 2001), одноклеточных простейших (McGowan et al., 1983) и примитивных многоклеточных животных, не имеющих нервной системы (Czaker, 2006).

Обнаружено, что моноамины и другие низкомолекулярные вещества, являющиеся нейромедиаторами, присутствуют на стадиях раннего развития задолго до появления нервной системы (Numanoi, 1955; Бузников, Манухин, 1961). В дальнейшем было показано, что серотонин содержится в ооцитах и дробящихся эмбрионах животных самой разной систематической принадлежности: полихет (Emanuelsson, 1974), немертин, (Buznikov et al., 1964) голожаберных моллюсков (Buznikov et al., 2003); головохордовых (Candiani et al., 2001), иглокожих, костистых рыб (Buznikov et al., 1964), амфибий (Fukumoto et al., 2005a), птиц (Emanuelsson, 1988) и млекопитающих (Basu et al., 2008). В экспериментальных работах было продемонстрировано, что моноамины вовлечены в регуляцию широкого спектра процессов на донервных стадиях развития у самых разных животных (см. обзор Buznikov et al., 2001). Для некоторых случаев показано, что на ранних стадиях развития серотонин и дофамин действуют как нейрогормоны, воспринимаемые клетками-мишенями (Ugrumov, 1997, Угрюмов, 1999). Несмотря на растущее количество

экспериментальных работ, многие наблюдаемые факты в эффектах действия моноаминергических систем на ранних, донервных стадиях развития, до сих пор не имеют веского теоретического обоснования.

Большинство работ, посвящённых роли моноаминов в процессах развития, выполняется преимущественно в рамках парадигмы их рецепторного действия. Однако в последние десятилетия было показано, что подобные механизмы также включают в себя сложные многокомпонентные системы, в которых важную роль играет баланс моноаминов внутри и снаружи клеток, уровень моноаминов в разных бластомерах в критические периоды развития (Fukumoto et al., 2005; Levin et al., 2006; Duerschmied and Bode, 2009). Такие системы могут существовать как в пределах единичных клеток, так и быть разнесены на тканевом, органном и даже организменном уровне (Paulmann et al., 2009), позволяя говорить о моноаминах как о системных интегративных модуляторах (Sakharov, 1990). Такие идеи высказывались и раньше для нейральных процессов (Сахаров, 1990; Сахаров, 2012), однако именно сейчас они получают всё больше экспериментальных подтверждений и распространяются также на процессы, реализующиеся на самых ранних, донервных стадиях развития (Ivashkin et al., 2015). В этом контексте, развитие является одним из ключевых моментов реализации подобных адаптивных регуляций.

Беспозвоночные животные давно зарекомендовали себя как удобные модели для исследования базовых механизмов развития и формирования поведения, вплоть до его высшего проявления - обучения и памяти (например, Raven, 1958; Мещеряков, 1975; Кандель, 2011). Их зародыши удобны для различных экспериментальных манипуляций, а ограниченный набор поведенческих паттернов достаточно подробно изучен.

Совершенствование техники иммунохимического маркирования нейрональных элементов и микроскопирования привело к появлению большого количества работ, детально описывающих морфологию личинок. Эта стадия развития в жизненном цикле животных издавна привлекала внимание исследователей. С одной стороны, в процессе онтогенеза раскрываются черты филогенетической истории группы. С другой стороны, сравнительные проявляются паттерны, общие для древнего гипотетического предка. На основе полученных данных делаются предположения о родстве или множественности происхождения различных групп. Важную роль в таких исследованиях традиционно отводится строению и порядку формирования нервной системы – как одной из наиболее консервативных в организме личинки и наименее подверженных модификациям со стороны внешних условий. Подробные описания возникновения нервной системы личинки, с точностью до единичных нейронов и их взаимоотношений, позволяют выявить общие принципы, по которым строится нервная система. Определить консервативные клеточные и молекулярные механизмы, задействованные на самых ранних этапах нейрогенеза,

установить взаимодействие нервных и локомоторных элементов, лежащее в основе формирования поведенческих паттернов у зародышей и взрослых животных.

### **3.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

#### ***Объекты исследований***

Работу проводили на лабораторной культуре развивающихся эмбрионов модельных видов водных животных: пресноводных моллюсков: аквариумной катушки - *Helisoma trivolvis*, большого прудовика - *Lymnaea stagnalis*, архианнелид - *Dinophilys gyrociliatus* и *Dinophilys taeniatus*.

Пресноводные улитки *H. trivolvis* и *L. stagnalis* представляют собой чрезвычайно удобный объект для экспериментальной эмбриологии и фармакологии. Сигнал, вызывающий торможение развития, сенсорные нейроны, которые воспринимают этот сигнал, действующий нейромедиатор и конечный эффект известны для обоих видов и могут быть смоделированы в эксперименте.

Морские архианнелиды *Dinophilus* – это модельный объект, чья популярность стремительно растет.

Этих животных можно содержать в лабораторной культуре без доступа к морю, и они размножаются круглый год. При этом, одна самка регулярно откладывает яйца, предоставляя необходимое количество синхронно развивающихся эмбрионов для экспериментов.

Тип развития считается во многом анцестральным для трохофорных животных, эмбрионы крупные и прозрачные, фармакологические, иммунохимические методы и *in situ* гибридизация хорошо работают на всех стадиях развития. Этих животных давно содержат в лабораторных культурах, а геном недавно расшифрован и считается самым маленьким из известных к настоящему времени геномов аннелид.

#### ***Визуализация нейрональных, ресничных и мышечных элементов.***

Для визуализации нервных, мышечных и ресничных структур применены современные методы иммуноцитохимического и гистохимического маркирования в сочетании с лазерной сканирующей конфокальной микроскопией и последующим 3D моделированием. До появления этих методов изучение личинок и зародышей моллюсков было затруднено из-за их малых размеров.

В качестве нейрональных маркеров использованы коммерческие антитела против ацетилированного тубулина, нейропептида FMRFамида и нейромедиатора серотонина. Ранее нами было показано (Croll, Voronezhskaya, 1996), и в дальнейшем подтверждено многими авторами, что иммунореакция с антителами против нейромедиаторов FMRFамида и серотонина выявляет самые первые элементы нервной системы (тела нейронов и их отростки), и, кроме того, является хорошим маркером для формирующихся сенсорных структур, ганглиев дефинитивной центральной нервной системы и соединяющих их путей.

Этот подход дает возможность детально изучить возникновение и развитие сенсорных и центральных нервных структур зародыша на уровне одиночных идентифицированных нейронов.

Антитела против ацетилированного тубулина маркируют нейротубулы в отростках нейронов и цитоскелет ресничек, позволяя выявить общие контуры нервной системы и ресничные структуры. Двойное иммуномечение, сочетающее окраску нейрональных элементов и элементов цитоскелета, позволит определить взаимное расположение и морфологическую взаимосвязь этих структур.

Для изучения появления и развития нервных элементов, содержащих катехоламины (дофамин и/или норадреналин) проводилась гистохимическая реакция с глиоксиловой кислотой или формальдегид глутаром. К сожалению, эти гистохимические реакции невозможно комбинировать с иммуоцитохимическими.

Мышечные структуры маркированы антителами против мышечных белков миозина, парамиозина и твитчина, а также коммерческим фаллоидином с флуоресцентной меткой, который связывается с F-актином. Двойное и тройное иммуномечение позволило определять взаимное расположение нервных, ресничных и мышечных элементов.

Для изучения функций нервно-мышечного апикального комплекса в развитии личинок, активность нейронов и мышечных волокон использовался метод фармакологического модулирования.

Для этого проводилась инкубация личинок в соответствующих фармакологических агентах (агонистах, антагонистах, блокаторах рецепторов и ферментов их синтеза, ингибиторах сборки мышечных белков и сократительной активности миофибрилл).

При этом осуществлялось визуальное наблюдение и видеозапись подвергшихся воздействию личинок, определялись вызванные отклонения в темпах развития и поведении.

Последующий морфологический анализ строения нервной и мышечной систем выявлял изменения, индуцированные конкретными воздействиями.

#### ***Регистрация развивающихся личинок.***

Авторами разработаны новые методы долговременного наблюдения и видеорегистрации индивидуальных развивающихся эмбрионов (до 1 месяца) в поведенческих, фармакологических и физиологических экспериментах.

Для этого используется видеоустановка, легко монтирующаяся на микроскоп или бинокулярную лупу. Полученное изображение захватывается CCD видеокамерой и записывается в виде avi файлов.

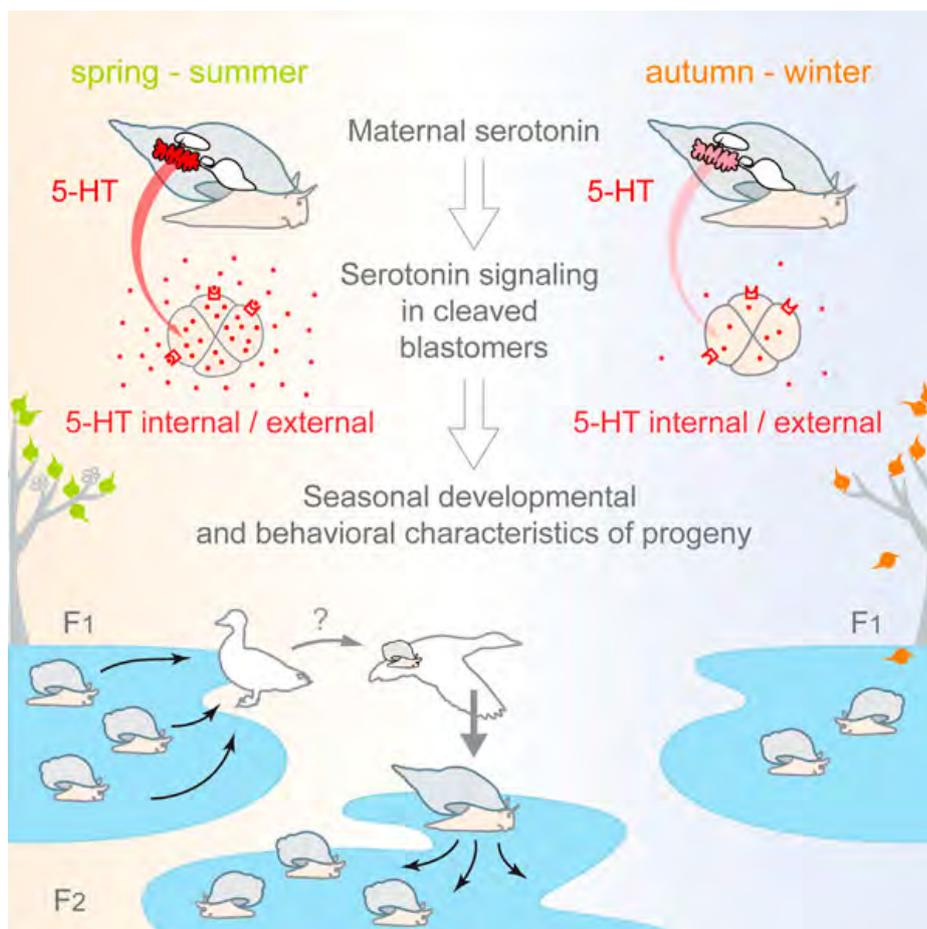
В дальнейшем полученное изображение можно обрабатывать с использованием стандартных программ для обработки видеоизображения, а также проводить необходимые подсчеты и измерения (Ivashkin, Khabarova et al., Cell Reports, 2015).

### 3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено комплексное исследование роли серотонинергической системы на ранних донервных стадиях развития.

На модели пресноводного моллюска большого прудовика – *Lymnaea stagnalis* - разобран полный цикл участия серотонинергической системы в процессах морфогенеза и формирования поведения.

Выявлены сезонные колебания уровня серотонина (5-НТ) в репродуктивной системе материнского организма, обеспечивающие модуляцию уровня 5-НТ в дробящихся бластомерах, который, в свою очередь, оказывает отставленные долговременные эффекты на прохождение морфогенеза эмбрионами и поведение ювенильных особей. На основе предложенной модели 5-НТР-индуцированной мальформации доказана функциональная активность ферментов синтеза 5-НТ, инвертированная работа транспортера 5-НТ на донервных стадиях развития, активность мембранного 5-НТ<sub>2</sub> рецептора (рис. 12).



**Рисунок 12.** Схема, объясняющая различие в поведении улиток, вылупившихся из яйца в разное время года.

Весной и летом серотонина (5-НТ) в клетках матки прудовика (выделено красным) много. Серотонилирование в бластомерах зародышей (F1), определяет их активное поведение и

стремление к расселению (переносчики птицы). Происходит освоение потомками (F2) новых водоемов. Зимой и осенью серотонина (5-НТ) в клетках матки прудовика (выделен розовым) мало, из-за чего осеннее потомство менее мобильно. (По материалам статьи Ivashkin, Khabarova et al., Cell Reports, 2015).

Впервые получены данные о возможности серотонилирования (необратимой посттрансляционной модификации) белков при определенном уровне 5-НТ внутри и снаружи клетки. Обнаружено, что от уровня серотонина в половой системе матери зависят темпы развития и характер поведения молодых особей.

Впервые в экспериментах *in vivo* продемонстрировано значение новой посттрансляционной модификации белков – серотонилирования – для реализации обнаруженных модуляций. В естественных условиях выявленная адаптация является сезонной и позволяет зародышу максимально точно приспособиться к условиям среды, с которыми он встретится только после рождения или вылупления (рис. 12).

Консервативность серотонинергической системы позволяет предположить универсальность обнаруженного механизма в реализации раннего «программирования» развития и поведения.

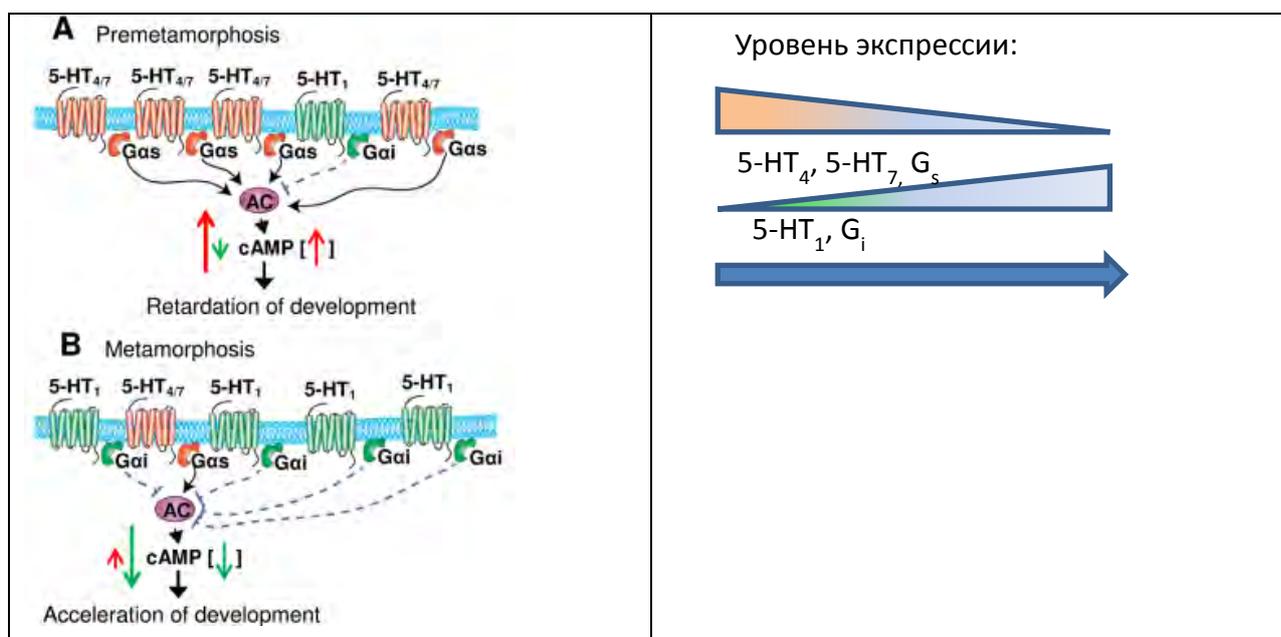
При экспериментальном исследовании зародышей моллюсков *Helisoma trivolvis* установлен механизм интегрирующей роли серотонина в процессе развития.

Раскрыт клеточный и молекулярный механизм, лежащий в основе взаимодействия «взрослый-зародыш», при котором химический сигнал, выделяемый взрослыми особями при голодании, модулирует темпы зародышевого развития.

Сигнальный фактор активирует апикальные нейроны личинки, которые выбрасывают серотонин (5-НТ), который замедляет развитие личинок премеаморфных стадий и ускоряет развитие на стадии метаморфоза. Три типа 5-НТ рецепторов (5-НТ1-, 5-НТ4- и 5-НТ7-подобные) ответственны за эффекты серотонина в развитии.

Активация 5-НТ1-подобного рецептора ускоряет развитие, в то время как активация 5-НТ4- и 5-НТ7-подобного замедляет развитие, путем увеличения продукции сАМР.

В процессе развития паттерн экспрессии 5-НТ рецепторов и соответствующих им G белков изменяются скоординированным образом. На премеаморфных стадиях (трохофора) преобладают 5-НТ7 рецепторы и соответствующие Gαs белки. Непосредственно перед метаморфозом (стадия среднего велигера) начинает расти экспрессия 5-НТ1 рецепторов и Gαi белков (рис. 13).



**Рисунок 13.** Схематическое представление уровня экспрессии 5-НТ рецепторов, связанных с ними G белков и вторичных посредников в процессе развития.

Смена паттерна рецепторов лежит в основе перехода из некомпетентного к метаморфозу велигеру к компетентному. Количественное изменение уровня различных рецепторов серотонина на претаморфных (А) и метаморфных (В) стадиях развития моллюска *Helisoma trivolvis* обеспечивает результирующее направление модуляции темпов развития (ускорение или замедление) в зависимости от стадии развития (Glebov, Voronezhskaya et al., BMC Dev. Biol., 2014).

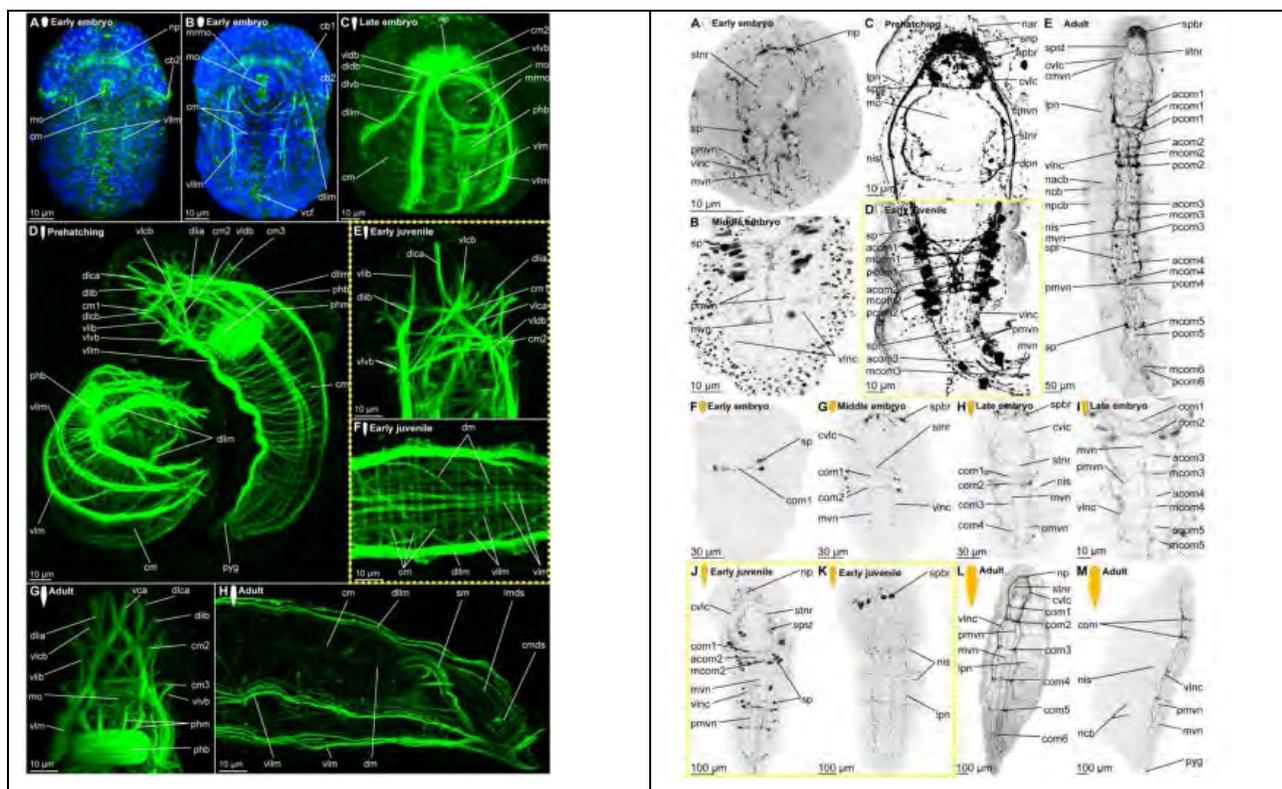
Рецептор-зависимое изменение в частоте клеточных делений позитивно коррелирует с темпами роста. Описанные изменения в экспрессии определенных компонентов серотонинергической системы представляет новый молекулярный механизм, с помощью которого 5-НТ модулирует личиночное развитие в двух противоположных направлениях в зависимости от стадии, на которой находится личинка.

Переключение в стадию «компетентной личинки», когда она может определенным образом отреагировать на внешний индуктор метаморфоза, может наступить при изменении паттерна экспрессии определенных серотониновых рецепторов и соответствующих внутриклеточных вторичных посредников.

Полученные результаты легли в основу разработанной методики модуляции продолжительности развития и увеличения выживаемости личинок промысловых видов двустворчатых моллюсков (Патент РФ 2014).

Разобран в деталях сценарий нейрогенеза и миогенеза двух видов динофилид. *Dinophilidae* - уникальной группой полихет, представители которой сочетают морфологические особенности различных таксонов Lophotrochozoa. Кроме того, взрослые динофилиды обладают признаками личинки трохофоры. Такие особенности могут быть связаны либо с архаичным происхождением этой группы или неотенией. Исследовали в деталях ранние этапы нейрогенеза двух видов динофилид: *Dinophilus taeniatus* и *Dinophilus gyrociliatus*.

В отличие от всех изученных к настоящему моменту представителей Lophotrochozoa, самые ранние нейроны, появляющиеся в развитии динофилид и маркирующие контуры формирующейся нервной системы, содержат биологически активное вещество, отличное от 5-HT и FMRFамида. *D.gyrociliatus* – вид с ярко выраженными чертами пedomорфоза – имеет более примитивную организацию эмбриональной нервной и мышечной систем (рис. 14) по сравнению с *D.taeniatus*, у которого нервная система централизована и характеризуется наличием ортогона.



**Рисунок 14.** Формирование мышечной (слева) и нервной (справа) систем у архианнелиды *Dinophilus gyrociliatus*. (Kerbl, Fofanova et al., Front. Zool., 2016).

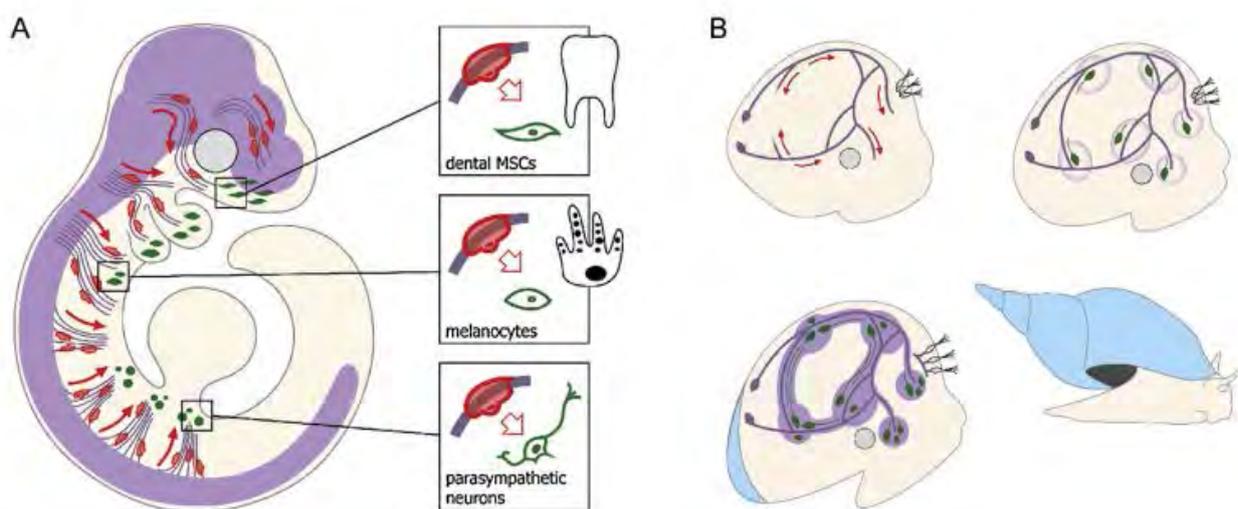
Это может свидетельствовать об общем упрощении и ювенилизации *D.gyrociliatus*, достигшего в ходе эволюции высокой специализации за счёт пedomорфоза. *D.taeniatus* ближе к предковой форме, чем *D.gyrociliatus*, поскольку характеризуется более архаичной закладкой нейропиля (сходной с плоскими червями).

Частичная сегментация и олигомерия может подтверждать расположение Dinophilidae в корне эволюционного древа Annelida.

Продемонстрировано сходство в принципах дифференцировки ранних нейронов у позвоночных и беспозвоночных трохофорных животных.

В случае позвоночных животных формирующиеся нервы зародыша несут на себе Шванновские клетки-предшественники, которые при достижении определенного места в теле зародыша покидают нерв и дифференцируются в соответствующие парасимпатические нейроны, дающие начало парасимпатическим ганглиям.

У беспозвоночных периферические сенсорные нейроны посылают отростки, которые маркируют места будущей дифференцировки клеток в центральных ганглиях (рис. 15).



**Рисунок 15.** Схема, иллюстрирующая участие отростков пионерных нейронов в качестве проводящих путей для дифференцирующихся нервных клеток.

(А) Формирование парасимпатических элементов нервной системы у позвоночных из Шванновских клеток-предшественников.

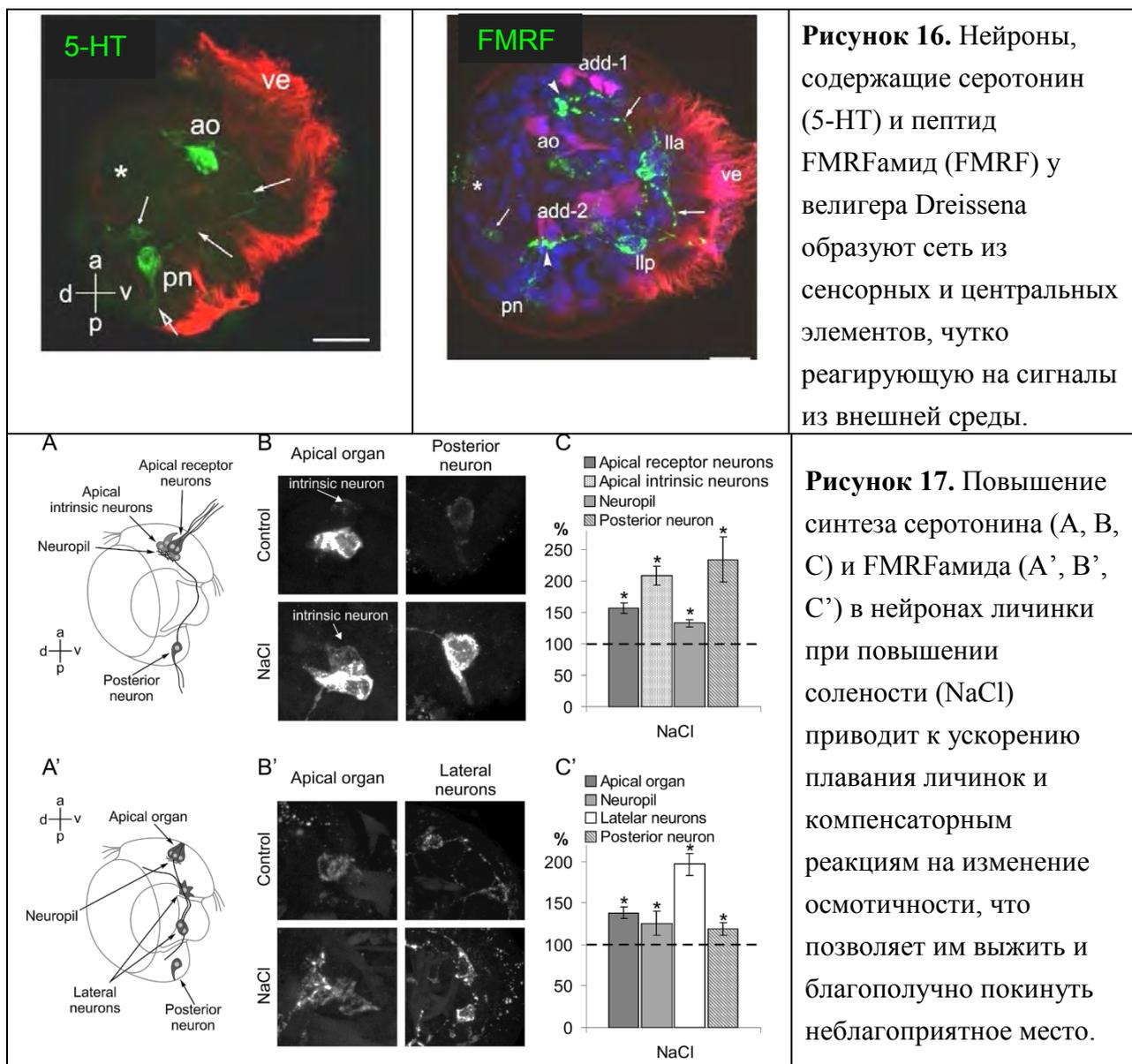
(В) Формирование центральных ганглиев у беспозвоночных трохофорных животных на основе отростков ранних сенсорных пионерных нейронов (Adameyko et al., Zoology, 2014).

Определен механизм ключевой адаптации, которая позволяет пресноводному двустворчатому моллюску дрейсене (*Dreissena*) агрессивно распространяться в пресных и солоноватых водоемах, вытесняя эндемичные виды, меняя экологические сообщества и нанося вред водным сооружениям.

Впервые показано (совместно с сотрудниками Балатонского центра Экологических исследований Венгерской Академии Наук), что в отличие от всех других пресноводных

двустворок, личинки дрейсен имеют развитую нервную систему уже на самых ранних этапах развития (рис. 16, 17).

Личиночные нейроны, содержащие серотонин (5-НТ) и пептид FMRFамид (FMRF), увеличивают синтез специфических медиаторов при неблагоприятных условиях среды (изменение солености) (рис. 17), позволяя личинкам адаптироваться в широком диапазоне изменений и обеспечивая максимальное расселение вида.



Фундаментальные знания о генезе нервной системы личинок дрейсен позволят разработать новые экологические стратегии для остановки распространения этого опасного инвазивного вида-обработателя.

### 3.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе анализа полученных результатов по проведению комплексного исследования роли серотонинергической системы на ранних донервных стадиях развития, роли серотонина в реализации значимых адаптивных программ коммуникации «мать-зародыш», а также «взрослый-зародыш», роли формирующейся нервной системы в развитии организма, выявлены перспективные задачи для дальнейших исследований в рамках этой актуальной области современной развития биологии:

- попытаться экспериментально выяснить роль посттрансляционных модификаций моноаминов (в частности, серотонина - серотонилирования) в различных процессах генеза и адаптаций, которые, как обосновывают полученные результаты, базируются на процессах памяти. Решение этой задачи непосредственно связано с поиском перспективных моделей (объектов, этапов онтогенеза и процессов, в основе которых происходит серотонилирование);
- продолжить исследование по определению консервативных клеточных и молекулярных механизмов, задействованных на самых ранних этапах нейрогенеза, чтобы в пространственно-временных этапах установить взаимодействие нервных и локомоторных элементов, на основе которых происходит формирование поведенческих паттернов у зародышей и взрослых животных.

### 3.4 ССЫЛКИ

1. *Basu B., Desai R., Balaji J., Chaerkady R., Sriram V., Maiti S., Panicker M. M.* Serotonin in pre-implantation mouse embryos is localized to the mitochondria and can modulate mitochondrial potential // *Reproduction*. – 2008. –135(5). – P. 657-69.
2. *Berger M., Gray J.A., Roth B.L.* The expanded biology of serotonin // *Annu Rev Med*. – 2009. – № 60. – P. 355-66.
3. *Buznikov G. A., Chudakova I. V., Zvezdina N. D.* The role of neurohumours in early embryogenesis. I. Serotonin content of developing embryos of sea urchin and loach // *J Embr Exp Morph*. – 1964. – 12(4). – P. 563-573.
4. *Buznikov G.A., Lambert HW, Lauder JM.* Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis // *Cell Tissue Res*. – 2001. - 305(2):177-86.
5. *Buznikov, G.A., Nikitina, L.A., Voronezhskaya, E.E., Bezuglov, V.V., Willows, A.D., and Nezhlin, L.P.* Localization of serotonin and its possible role in early embryos of *Tritonia diomedea* (Mollusca: Nudibranchia) // *Cell and tissue research* – 2003. - № 311, 259-266.

6. *Candiani S., Augello A., Oliveri D., Passalacqua M., Pennati R., De Bernardi F., Pestarino M.* Immunocytochemical localization of serotonin in embryos, larvae and adults of the lancelet, *Branchiostoma floridae* // *Histochem J.* – 2001. – № 33 – P. 413–420.
7. *Croll R.P., Voronezhskaya E.E.* Early elements in gastropod neurogenesis // *Dev. Biol.* - 1996. -№ 173. – P. 344-347.
8. *Czaker R.* Serotonin immunoreactivity in a highly enigmatic metazoan phylum, the pre-nervous Dicyemid // *Cell Tiss Res.* – 2006. – 326 (3). – P. 843-850.
9. *Duerschmied D. and Bode C.* The role of serotonin in haemostasis // *Hamostaseologie.* – 2009. – 29(4). – P. 356-359.
10. *Emanuelsson H.* Localization of serotonin in cleavage embryos of *Ophryotrocha labronica* // *Wilhelm Roux' Archiv.* – 1974. – № 1 75. – P. 253-271.
11. *Emanuelsson H., Carlberg M., Lowkvist B.* Presence of serotonin in early chick embryos // *Cell Differ.* – 1988. – № 24. – P. 191-199.
12. *Fukumoto, T., Blakely, R., and Levin, M.* Serotonin transporter function is an early step in left-right patterning in chick and frog embryos // *Developmental neuroscience* - 2005a. - № 27 - P. 349-363.
13. *Fukumoto, T., Kema, I.P., and Levin, M.* Serotonin signaling is a very early step in patterning of the left-right axis in chick and frog embryos // *Current Biology* - 2005. -№ 15. – P. 794-803.
14. *Levin M., Buznikov G. A., Lauder J. M.* Of minds and embryos: left-right asymmetry and the serotonergic controls of pre-neural morphogenesis // *Dev Neurosci.* – 2006. – 28(3). – P. 171-185.
15. *Levin M., Buznikov G. A., Lauder J. M.* Of minds and embryos: left-right asymmetry and the serotonergic controls of pre-neural morphogenesis // *Dev Neurosci.* – 2006. – 28(3). – P. 171-185.
16. *McGowan, K., Kane, A., Asarkof, N., Wicks, J., Guerina, V., Kellum, J., Baron, S., Gintzler, A.R., Donowitz, M.* *Entamoeba histolytica* causes intestinal secretion: Role of serotonin // *Science.* – 1983. 221(4612): P. 762-764.
17. *Murch S.J., Campbell S. S. B., Saxena P. K.* The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulation of auxin-induced root organogenesis in in vitro-cultured explants of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) // *In Vitro Cell Dev Biol. - Plant.* – 2001. – № 37. – P. 786–793.
18. *Numanoi N.* Studies on the fertilization substance. V. Distribution of acetylcholine esterase in egg particles of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* // *Scient. Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo.* – 1955. – № 5. – P. 37-41.
19. *Paulmann N., Grohmann M., Voigt J. P., Bert B., Vowinckel J., Bader M., Skelin M., Jevsek M., Fink H., Rupnik M., Walther D. J.* Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation // *PLoS Biol.* – 2009. – 7(10):e1000229.

20. *Raven C.* Morphogenesis: The Analysis of Molluscan Development. / Pergamon Press, London. - 1958.
21. *Sakharov D. A.* Integrative function of serotonin common to distantly related invertebrate animals / Early Brain. // Ed. by Gustafsson M, Reuter M. – Abo, Abo Akademi Press, 1990. – P. 73-88.
22. *Ugrumov M.V.* Hypothalamic monoaminergic systems in ontogenesis: development and functional significance // Int. J. Dev. Biol. - 1997, 41(6):809-816. Review.
23. *Voronezhskaya, E.E., Khabarova, M.Y., and Nezhlin, L.P.* Apical sensory neurones mediate developmental retardation induced by conspecific environmental stimuli in freshwater pulmonate snails // Development – 2014. - №. 131, – P. 3671-3680.
24. *Бузников Г.А., Манухин Б.Н.* Серотонин-подобные вещества в эмбриогенезе некоторых брюхоногих моллюсков // Журн. общ биол. – 1961. – № 22 – С. 223-229.
25. *Кандель Э.* В поисках памяти. / Астрель, Corpus. – 2011. 736 стр.
26. *Мещеряков В.Н.* Прудовик *Lymnaea stagnalis* L. / Под ред. Астаурова Б.Л. / Объекты биологии развития. – М.: - Наука. – 1975. – С. 53-94.
27. *Сахаров Д.А.* Биологический субстрат генерации поведенческих актов // Ж. Общ. Биол. – 2012. – Т. 73 №5. – С. 334-348.
28. *Сахаров Д.А.* Множественность нейротрансмиттеров: функциональное значение // Журн. Эвол. Биохим. Физиол. – 1990. – №26. – С. 733-740.
29. *Угрюмов М.В.* Механизмы нейроэндокринной регуляции / М., - Наука, - 1999, 301 стр.

#### **Раздел 4. Механизмы регуляции обмена ионов кальция в гладкомышечных и эндотелиальных клетках кровеносных сосудов и в клетках скелетной мускулатуры.**

Результатом проведенных в 2013-2016 гг. исследований стало описание новых физиологических функций двупоровых кальциевых каналов (two-pore calcium channels – TPC). Каналы TPC локализованы в лизосомах и лизосомоподобных везикулах и активируются под действием вторичного мессенджера NAADP (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate).

Название двупоровые каналы обусловлено тем, что функциональный кальциевый канал образован двумя субъединицами, в каждой из которых есть две формирующие пору петли. Каналы TPC активируются очень низкими, наномолярными концентрациями NAADP.

Вопросы о том, какие рецепторы запускают сигнальный путь NAADP и каковы его физиологические функции, остаются малоизученными. Неясно, каким образом другие внутриклеточные сигнальные системы влияют на регуляцию NAADP-зависимого обмена ионов кальция.

В течение отчетного периода были проведены исследования роли активируемых NAADP двупоровых кальциевых каналов в регуляции сердечно-сосудистой системы.

Впервые показано, что каналы TPC участвуют в поддержании спонтанного ритма сердечных сокращений и в регуляции сократимости кровеносных сосудов норадреналином и гистамином. Определено участие каналов TPC в вызываемых гистамином и норадреналином подъёме концентрации ионов кальция в цитоплазме ( $[Ca^{2+}]_{цит}$ ) эндотелиальных и гладкомышечных клеток соответственно.

#### **4.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

##### ***Измерение силы сокращения кровеносных сосудов.***

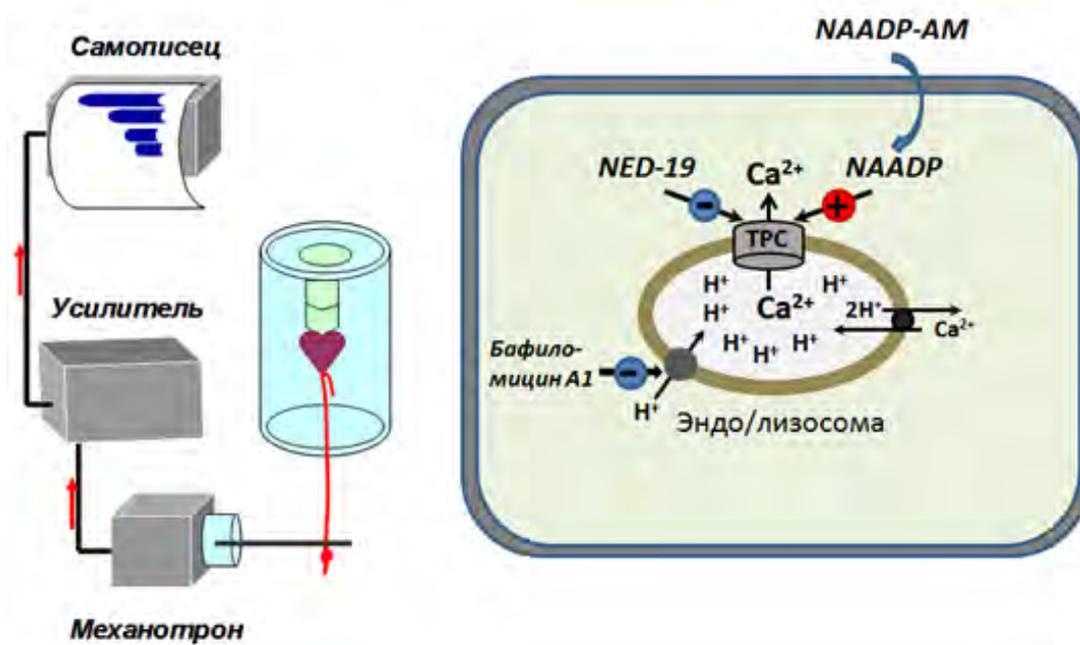
Кольцевые фрагменты аорты шириной 1,5 – 2 мм, взятой от крыс-самцов породы *Wistar* массой 200 – 250 г, крепили на держателях, помещенных в раствор Кребса–Хенселейта (37°C), аэрируемый смесью O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5 %).

Силу сокращения изолированных фрагментов аорты измеряли в изометрическом режиме на 4-канальном миографе (Radnoti, США). Сигналы от изометрических датчиков поступали на усилитель (ADInstruments, Австралия) и обрабатывались с помощью программы LabChart. Для экспериментов использовали препараты аорты, способные сокращаться в ответ на введение 0,1 мкМ норадреналина и расслабляться не менее чем на 50 % при последующем введении карбахолина. Сила сокращения выражена и нормирована по отношению к силе сокращения в ответ на введение норадреналина.

### **Измерение сократимости изолированного сердца виноградной улитки *Helix pomatia*.**

Исследование влияния NAADP на сократимость миокарда проводилось на препарате изолированного сердца виноградной улитки *H. pomatia*.

Амплитуду и частоту сокращений сердца регистрировали в изотоническом режиме (Sukhanova *et al.*, 2008). Проникающий в клетки аналог NAADP-AM, а также ингибитор двупоровых каналов trans-NED19 и ингибитор протонной АТФ-азы бафиломицин А1 вводились в полость сердца (рис. 18).



**Рисунок 18.** Схема установки для регистрации сокращений изолированного сердца виноградной улитки и химические соединения, использованные для воздействия на активность каналов ТРС.

### **Культура клеток.**

Эндотелиальные клетки выделяли из пупочной вены человека по методике, описанной ранее (Jaffe *et al.*, 1973), с модификациями (Goncharov *et al.*, 1987). Пупочную вену промывали раствором Хэнкса с антибиотиками, после чего заполняли средой М199 с 0,1% коллагеназы (SigmaAldrich, США) и инкубировали 40 мин при комнатной температуре.

Полученные клетки промывали и выращивали на поверхности, предварительно покрытой желатином, используя среду М199 с солями Эрла, содержащую 20 % бычьей эмбриональной сыворотки («Invitrogen», США), 300 мкг/мл эндотелиальной ростовой добавки, полученной из мозга кролика методом Мациага (Masiag *et al.*, 1979), 100 мкг/мл гепарина, 100 мкг/мл гентамицина.

Клетки идентифицировали по морфологическим критериям, экспрессии фактора VII, ангиотензинпревращающего фермента, маркеров CD31, CD54, CD61 и др.

Эндотелиальные клетки выращивали в атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>. В работе использовали клетки 2–4 пассажей, для снятия клеток при пассировании применяли раствор акьютазы (SigmaAldrich, США).

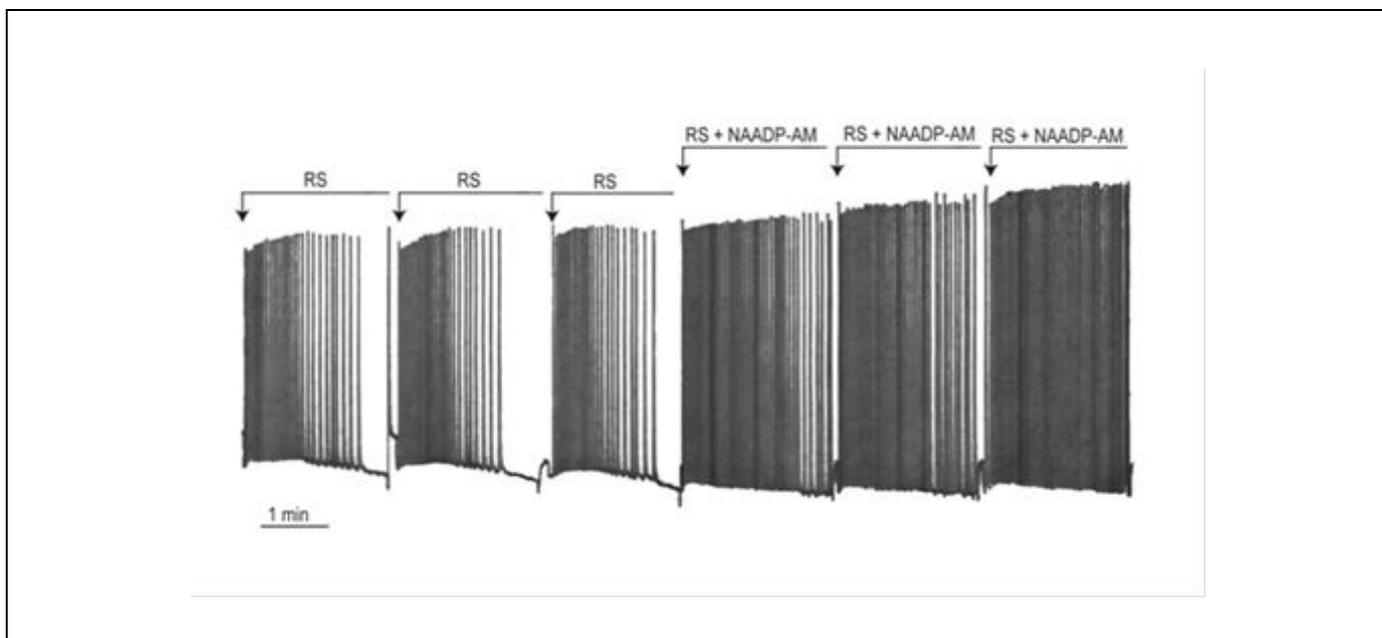
Выделение гладкомышечных клеток (ГМК) из медиального слоя аорты крысы проводится по методу эксплантов, описанному ранее (Kozhevnikova *et al.*, 2011). ГМК культивируют в среде DMEM, содержащей 10 % сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота. Эксперименты проводятся с клетками 4-8 пассажей.

Для измерения концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток ( $[Ca^{2+}]_{цит}$ ) использованы флуоресцентные зонды Fura-2 и Calcium Green.

#### 4.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

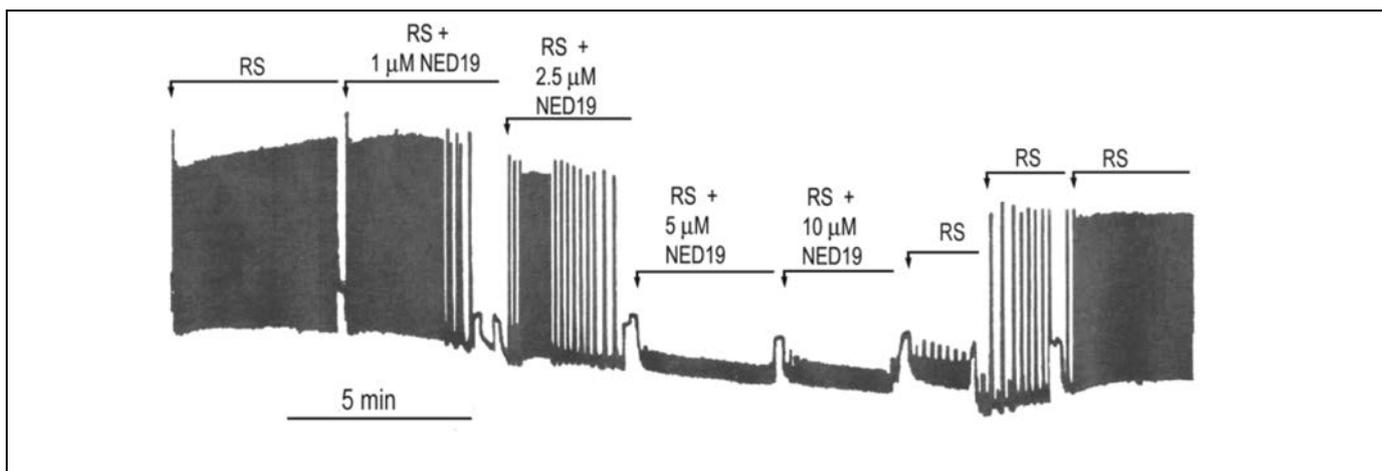
*Исследование роли локализованных в кислых эндолизосомальных везикулах двупоровых кальциевых каналов в регуляции сократимости изолированного сердца моллюска *H. pomatia*.*

Установлено, что проникающий в клетки аналог агониста двупоровых каналов NAADP-AM в концентрациях 100-200 нМ способен предотвратить остановку самопроизвольно сокращающегося сердца виноградной улитки и вызывает увеличение частоты спонтанных сокращений (рис. 19).

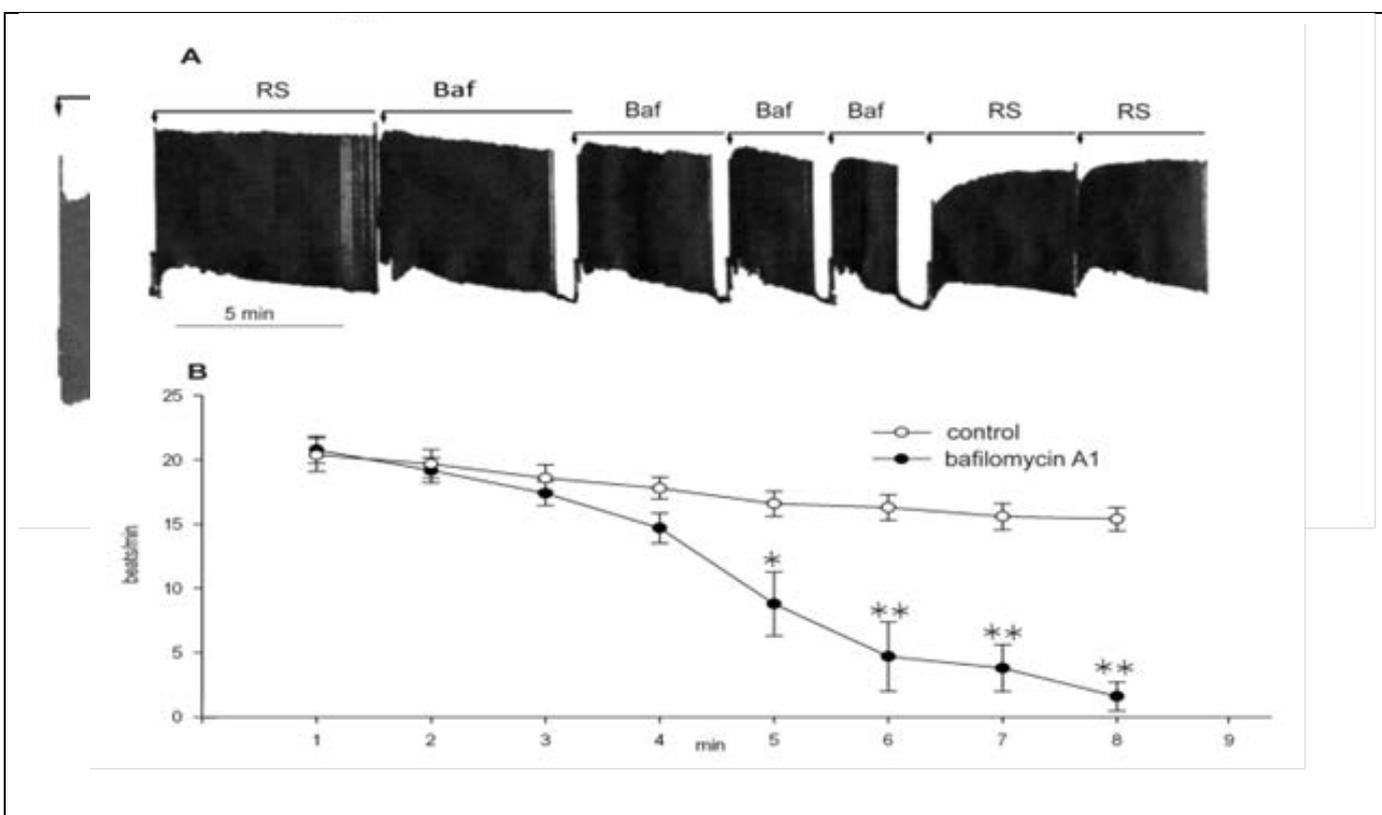


**Рисунок 19.** NAADP-AM восстанавливает спонтанные сокращения сердца моллюска *H. pomatia*. В полость сердца добавляли раствор Рингера (RS) без добавок или содержащий NAADP-AM в концентрации 100 нМ. Все добавки осуществлялись путем смены раствора в полости сердца.

Блокатор этих каналов *trans*-NED19 снижает частоту сокращений изолированного сердца (рис. 20).



**Рисунок 20.** Подавление спонтанных сокращений сердца *H.pomatia* ингибитором двупоровых каналов trans-NED19.



**Рисунок 21.** Подавление бафиломицином A1 сокращений сердца виноградной улитки. На верхней части рисунка (A) показано, что после добавления в полость сердца 10 мкМ бафиломицина A1 происходит сокращение продолжительности спонтанных сокращений сердца. На графике внизу (B) показана зависимость частоты спонтанных сокращений от времени после добавления в полость сердца бафиломицина A1.

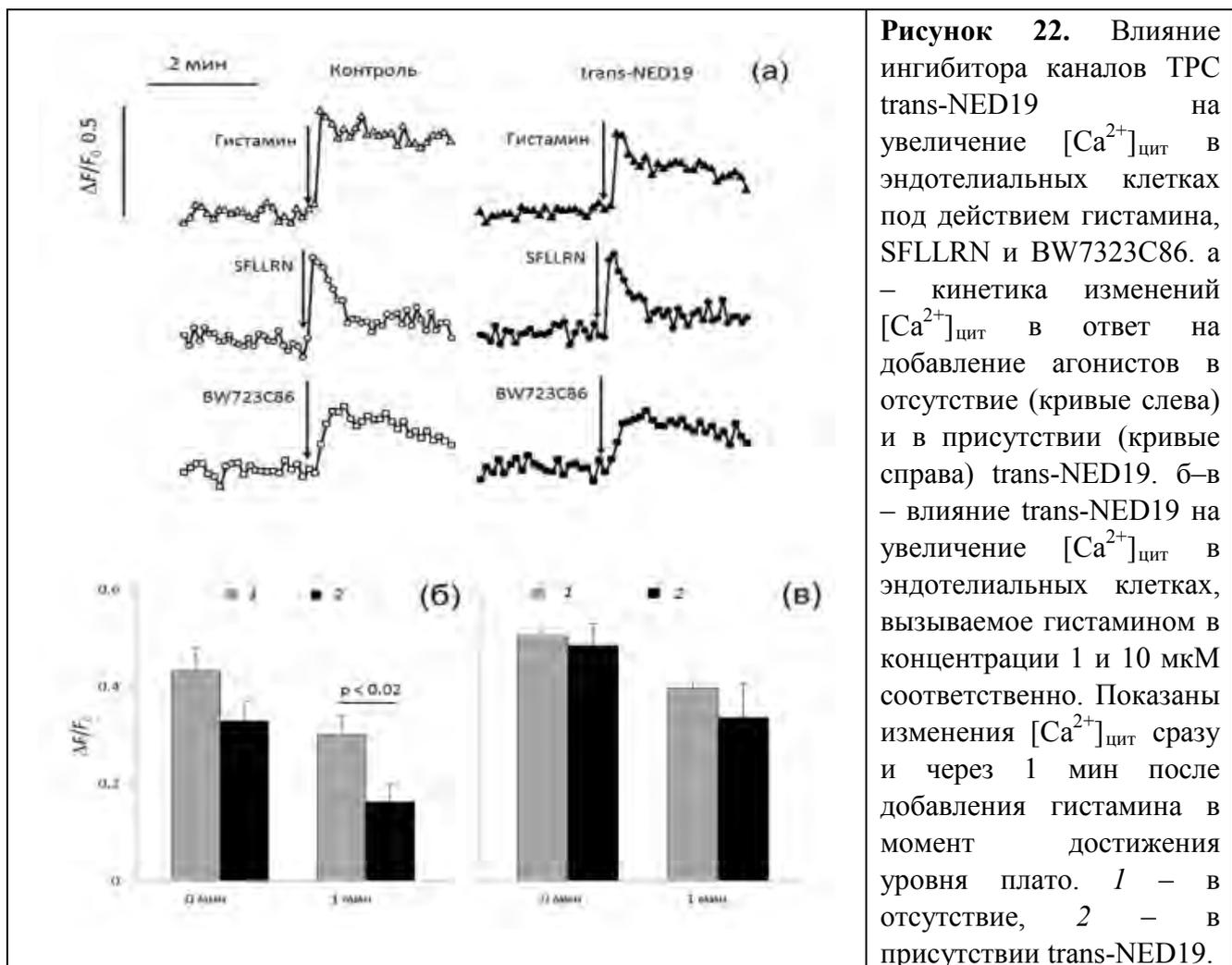
Ингибитор протонной АТФ-азы бафиломицин А1, сбрасывающий протонный градиент в эндолизосомальных везикулах и вызывающий утечку из них ионов кальция, снижает частоту сокращений (рис. 21).

Амплитуда сокращений сердца при этом не изменяется. Полученные нами данные указывают на участие двупоровых каналов в поддержании спонтанного ритма сокращений сердца.

**Роль каналов TPC и фосфолипазы C в вызываемом гистамином увеличении  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в эндотелиальных клетках.**

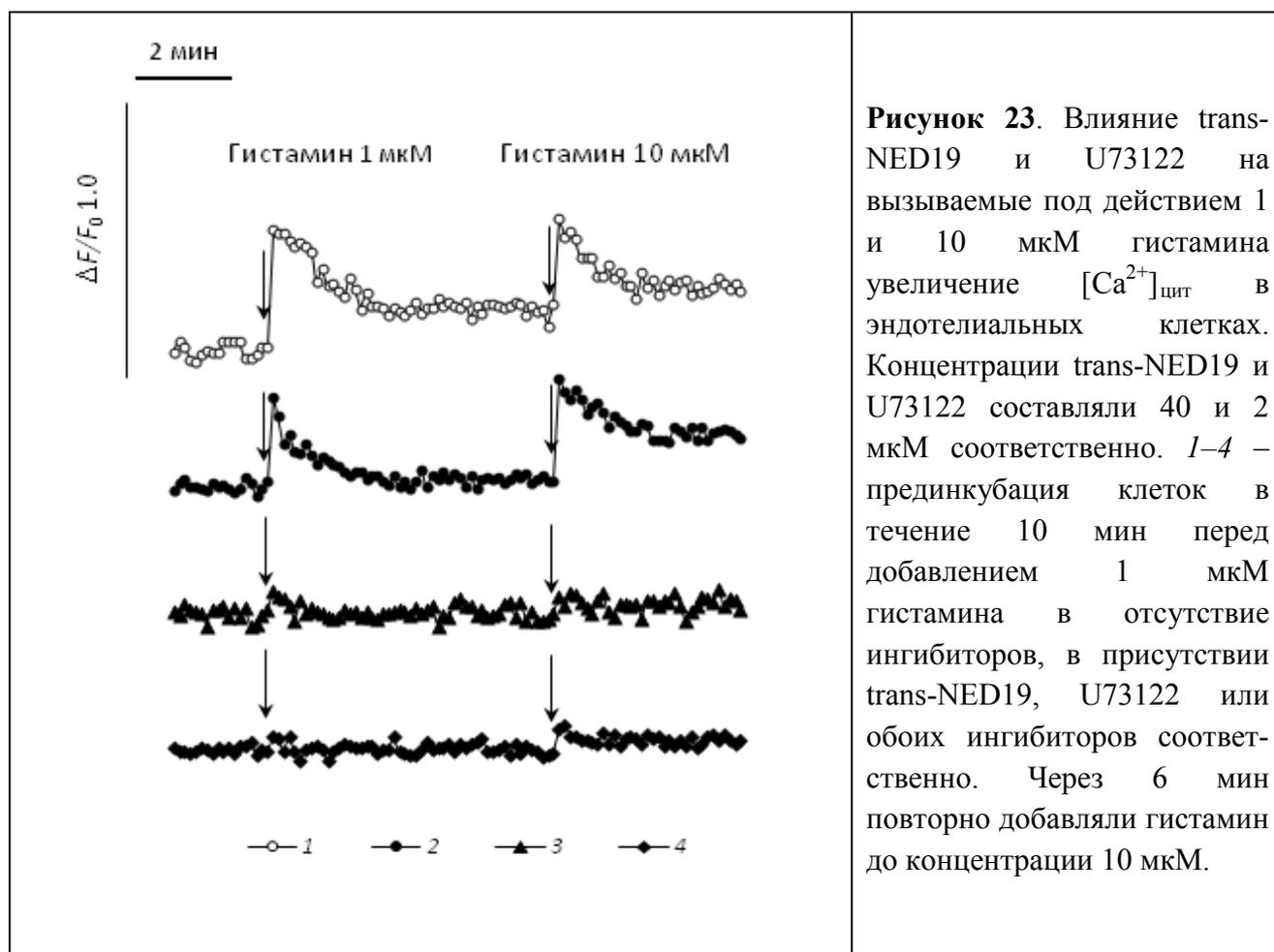
Исследовали влияние блокатора каналов TPC trans-NED19 на кальциевые сигналы эндотелиальных клеток пупочной вены в ответ на введение гистамина, агониста активируемых протеазами рецепторов типа 1 (PAR1) пептида SFLLRN и агониста серотониновых рецепторов 5HT2B BW723C86 (рис. 22 (а)). Концентрации trans-NED19, гистамина, BW723C86 и SFLLRN составляли соответственно 100, 1, 50 мкМ и 1 мкг/мл. Перед добавлением агонистов клетки инкубировали с trans-NED19 в течение 11 мин.

Показаны изменения  $[Ca^{2+}]_{цит}$  сразу и через 1 мин после добавления гистамина в момент достижения уровня плато в отсутствие и в присутствии trans-NED19. trans-NED19 не оказывает существенного влияния на пиковый подъем  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в ответ на добавление 1 мкМ гистамина, но подавляет вторую фазу кальциевого сигнала.



Ингибирующее действие trans-NED19 избирательно по отношению к гистамину, так как эффекты SFLLRN и BW723C86 не изменяются. Блокатор каналов TPC trans-NED19 подавляет прирост  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в эндотелиальных клетках в ответ на действие гистамина в концентрации 1 мкМ (рис. 22 (б)). При повышении концентрации гистамина до 10 мкМ trans-NED19 не влияет на вызываемый этим агонистом прирост  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в эндотелиальных клетках (рис. 22 (в)).

Снижение вызываемого гистамином прироста  $[Ca^{2+}]_{цит}$  под действием trans-NED19 свидетельствует о том, что каналы TPC участвуют в регуляции данным агонистом кальциевого обмена в эндотелиальных клетках. Они играют значимую роль при действии низких концентраций гистамина. Ионы кальция, высвобождаемые из эндолизосомных везикул через каналы TPC, согласно рассматриваемой сейчас модели, выполняют триггерную функцию, потенцируя активность более мощных кальциевых каналов ретикулума, активируемых InsP3 и циклической АДФ-рибозой (Patel *et al.*, 2010). В эндотелиальных клетках рецепторы гистамина сопряжены с фосфолипазой C (Voyno-Yasenetskaya *et al.*, 1989) и, кроме того, активируют в них синтез NAADP (Esposito *et al.*, 2011).



**Рисунок 23.** Влияние trans-NED19 и U73122 на вызываемые под действием 1 и 10 мкМ гистамина увеличение  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в эндотелиальных клетках. Концентрации trans-NED19 и U73122 составляли 40 и 2 мкМ соответственно. 1–4 – прединкубация клеток в течение 10 мин перед добавлением 1 мкМ гистамина в отсутствие ингибиторов, в присутствии trans-NED19, U73122 или обоих ингибиторов соответственно. Через 6 мин повторно добавляли гистамин до концентрации 10 мкМ.

Для того, чтобы оценить соотношение каждого из этих сигнальных путей в активации кальциевого обмена в эндотелиальных клетках, использовали наряду с ингибитором каналов ТРС trans-NED19 ингибитор фосфолипазы С U73122. Эффекты trans-NED19 и U73122 отличаются. Как видно на рисунке 12, ингибирование каналов ТРС – причина подавления второй фазы подъёма  $[Ca^{2+}]_{цит}$  при ответе на низкую концентрацию гистамина, тогда как U73122 полностью устраняет кальциевые сигналы эндотелиальных клеток в ответ на введение гистамина как в низкой, так и в высокой концентрации (рис. 23).

Эти данные согласуются с моделью, согласно которой каналы ТРС, через которые из эндолизосом высвобождаются небольшие порции ионов кальция в цитоплазму, модулируют в пространственном и временном отношении массивированный выброс ионов кальция из ретикулума. Отметим, что такой механизм функционирует при ненасыщающих концентрациях гистамина. При больших дозах гистамина происходит более мощная активация фосфолипазы С, избыточное образование InsP<sub>3</sub> и, как следствие, лавинообразный выброс ионов кальция из ретикулума. В таких условиях для запуска интегрального кальциевого сигнала уже не требуется участие триггерного кальция из эндолизосом.

***Участие каналов ТРС в вызываемом гистамином расслаблении изолированной аорты крысы.*** Гистамин вызывает расслабление предсокращенной аорты по эндотелийзависимому механизму (Van de Voorde, Leusen, 1982). Для оценки участия каналов ТРС в реализации вызываемого гистамином расслабления мы исследовали действие trans-NED19 на этот физиологический процесс (рис. 24).

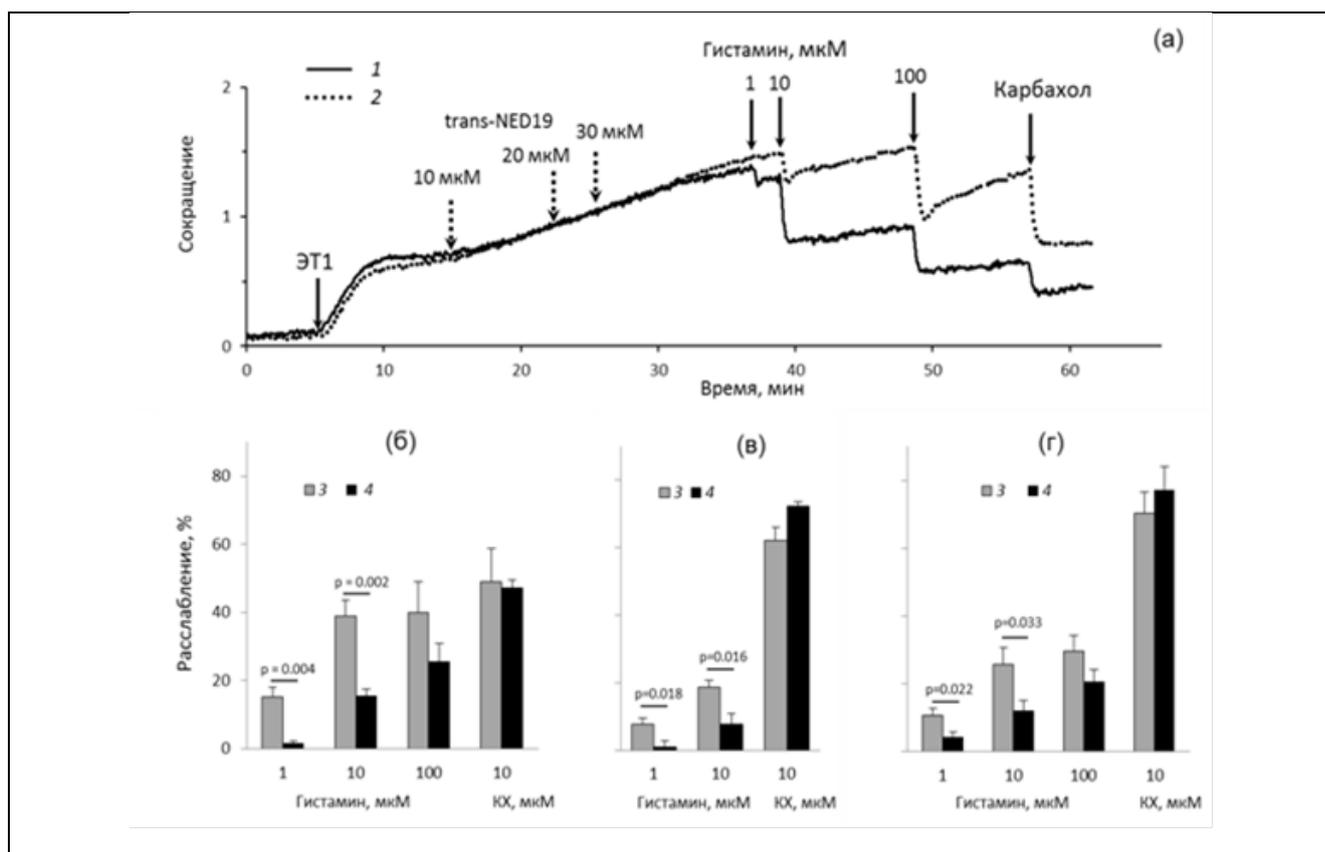
Последовательное добавление к предсокращенной 0,1 мкМ эндотелином-1 (ЭТ1) аорте trans-NED19 в концентрациях от 10 до 30 мкМ не влияло на тонус сосуда, однако расслабление в ответ на введение гистамина резко подавлялось.

Полностью устранялось расслабление, вызываемое 1 мкМ гистамином, и в несколько раз уменьшался расслабляющий эффект 10 мкМ.

При повышении концентрации гистамина до 100 мкМ ингибиторный эффект trans-NED19 исчезал (рис. 1 (а), (б)).

Аналогично trans-NED19 подавлял расслабляющее действие гистамина на аорту, предсокращенную 30 мМ КСl или 10 мкМ серотонином (рис. 24 (в), (г)).

Во всех случаях при повышении концентрации гистамина ингибиторное действие trans-NED19 на расслабление уменьшалось.

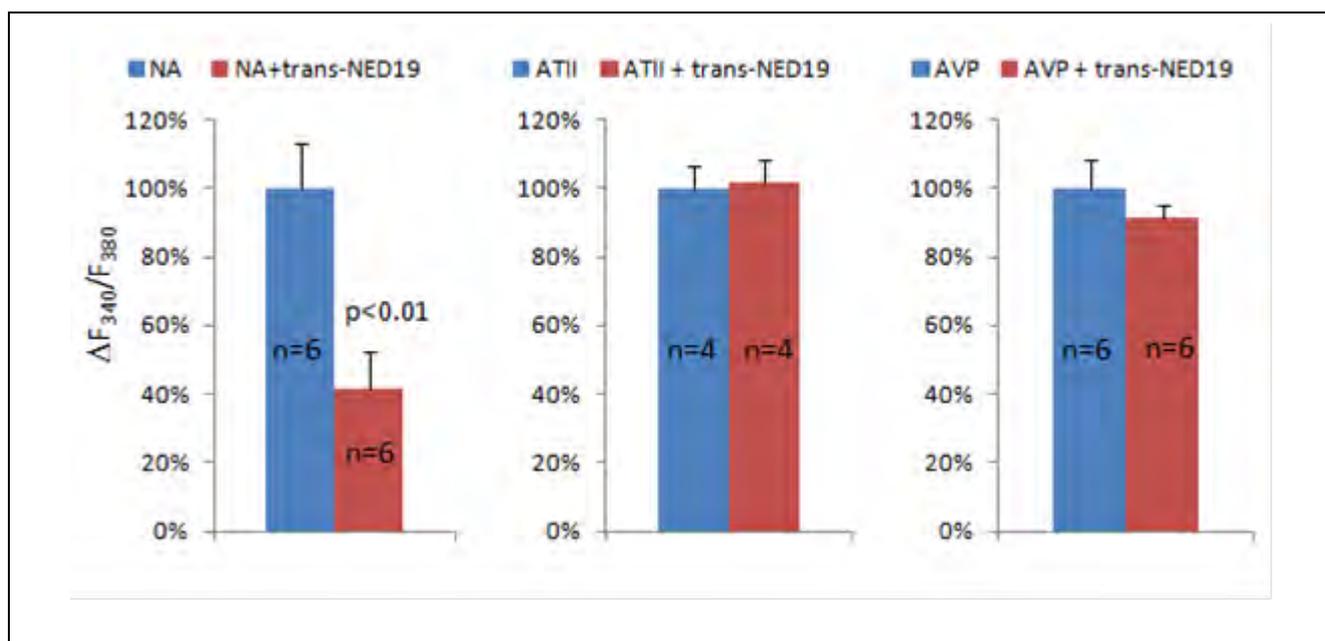


**Рисунок 24.** Подавление блокатром каналов ТРС trans-NED19 расслабления аорты, вызываемого гистамином. а – сокращение аорты, вызванное эндотелином-1 (ЭТ1), и расслабление под действием возрастающих концентраций гистамина и карбахола в контрольных условиях (1) и при воздействии trans-NED19 (2). Сокращение нормировано по ответу на действие 0.1 мкМ норадреналина, принятому за единицу. б–г – влияние trans-NED19 на расслабление аорты, предсокращённой ЭТ1, KCl и серотонином соответственно. 3 – расслабление в контрольных условиях, 4 – при воздействии trans-NED19.

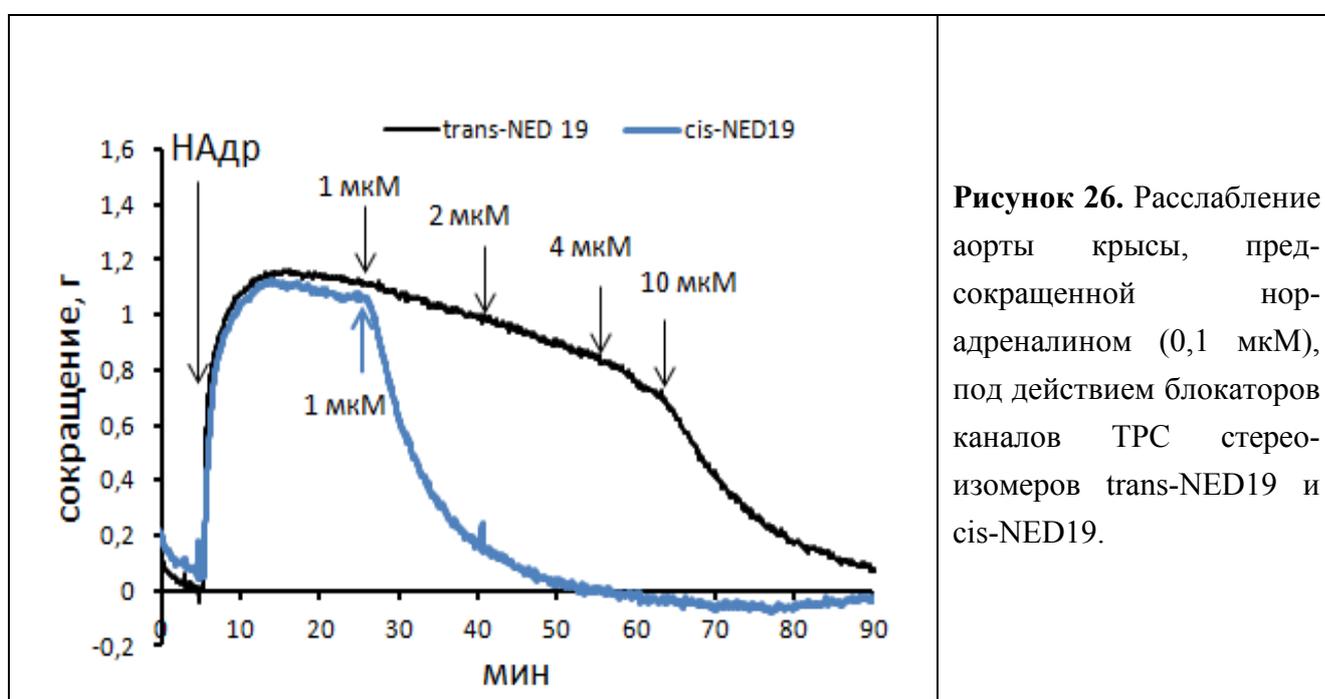
**Участие каналов в действии норадреналина на обмен  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в гладкомышечных клетках и в сокращении кровеносных сосудов.**

Было впервые показано, что двупоровые кальциевые каналы участвуют в вызываемом норадреналином подъёме  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в гладкомышечных клетках и в сокращении кровеносных сосудов в ответ на этот нейротрансмиттер.

Блокаторы этих каналов стереоизомеры trans-NED19 и cis-NED19 ингибировали кальциевый сигнал норадреналина в гладкомышечных клетках, выделенных из аорты крысы (рис. 25), и вызывали расслабление колец аорты, предсокращённых норадреналином (рис. 26).



**Рисунок 25.** Снижение под действием блокатора двупоровых кальциевых каналов подъёма  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в гладкомышечных клетках под действием норадреналина и отсутствие подавления эффектов ангиотензина II (АТII) и вазопрессина (АVP). Концентрации норадреналина, ангиотензина II и вазопрессина составляли 10 мкМ, 0.1 мкМ и 0.1 мкМ, концентрация trans-NED19 – 100 мкМ. Такое же действие на кальциевый сигнал норадреналина оказывал cis-NED19.



**Рисунок 26.** Расслабление аорты крысы, предсокращенной норадреналином (0,1 мкМ), под действием блокаторов каналов ТРС стереоизомеров trans-NED19 и cis-NED19.

#### 4.5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых исследований было установлена физиологическая функция двупоровых кальциевых каналов, локализованных в лизосомах, как регуляторов сократимости сердца и тонуса кровеносных сосудов. Впервые показано, что данные каналы участвуют в

поддержании ритма спонтанных сокращений сердца и впервые описана их роль в эндотелий-зависимом расслаблении кровеносных сосудов под действием гистамина и в сокращении кровеносных сосудов под действием норадреналина. Полученные результаты могут послужить основой для разработки новых фармакологических препаратов для коррекции тонуса кровеносных сосудов при гипертонии и для поддержания ритма сердечных сокращений.

#### 4.6 ССЫЛКИ

*Esposito B., Gambarà G., Lewis A.M., Palombi F., D'Alessio A., Taylor L.X., Genazzani A.A., Ziparo E., Galione A., Churchill G.C., Filippini A.* NAADP links histamine H1 receptors to secretion of von Willebrand factor in human endothelial cells // *Blood*. 2011. V. 117. № 18. P. 4968-4977.

*Goncharov N.V., Sakharov I., Danilov S.M., Sakandelidze O.G.* [Use of collagenase from the hepatopancreas of the Kamchatka crab for isolating and culturing endothelial cells of the large vessels in man] // *Biull Eksp Biol Med*. 1987. V. 104. № 9. P. 376-378.

*Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R.* Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria // *J Clin Invest*. 1973. V. 52. № 11. P. 2745-2756.

*Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F., Avdonin P.V.* [Activation of "silent" vasoconstrictive 5-HT<sub>1A</sub> receptors as a possible mechanism of synergism in angiotensin II and serotonin effect on vascular tone] // *Izv Akad Nauk Ser Biol*. 2011. V. № 1. P. 68-76.

*Maciag T., Cerundolo J., Ilsley S., Kelley P.R., Forand R.* An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979. V. 76. № 11. P. 5674-5678.

*Patel S., Marchant J.S., Brailoiu E.* Two-pore channels: Regulation by NAADP and customized roles in triggering calcium signals // *Cell Calcium*. 2010. V. 47. № 6. P. 480-490.

*Sukhanova I.F., Solomonova V.G., Avdotin P.V.* [Activators of protein kinase A and Epac proteins enhance the contractile response of the isolated snail (*Helix pomatia*) heart to serotonin] // *Izv Akad Nauk Ser Biol*. 2008. V. № 6. P. 730-735.

*Van de Voorde J., Leusen I.* Vascular endothelium and the relaxation effect of histamine on aorta of the rat // *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1982. V. 256. № 2. P. 329-330.

*Voyno-Yasenetskaya T.A., Panchenko M.P., Nupenko E.V., Rybin V.O., Tkachuk V.A.* Histamine and bradykinin stimulate the phosphoinositide turnover in human umbilical vein endothelial cells via different G-proteins // *FEBS Lett*. 1989. V. 259. № 1. P. 67-70.

## **Раздел 5. Нейротрансмиттерные механизмы в регуляции эмбриогенеза и нервных регуляторных процессах у взрослых организмов.**

Исследуются компоненты серотонергической системы и механизмы их функционирования в раннем развитии нескольких модельных объектов – шпорцевой лягушки (*Xenopus tropicalis*), а также морского ежа (*Paracentrotus lividus*).

Получены и проанализированы данные о состоянии и уровне активности элементов нескольких медиаторных систем, в основе которых лежат алифатические аминокислоты.

Проведен детальный анализ наличия активной системы метаболизма нейротрансмиттеров, транспортеров, экспрессии соответствующих рецепторов на донервной стадии развития зародышей.

### **5.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Зародыши морского ежа *Paracentrotus lividus* фиксировали в RNALater, и выделяли суммарную РНК.

Проводили **ОТ-ПЦР** на термоциклере MJ Mini с помощью специфических олигонуклеотидов. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с этидиум бромидом. Праймеры готовили с помощью Lasergene PrimerSelect (DNASTAR) на основе последовательностей, полученных в базе данных NCBI GenBank database.

Для **иммуногистохимических экспериментов** зародыши инкубировались с исследуемыми веществами в течение 3 ч при комнатной температуре и фиксировались в 4 % параформе. Иммуногистохимическое окрашивание проводили с первыми поликлональными антителами кролика к серотонину и антикроличьими иммуноглобулинами козла.

Препараты исследовали с помощью конфокального микроскопа Olympus FluoView FV10i или Leica TCS SP. Арахидоноил-серотонин и арахидоноил-дофамин для эмбриофизиологических экспериментов был синтезирован сотрудниками Лаборатории Оксипинов ИБХ.

**Методика** исследования **эмбриостатических эффектов** нейрофармакологических препаратов была стандартной – определяли минимальную концентрацию лиганда, блокирующую деления дробления.

В работе на мышах использовали гибридов F1 линий C57BL/6J и CBA/J. Работу проводили с использованием стандартных методик и с соблюдением правил проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Клетки муральной гранулезы получали из антральных фолликулов посредством пункции. Клетки желтого тела изолировали микрохирургически из яичников беременных самок (12,5 сут). Ооцит-кумуляусные комплексы выделяли из ампул яйцеводов. Дробящиеся эмбрионы на стадии 4

клеток получали через 2,5 сут после спаривания путем диссекции яйцеводов. Блastoцисты вымывали из матки через 4,5 суток после спаривания.

Полученные пробы фиксировали в TRI Reagent (Sigma, США) и сразу использовали для выделения тотальной РНК. После обработки ДНК-азой I (Fermentas, США) 1 мкг РНК из клеток муральной гранулезы, кумулюса и желтого тела, а также из яичников и 18-дневных зародышей использовали для синтеза кДНК с помощью набора реактивов «MMLV RT kit» (Евроген, Россия).

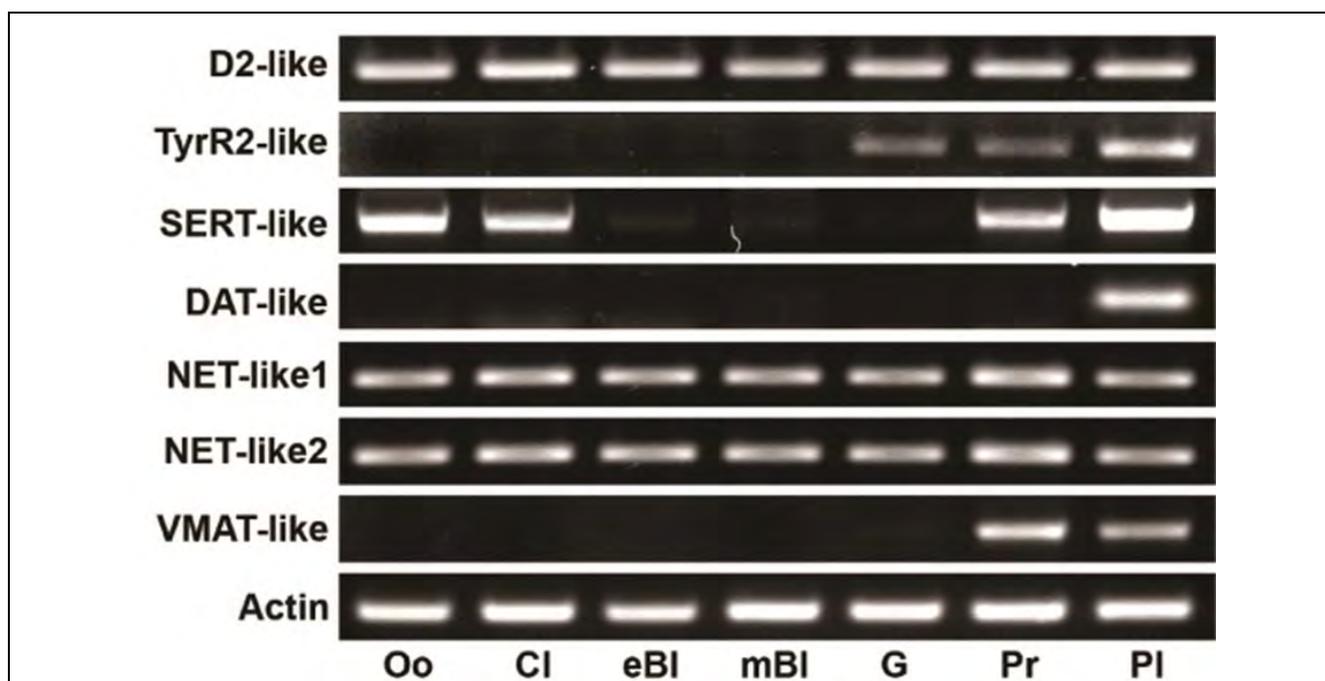
Тотальную РНК из ооцитов и доимплантационных эмбрионов использовали для синтеза и амплификации кДНК с помощью набора реактивов «Mint» (Евроген, Россия). ПЦР проводили на амплификаторе T100 (BIO RAD, США) с использованием готовой смеси для ПЦР «ScreenMix-HS» (Евроген, Россия).

Анализ продуктов проводили с помощью агарозного гель-электрофореза и системы видеорегистрации «Взгляд» (Хеликон, Россия). Для исключения ложноположительного результата проводили отрицательные контроли – ПЦР без матрицы и ПЦР без обратной транскрипции, в качестве контрольного гена использовали *hprt*.

Специфические олигонуклеотиды для проведения двух раундов «гнездовой» ПЦР подбирали с помощью сервиса NCBI Primer-BLAST с учетом экзон-интронной структуры генов.

### 5.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые проведен анализ экспрессии в ходе всего эмбриогенеза основных компонентов серотонинергической системы у трех различных филогенетических групп: иглокожих, амфибий и млекопитающих, причем в двух последних случаях он имел исчерпывающий характер (рис. 27).



**Рисунок 27.** Oo – ооцит, Cl – деления дробления, eBl – ранняя бластула, mBl – средняя бластула, G – гастрюла, Pr – призма, Pl – плутеус.

Наиболее сложно это исследование было провести на морских ежах, исторически являющихся первым и одним из удобнейших экспериментальных объектов в изучении донервных функций транмиттеров. Это обусловлено тем, что при наличии обширных эмбриофизиологических, полученных на зародышах морских ежей, геном *Paracentrotus lividus*, использованного авторами, до сих пор не прочитан, и при работе с ним приходилось опираться на последовательности генома морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus*.

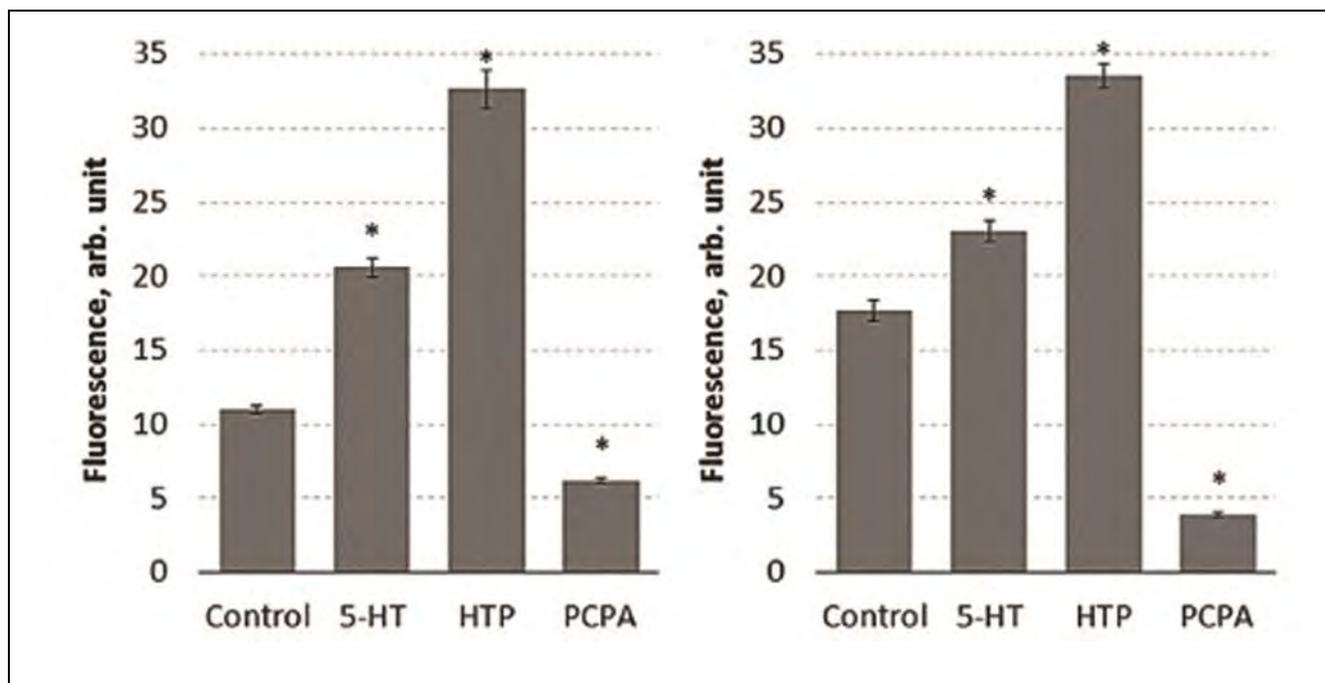
Предварительно была проведена ревизия ранних данных об эмбриостатической активности лигандов транмиттерных рецепторов и установлено, она в наибольшей степени выражена у антагонистов серотониновых рецепторов 1-го типа, а также дофаминовых D2-рецепторов. При этом защитное действие против этих лигандов оказали и серотонин, и дофамин и их конъюгаты с арахидоновой кислотой. Такие перекрестные защитные эффекты могут быть свидетельствовать о возможности одновременного присутствия в клетках зародышей рецепторов к обоим этим транмиттерам. Наличие защитного действия также у активатора аденилатциклазы форсколина и дибутирил-цАМФ свидетельствует в пользу того, что затронутый рецептор относится к G-белок связанным и активирует аденилатциклазу.

В хорошем соответствии с этими результатами находится выявление с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в раннем развитии морского ежа *Paracentrotus lividus* экспрессии мРНК моноаминергического D2-подобного рецептора.

Также, иммуноцитохимическими методами подтверждено равномерное распределение серотонина в бластомерах морского ежа.

Для проверки активности обратного захвата серотонина зародышей морского ежа на стадии бластулы инкубировали в присутствии серотонина (100 мкМ), последующее иммуноокрашивание показало повышение интенсивности флуоресценции антител к серотонину приблизительно в 2 раза по сравнению с контролем на стадии делений дробления и приблизительно на треть – на стадии ранней бластулы. Чтобы проверить активность декарбоксилазы ароматических аминокислот зародыши инкубировали с предшественником серотонина 5-гидрокситриптофаном (НТР, 100 мкМ) (рис. 28).

Иммуноокрашивание показало повышение уровня серотонина втрое в период дробления и вдвое – на стадии бластулы. Инкубация с ингибитором триптофангидроксилазы РСРА (100 мкМ) приводила к снижению уровня серотонина на 56% по сравнению с контролем на стадии делений дробления и на 22% на ранней бластуле. Эти результаты свидетельствуют, что оба фермента синтеза серотонина активны в период делений дробления и у бластулы.



**Рисунок 28.** Результаты иммуноцитохимического анализа на наличие серотонинергической на ранних стадиях развития морского ежа *Paracentrotus lividus*

На этих же стадиях выявлена также экспрессия генов, подобных транспортерам серотонина и норадреналина (SERT и NET, соответственно), в то время как экспрессии везикулярного транспортера моноаминов (VMAT) обнаружено не было, что оставляет вопрос о транспорте серотонина во внешнюю среду как средства инактивации трансммиттера в цитоплазме blastomeres открытым. Этот процесс важен также и потому, что оказывающийся таким образом во внешней среде серотонин может участвовать в межblastomere взаимодействиях.

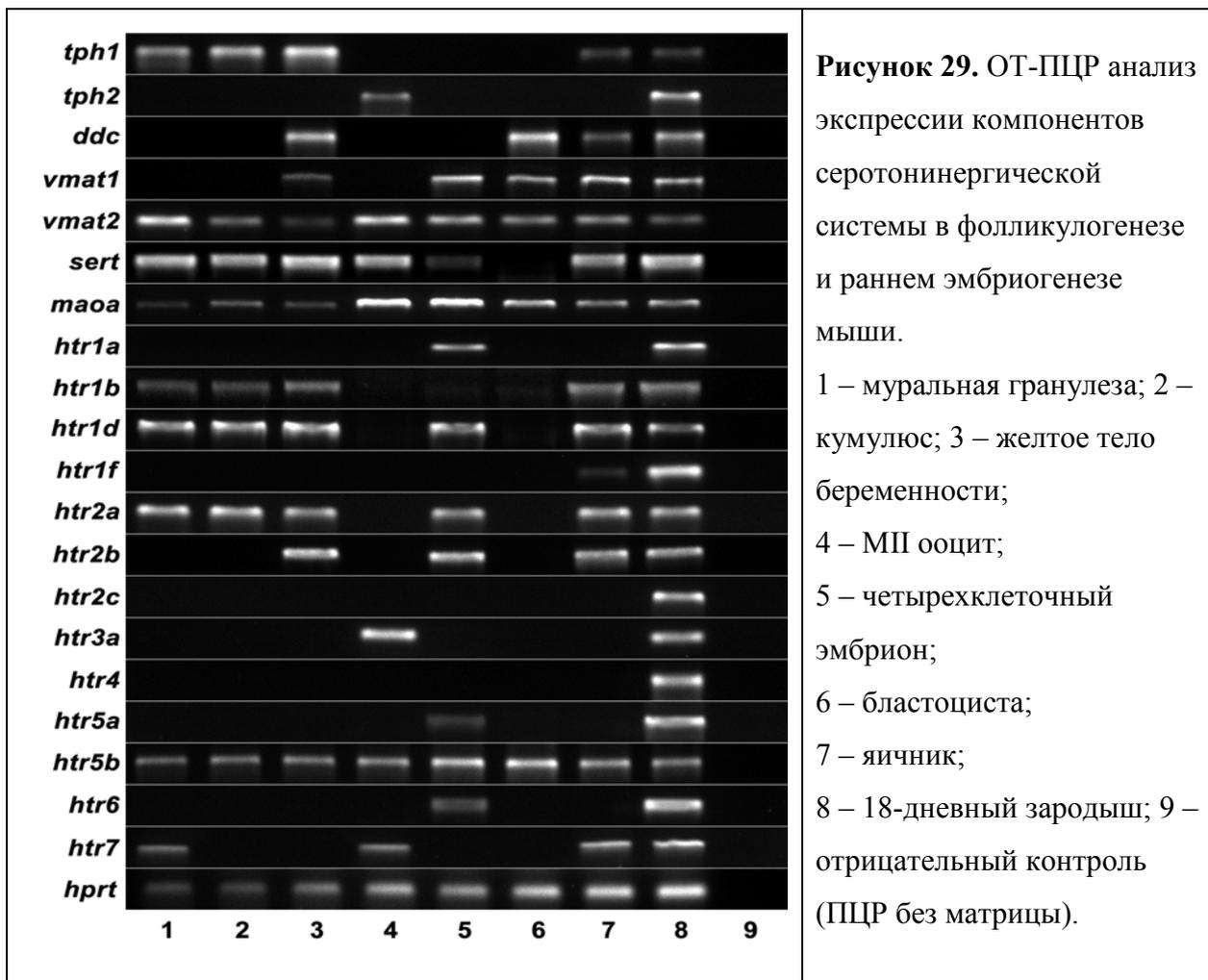
У шпорцевых лягушек экспрессия мРНК серотониновых рецепторов 2С- и 7-го типов обнаружена, начиная со стадий ооцита и 2 blastomeres. На этих же стадиях присутствует экспрессия серотониновых транспортеров VMAT2 и SERT. В течение всего развития экспрессируются и ферменты синтеза серотонина. Экспрессия мРНК других серотониновых рецепторов выявляется со стадии нейрулы и головастика.

Таким образом, уже на ранних стадиях развития присутствуют основные компоненты серотонинергической системы, причем возможна передача сигнала с участием нескольких серотониновых рецепторов одновременно.

В ходе работы на зародышах мышей было проведено ОТ-ПЦР исследование экспрессии всех основных компонентов серотонинергической сигнальной системы в фолликулярных клетках, а также в зрелых ооцитах и преимплантационных эмбрионах мыши.

Результаты представлены на рис. 29. Экспрессия *maoa*, транспортеров *vmat2* и *sert*, рецептора *htr5b* выявляется как в ооцитах, так и в дробящихся эмбрионах и blastocysts.

Везикулярный транспортер *vmat1* отсутствует в ооцитах, но экспрессируется в доимплантационных эмбрионах.



Фермент синтеза *tph2* и рецепторы *htr3a* и *htr7* экспрессируются только в ооцитах, а рецепторы *htr1a*, *htr1d*, *htr2a*, *htr2b* и *htr6* - только в дробящихся эмбрионах.

Экспрессия фермента синтеза серотонина *ddc* выявляется только на стадии бластоцисты. Гены *tph1*, *htr1b*, *htr1f*, *htr2c* и *htr4* не экспрессируются в исследуемых пробах ооцитов и доимплантационных эмбрионов.

#### 5.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные об одновременной экспрессии мРНК серотониновых рецепторов нескольких типов в фолликулогенезе и раннем эмбриогенезе земноводных и млекопитающих, в частности, в зародышах шпорцевой лягушки выявлена экспрессия серотониновых рецепторов подтипов 1E, 2C и 5, а у мыши – 1A, 1F, 2A, 5A, 5B и 7, позволяют предположить существование в развитии этих видов нетривиального механизма. В рамках этого механизма к одному и тому же трансммиттеру в

клетке, присутствуют рецепторы более чем одного типа, способные одновременно активировать разные сигнальные пути и, таким образом, реализовывать различные функции.

Существенно, что в случае мыши и шпорцевой лягушки одновременно экспрессируются рецепторы с противоположным действием на систему вторичных мессенджеров. С использованием иммунохимических методов существенно дополнено представление о наличии нейротрансмиттеров и экспрессии соответствующих рецепторов на донервной стадии развития зародышей, в частности об экспрессии рецепторов к нейротрансмиттерам, являющимся алифатическими аминокислотами.

## **Раздел 6. Анализ лиганд-рецепторных взаимодействий в физиологических и биохимических реакциях.**

На изолированных мембранах нервных клеток коры головного мозга крыс исследовалось влияние активации и ингибирования серотониновых рецепторов, бета-адренорецепторов и мускариновых рецепторов на связывание специфических антагонистов альфа1- и альфа2-адренорецепторов [3H]празозина и [3H]RX821002. Охарактеризовано аллостерическое действие адренотропных, серотонинотропных, NO-тропных веществ на кинетику связывания [3H]хинуклидинилбензилата ([3H]QNB) мускариновыми холинорецепторами коры головного мозга крыс.

Анализ экспериментальных результатов проведен с помощью стандартных и оригинальных компьютерных программ на основе математических моделей, разработанных в лаборатории.

### **6.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Используемые в работе *радиолигандные и физиологические методы* соответствуют уровню аналогичных исследований за рубежом, методы анализа результатов являются оригинальными.

Для решения поставленных задач в работе использованы разные объекты (две экспериментальные модели) и методические подходы (физиологические и радиолигандные исследования).

#### ***Объекты исследования***

Физиологические эксперименты выполнены на уникальном гладкомышечном объекте - неиннервированном амнионе куриного эмбриона, обладающем активными рецепторными системами ( $\alpha$ -,  $\beta$ -адренорецепторы, М-холинорецепторы, серотониновые рецепторы и др.). Величина сократительной реакции при кумулятивном и дискретном действии биологически активных веществ регистрировалась в изометрическом режиме.

В работе на мембранных препаратах коры головного мозга крыс исследуемые эффекты оценивали на рецепторном уровне.

*Анализ экспериментальных результатов* проведен с помощью стандартных и оригинальных компьютерных программ на основе математических моделей, разработанных в лаборатории. Ранее теоретически и экспериментально было показано, что лиганд-рецепторное взаимодействие в радиолигандных реакциях описывается уравнениями для одного или двух пулов рецепторов:  $b = [(V_{max} \cdot A_n) / (K_d n + A_n)]$ , (1)  $b = [(V_{m1} \cdot A_{n1}) / (K_{d1} n_1 + A_{n1})] + [(V_{m2} \cdot A_{n2}) / (K_{d2} n_2 + A_{n2})]$ , (2) где  $b$  – количество связанного лиганда,  $V_{m1}$  и  $V_{m2}$  ( $V_{m1} + V_{m2} = V_{max}$ ) – количество мест связывания лиганда в высоко- и низкоаффинном пулах рецепторов в одной эффекторной системе с константами диссоциации  $K_{d1}$ ,  $K_{d2}$  и коэффициентом Хилла  $n_1$ ,  $n_2$ ,  $[A]$  – концентрация лиганда в

инкубационной среде. Для физиологических реакций в уравнениях 3 и 4  $p = \frac{P_{max} \cdot A^n}{EC50^n + A^n}$ , (3);  $p = \frac{P_{m1} \cdot A^{n1}}{EC50,1n1 + A^{n1}} + \frac{P_{m2} \cdot A^{n2}}{EC50,2n2 + A^{n2}}$ , (4);  $p$  – величина реакции при концентрации лиганда  $[A]$ ,  $P_{m1}$  и  $P_{m2}$  ( $P_{m1} + P_{m2} = P_{max}$ ) – величина максимальной реакции в высоко- и низкоаффинном пулах рецепторов в одной эффекторной системе с  $EC50,1$  и  $EC50,2$  (концентрация лиганда, вызывающая реакцию равную половине максимальной),  $n1$ ,  $n2$  - коэффициент Хилла. Действие каждого из исследованных веществ анализируется с использованием десяти математических моделей лиганд-рецепторного взаимодействия. По форме уравнения и модели для физиологических и радиолигандных реакций идентичны. Модели: I – один пул рецепторов с рассчитанными параметрами  $V_{max}$ ,  $K_d$  и заданной величиной  $n=1$ ; II – один пул рецепторов с рассчитанными параметрами  $V_{max}$ ,  $K_d$  и заданной величиной  $n=2$ ; III – один пул рецепторов с рассчитанными параметрами  $V_{max}$ ,  $K_d$ ,  $n$ ; IV – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $V_{m1}$ ,  $K_{d1}$ , и  $V_{m2}$ ,  $K_{d2}$  и заданной величиной  $n1=n2=1$ ; V – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $V_{m1}$ ,  $K_{d1}$ ,  $n1$  и  $V_{m2}$ ,  $K_{d2}$ ,  $n2$  ( $n1=n2$ ); VI – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $V_{m1}$ ,  $K_{d1}$ , и  $V_{m2}$ ,  $K_{d2}$ , и заданной величиной  $n1=n2=2$ ; VII – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $V_{m1}$ ,  $K_{d1}$ ,  $n1$  и  $V_{m2}$ ,  $K_{d2}$ ,  $n2$  ( $n1 \neq n2$ ). VIII – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $V_{m1}$ ,  $V_{m2}$ ,  $K_{d1}=K_{d2}$  и заданными величинами  $n1=1$  и  $n2=2$ ; IX – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $V_{m1}, V_{m2}$ ,  $K_{d1}=K_{d2}$ ,  $n1, n2$ ; X – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $V_{m1}, V_{m2}$ ,  $K_{d1}, K_{d2}$ ,  $n1=1, n2=2$ .

Теоретически возможны и другие более сложные модели лиганд-рецепторного связывания, но их применение пока не давало удовлетворительных результатов. В физиологических и радиолигандных экспериментах на разных моделях также будет использован **метод оценки количества моно- и димерных рецепторов в пуле с одинаковой аффинностью** ( $EC50$ ,  $K_d$ ). Особенностью предлагаемых методов является использование лигандов в широком диапазоне концентраций для выявления дискретных пулов рецепторов, различающихся по аффинности, количеству активных моно- и димерных рецепторов, и обоснование адекватной модели лиганд-рецепторного взаимодействия путем применения различных математических и графических компьютерных программ.

Предложенный метод анализа лиганд-рецепторных взаимодействий применим для исследования любых биологических реакций и процессов, результаты которых могут быть представлены количественно. Новизна полученных результатов заключается в выявлении изменений функционального состояния адreno- и холинорецепторов в норме и при взаимодействии (cross-talk) с агонистами и антагонистами других регуляторных систем. Предложенный оригинальный метод характеристики лиганд-рецепторных реакций позволяет

провести многофакторный количественный анализ функциональной активности и взаимодействия эффекторных систем на уровнях от субклеточного до организменного.

Разработанные в лаборатории *оригинальные математические и графические модели лиганд-рецепторных взаимодействий* позволяют количественно оценить основные параметры физиологических и радиолигандных реакций при модуляции адренергического и холинергического сигнала на рецепторном и внутриклеточном уровне агонистами, антагонистами, аллостерическими агентами и внутриклеточными посредниками. Авторами показано существование одного или двух пулов рецепторов в одной эффекторной системе, различающихся по аффинности и количеству мест связывания молекул лиганда (степени димеризации), и изменение этих параметров при аллостерических воздействиях на рецепторы. Показана возможность полного или частичного перехода димерных рецепторов в мономерные ( $n=2$  в  $n=1$ ) или мономерных в димерные ( $n=1$  в  $n=2$ ) в процессе радиолигандных и физиологических реакций.

### 6.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью системы количественного анализа, разработанной под руководством Манухина Б.Н., проведены исследования особенностей лиганд-рецепторных взаимодействий и их модуляции на моделях разной сложности. Рассчитываемые параметры кинетической реакции дают полную характеристику свойств исследуемой системы: демонстрируют количество пулов рецепторов, число активных рецепторов, их аффинность к лиганду, количество молекул лиганда, связывающихся с рецептором, соотношение моно- и димерных рецепторов и их переход из одного состояния в другое.

В работе использовали две экспериментальные модели: в физиологических исследованиях – неиннервированный амнион куриного эмбриона, в радиолигандных – изолированные мембраны клеток коры головного мозга крыс.

Одной из задач настоящей работы было изучение путей взаимодействия серотонинергической, холинергической и адренергической нейротрансмиттерных систем на рецепторном уровне. Исследовано модулирующее действие серотонина и миансерина на  $\alpha_2$ -адренорецепторы в мембранах коры головного мозга крыс.

Активация серотониновых рецепторов вызывает изменения параметров связывания специфического антагониста [ $^3\text{H}$ ]-RX821002 и общего характера взаимодействия лиганда с  $\alpha_2$ -АР. Присоединение лиганда к адренорецепторам происходит по модели, предполагающей существование двух пулов рецепторов (высоко- и низкоаффинного). При действии серотонина достоверно снижается значение  $Kd_1$  высокоаффинного пула и возрастает значение  $Kd_2$  низкоаффинного пула. Число активных  $\alpha_2$ -адренорецепторов ( $Bm_1$ ,  $Bm_2$ ) уменьшается в обоих

пулах. Общее число рецепторов ( $B_{\max}$ ) уменьшается на 20%. В итоге значительно снижается эффективность связывания лиганда ( $E_1$  и  $E_2$ ) обоими пулами рецепторов.

Ингибирование серотониновых рецепторов миансерином вызвало существенные изменения параметров реакции и характера связывания. Взаимодействие лиганда с  $\alpha_2$ -АР описывается моделью с двумя пулами рецепторов (высоко- и низкоаффинный) и присоединением двух молекул лиганда к рецептору. Чувствительность к лиганду высокоаффинного пула возрастает по сравнению с контролем, а низкоаффинного – снижается. Число мест связывания [ $^3\text{H}$ ]RX821002 ( $B_{\max} = B_{m1} + B_{m2}$ ) достоверно не изменяется.

В результате эффективность связывания лиганда ( $E_1$  и  $E_2$ ) снижается. Выявлена особенность действия серотонина и миансерина – появление высоко- и низкоаффинного пулов  $\alpha_2$ -адренорецепторов. Общее влияние серотонина и миансерина на связывание [ $^3\text{H}$ ]RX821002 проявляется как ингибиторное. По всем параметрам миансерин как ингибитор более активен, чем серотонин.

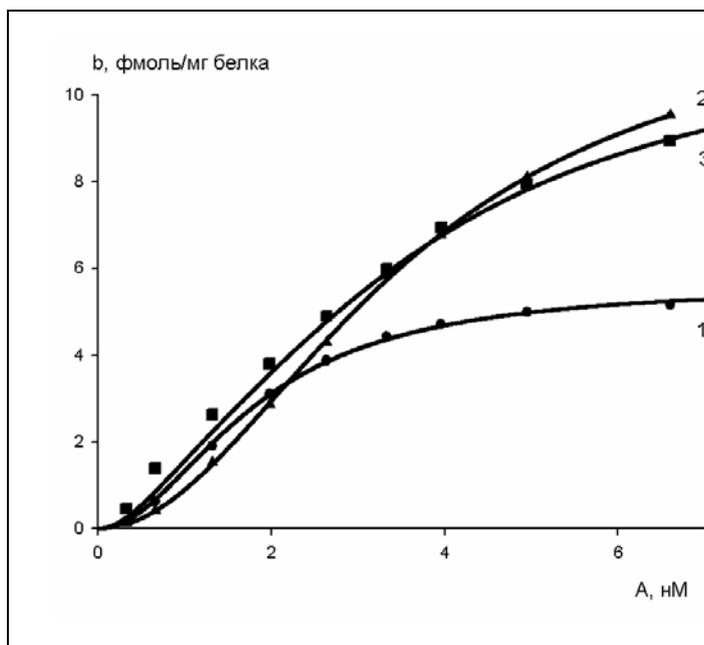
Таким образом, показано, что в мембранах головного мозга крыс  $\alpha_2$ -адренорецепторы представлены в виде димеров. Установлена способность серотонина и миансерина (агонист и антагонист серотониновых рецепторов) количественно и качественно воздействовать на активность  $\alpha_2$ -адренергических рецепторов. Модулирующее действие серотонина и миансерина на  $\alpha_2$ -адренорецепторы проявляется в образовании двух различных по аффинности пулов мест связывания специфического лиганда [ $^3\text{H}$ ]RX821002. При этом агонисты и антагонисты серотониновых рецепторов аллостерически изменяют концентрацию активных моно- и димерных рецепторов.

Исследовано влияние активации и ингибирования  $\beta$ -адренорецепторов изопропилнорадреналином и пропранололом на связывание  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -адренорецепторами специфических неселективных антагонистов [ $^3\text{H}$ ]празозина и [ $^3\text{H}$ ]RX821002.

При активации  $\beta$ -адренорецепторов изопропилнорадреналином связывание радиоактивных лигандов с  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -адренорецепторами происходит по такой же модели.

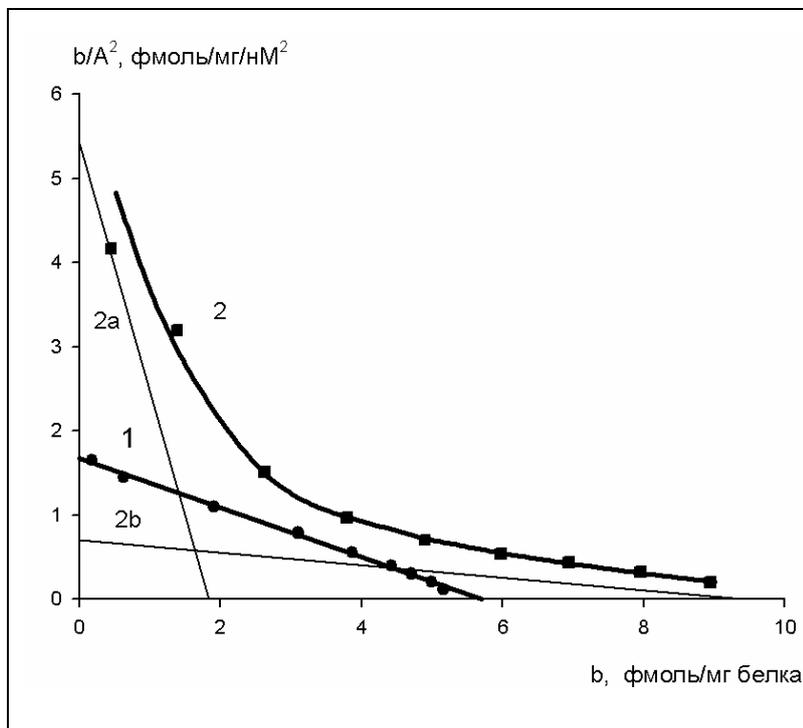
Чувствительность к [ $^3\text{H}$ ]празозину и количество активных  $\alpha_1$ -адренорецепторов увеличивается на 27% ( $K_d = 1.36 \pm 0.03$  нМ) и 84% ( $B_{\max} = 57.37 \pm 0.28$  фмоль/мг белка) соответственно.

Чувствительность  $\alpha_2$ -адренорецепторов к [ $^3\text{H}$ ]RX821002 снижается на 56% ( $K_d = 3.55 \pm 0.02$  нМ), а концентрация активных адренорецепторов увеличивается на 69% ( $B_{\max} = 12.24 \pm 0.06$  фмоль/мг белка) (рис. 30).



**Рисунок 30.** Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания [<sup>3</sup>H]RX821002 α<sub>2</sub>-адренорецепторами субклеточными фракциями мембран коры головного мозга крыс в контроле и при действии изопропилнорадреналина и пропранолола. Ось абсцисс – концентрация [<sup>3</sup>H]RX821002 (нМ), ось ординат – количество мест, связанных лигандом (b, фмоль/мг белка). 1 – контроль, 2 – изопропилнорадреналин, 3 – пропранолол.

Под влиянием пропранолола изменяется характер связывания обоих лигандов – определяются два пула рецепторов с параметрами  $K_{d1}=1.13\pm 0.09$ ,  $K_{d2} = 6.07\pm 1.06$  нМ,  $B_{m1} = 11.36\pm 1.77$ ,  $B_{m2} = 51.09\pm 0.41$  фмоль/мг белка,  $n=2$  для [<sup>3</sup>H]празозина и  $K_{d1}=0.61\pm 0.02$ ,  $K_{d2} = 3.41\pm 0.13$  нМ,  $B_{m1} = 1.88\pm 0.03$ ,  $B_{m2} = 9.27\pm 0.08$  фмоль/мг белка,  $n=2$  для [<sup>3</sup>H]RX821002 (рис. 31). Концентрация активных рецепторов ( $B_{max}$ ) возрастает в два раза для обоих лигандов.



**Рисунок 31.** Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания [<sup>3</sup>H]RX821002 α<sub>2</sub>-адренорецепторами субклеточными фракциями мембран коры головного мозга крыс в контроле (1) и при действии пропранолола (3). 4 и 5 – асимптоты высоко- и низкоаффинного пулов. Ось абсцисс – количество мест связанных лигандом (b, фмоль/мг белка), ось ординат – отношение количества мест связанных лигандом к его концентрации (b/A<sup>2</sup>, фмоль/мг/нМ<sup>2</sup>)..

Выявлено модулирующее действие изопропилнорадреналина и пропранолола на связывание специфических антагонистов α<sub>1</sub>- и α<sub>2</sub>-адренорецепторами, которое проявляется в активирующем эффекте на параметры связывания [<sup>3</sup>H]празозина и ингибиторном эффекте на

параметры связывания [<sup>3</sup>H]RX821002 и изменении общего характера связывания обоих лигандов.

Показано влияние активации и ингибирования серотониновых рецепторов на кинетику связывания специфических [<sup>3</sup>H]-лигандов адренергическими и мускариновыми рецепторами в мембранах клеток коры головного мозга крыс. Серотонин вызывает изменение общего характера взаимодействия [<sup>3</sup>H]-празозина с  $\alpha_1$ -АР: выявлены высоко- и низкоаффинный пулы рецепторов и связывание двух молекул лиганда рецептором, изменение чувствительности рецепторов и значения  $B_{max}$  [<sup>3</sup>H]-празозина в каждом пуле. При этом общее число мест связывания лиганда не изменяется. В высокоаффинном пуле отмечается повышение активности рецепторов. Чувствительность рецепторов низкоаффинного пула значительно ниже, чем в контроле.

Ингибирование серотониновых рецепторов миансеринем также вызывает существенные изменения параметров связывания [<sup>3</sup>H]празозина. В 2 раза снижается чувствительность  $\alpha_1$ -адренорецепторов, достоверно увеличивается значение  $B_{max}$ . В результате связывание лиганда при концентрациях 0.33–7.25 нМ меньше, чем в контроле, а при концентрациях 7.25–14.85 нМ превышает контрольное. Снижение аффинности рецепторов под влиянием серотонина и миансерина приводит к уменьшению эффективности связывания лиганда ( $E=B_{max}/2Kd$ ).

Исследовано модулирующее действие активации и ингибирования серотониновых рецепторов на связывание специфического антагониста мускариновых холинорецепторов [<sup>3</sup>H]-хинуклидинилбензилата ([<sup>3</sup>H]-QNB) М-холинорецепторами (М-ХР) клеточных мембран коры мозга крыс. В контрольных опытах математический анализ выявил два пула рецепторов и присоединение двух молекул лиганда к одному месту связывания. Серотонин не повлиял на общий характер взаимодействия лиганда с рецепторами: сохранились два пула. Значения  $Kd_1$  и  $Kd_2$  достоверно не изменяются, но значительно снижается общее число активных М-ХР ( $B_{max}$ ) за счет уменьшения концентрации рецепторов в высоко- и низкоаффинном пулах (на 60 и 40% соответственно). В результате почти в 2 раза снизилась эффективность связывания лиганда в обоих пулах ( $E_1$  и  $E_2$ ). Ингибиторное влияние серотонина на связывание [<sup>3</sup>H]-QNB обусловлено снижением концентрации активных рецепторов ( $B_{m1}$  и  $B_{m2}$ ). Следовательно, серотонин действует преимущественно как неконкурентный ингибитор М-ХР.

Миансерин также не изменил общего характера связывания [<sup>3</sup>H]-QNB мускариновыми рецепторами. Снизилось сродство М-ХР как высокоаффинного, так и низкоаффинного пулов (в 2.3 и в 1.4 раза соответственно). Число активных рецепторов достоверно не изменилось. За счет этого на 60% уменьшилась эффективность высокоаффинного пула и на 39% – низкоаффинного. В реакции связывания [<sup>3</sup>H]-QNB миансерин действует как конкурентный ингибитор обоих пулов М-ХР.

Таким образом, серотонин и миансерин способны количественно и качественно действовать на активность  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -адренергических и мускариновых рецепторов мембран коры головного мозга крыс. При этом агонисты и антагонисты серотониновых рецепторов по-разному аллостерически изменяют основные характеристики  $\alpha_1$  -,  $\alpha_2$ -АР и М-ХР: число пулов рецепторов, их аффинность, концентрацию активных моно- и димерных рецепторов.

Исследовано влияние активации и ингибирования мускариновых холинорецепторов на связывание специфических антагонистов с  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -адренорецепторами

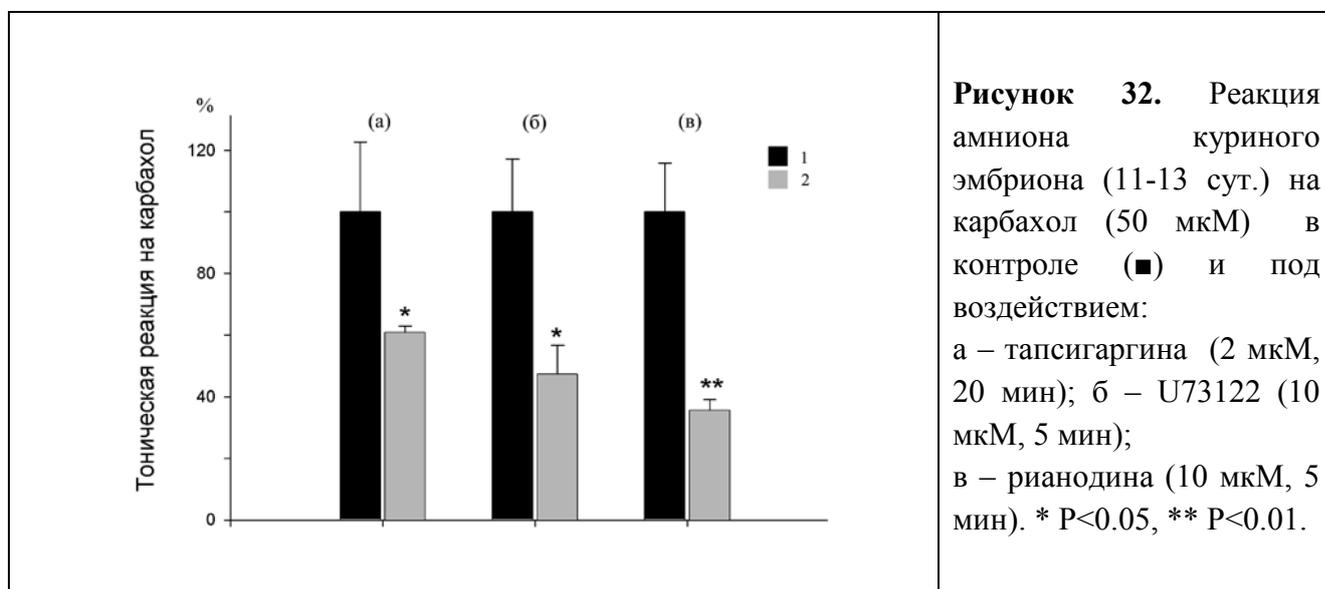
При ингибировании мускариновых холинорецепторов атропином и активации карбахолом связывание радиоактивного лиганда с  $\alpha_1$ -адренорецепторами происходит по такой же модели, но при  $n=1$ . На фоне атропина чувствительность  $\alpha_1$ -адренорецепторов к [ $^3\text{H}$ ]празозину снижается более чем в 2 раза ( $K_d=3.52\pm 0.36$  нМ), а концентрация активных адренорецепторов на 36% ( $B_{\max}=19.45\pm 1.46$  фмоль/мг белка). Под влиянием карбахола сродство адренорецепторов к лиганду не уменьшается, а количество активных рецепторов снижается так же, как на фоне атропина. Параметры связывания [ $^3\text{H}$ ]RX821002 –  $K_d=1.94\pm 0.08$  нМ,  $B_{\max}=13.37\pm 1.75$  фмоль/мг белка,  $n=2$ . Ингибирование мускариновых холинорецепторов атропином вызывает повышение аффинности  $\alpha_2$ -адренорецепторов и снижение их количества ( $K_d=1.36\pm 0.12$  нМ,  $B_{\max}=10.18\pm 0.48$  фмоль/мг белка). Агонист мускариновых холинорецепторов карбахол повышает и аффинность ( $K_d=1.56\pm 0.05$  нМ) и количество рецепторов ( $B_{\max}=16.61\pm 0.29$  фмоль/мг белка).

Выявлено модулирующее действие атропина и карбахола на связывание специфических антагонистов  $\alpha$ -адренорецепторами, которое проявляется в изменении общего характера связывания (мономеризации  $\alpha_1$ -адренорецепторов) и ингибиторном эффекте на параметры связывания [ $^3\text{H}$ ]празозина, а так же в ингибиторном эффекте на количество мест связывания рецепторов и активаторном – на связывание [ $^3\text{H}$ ]RX821002  $\alpha_2$ -адренорецепторами. Предполагается, что  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -адренорецепторы в субклеточных фракциях мембран коры головного мозга крыс существуют в виде димеров. Выявлено модулирующее действие всех исследованных агонистов и антагонистов на связывание специфических лигандов  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -адренорецепторами.

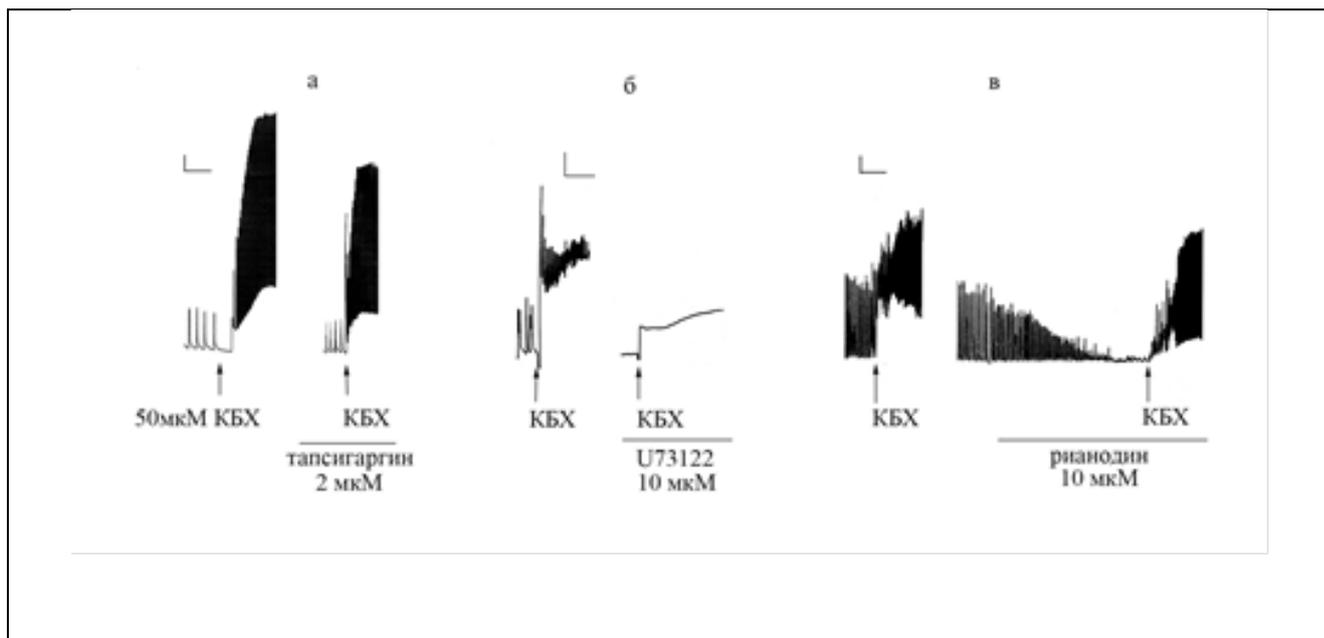
Таким образом, присутствие в межклеточной среде неспецифических нейротрансмиттеров и других активных веществ обеспечивает аллостерическое регуляторное взаимодействие (cross talk) на уровне специфических рецепторов.

Отсутствие иннервации в амнионе позволяет анализировать прямые воздействия на рецепторы, участвующие в регуляции его сократительных реакций, вне пресинаптических влияний. Механизмы реализации рецепторных сигналов в неиннервированной амниотической ткани остаются малоисследованными. Анализ кинетики взаимодействия с антагонистами мускариновых рецепторов позволяет отнести холинорецепторы амниона куриного эмбриона к М3-подтипу. Исследовали пути передачи холинергического сигнала в амнионе куриного

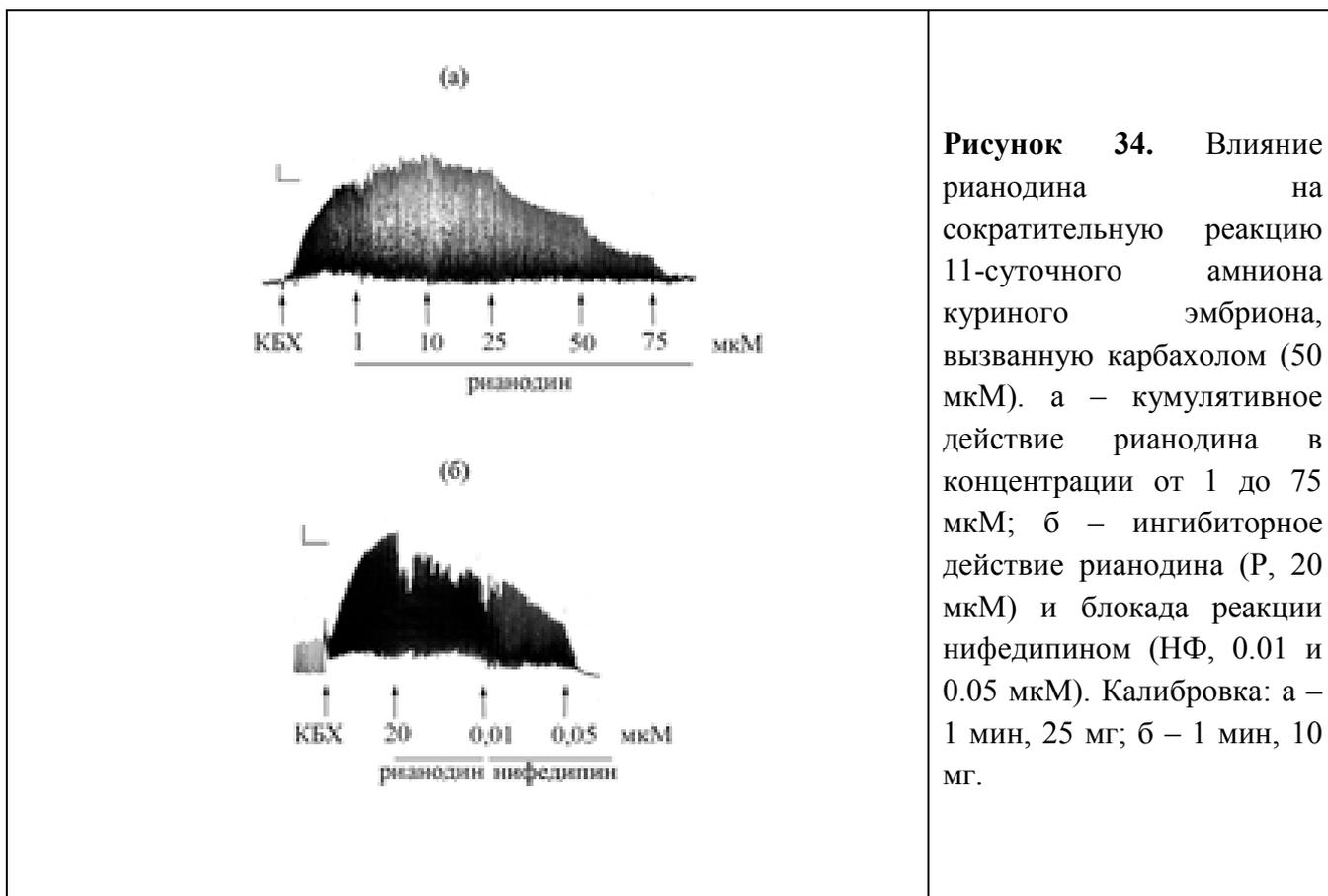
эмбриона, роль и источники ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в реализации холинергической сократительной реакции амниона. Показано, что кальций поступает в цитоплазму клетки экзогенно и из внутриклеточных источников. Нифедипин (0.1 мкМ), блокатор потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа, через которые в клетку поступает кальций, блокирует ритмические сокращения, вызванные карбахолом. Тоническая реакция на карбахол в норме и на фоне калиевой контрактуры полностью нифедипином не устраняется, следовательно, активация мускариновых рецепторов амниона приводит к входу  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму клетки экзогенно и дополнительному его высвобождению из внутриклеточных источников. Тапсигаргин, ингибитор эндоплазматических  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз, блокирующий закачку кальция в саркоплазматический ретикулум, снижает тоническую реакцию на карбахол на  $40 \pm 2\%$  (Рис. 32а, 33а), что означает участие депонированного кальция в опосредовании сократительных реакций на карбахол в изолированном амнионе.



Роль системы депонированного кальция в реализации сократительных реакций на холиномиметики в амнионе ранее не изучалась. За высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо отвечают два типа рецепторов: рианодиновые и рецепторы инозитол-1,4,5-трисфосфата ( $\text{IP}_3$ ). Участие в реализации мускариновой реакции в амнионе ионов кальция, мобилизуемых из внутриклеточных запасов через инозитолтрифосфатные рецепторы ( $\text{IP}_3$ ), установлено при действии аминостероида U73122, который является ингибитором фосфоинозитид-специфической фосфолипазы C, ключевого фермента метаболизма фосфатидинозитола. На фоне U73122 ритмическая сократительная реакция амниона на карбахол (КБХ) отменяется, а тоническая реакция снижается до  $47 \pm 9\%$  от исходной (Рис. 32б, 33б). Это означает, в опосредовании сократительной реакции амниона, вызванной стимуляцией M3-холинорецепторов, участвует фосфоинозитидная система.



**Рисунок 33.** Ингибирование реакции амниона куриного эмбриона (11-13 сут.) на карбахол (50 мкМ): а – тапсигаргином (2 мкМ, 20 мин); б – U73122 (10 мкМ, 5 мин); в – рианодином (10 мкМ, 5 мин). Калибровка: 1 мин, 25 мкг.



**Рисунок 34.** Влияние рианодина на сократительную реакцию 11-суточного амниона куриного эмбриона, вызванную карбахолом (50 мкМ). а – кумулятивное действие рианодина в концентрации от 1 до 75 мкМ; б – ингибиторное действие рианодина (Р, 20 мкМ) и блокада реакции нифедипином (НФ, 0.01 и 0.05 мкМ). Калибровка: а – 1 мин, 25 мкг; б – 1 мин, 10 мкг.

Для выявления вклада депонированного кальция, выбрасываемого в цитоплазму через рианодиновые рецепторы, исследовали активность модулятора этих рецепторов – рианодина.

Рианодин приводит к блокаде спонтанной сократительной активности амниона и снижает тоническую реакцию на КБХ до  $36 \pm 3\%$  (Рис.1в). В реакциях без выраженного тонического компонента рианодин (10–75 мкМ) дозозависимо ингибирует амплитуду вызванных КБХ сокращений до полного их прекращения. На фоне действия рианоидина холинергическая реакция становится высокочувствительной к нифедипину, блокатору потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа. Нифедипин в концентрации 0.05 мкМ полностью блокирует реакцию на КБХ, включая тоническую компоненту (рис. 34).

Таким образом, впервые показано, что сократительные реакции амниона куриного эмбриона, обусловленные активацией М3-холинорецепторов, зависят от экстраклеточного  $Ca^{2+}$ , входящего через потенциалуправляемые каналы L-типа, и мобилизации  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных запасов через рецепторы инозитолтрисфосфата и рианоидиновые рецепторы. Вовлечение разных источников  $Ca^{2+}$  обеспечивает значительный по величине  $Ca^{2+}$ -сигнал и долговременную и высокоамплитудную реакцию.

При исследовании системы депонированного кальция, участвующей в опосредовании М-холинергической реакции в амнионе, обратил на себя внимание тот факт, что кофеин, классический активатор рианоидиновых рецепторов, не вызывал сократительной реакции. В экспериментах *in vitro* исследовали действие кофеина на гладкомышечный амнион куриного эмбриона. Считается, что кофеин в концентрации 10 мМ опустошает внутриклеточные депо путем кофеин-индуцированного высвобождения  $Ca^{2+}$ . В наших опытах кофеин в концентрации 1-10 мМ не вызывал сокращений интактного препарата, из чего следует, что в качестве агониста рианоидиновых рецепторов кофеин в амнионе не работает. Однако в ряде опытов на фоне снижения тонической реакции на КБХ кофеин при повышении его концентрации более 1 мМ в кумулятивной записи вызывал ритмические сокращения. В концентрации 1 мМ кофеин блокировал спонтанные сокращения амниона и снижал тоническую реакцию на КБХ до 34% от контроля. Расслабляющее действие кофеина на КБХ-вызванную реакцию было дозозависимым: кумулятивное введение кофеина на фоне реакции, вызванной КБХ, приводило к ее торможению. Параметры ингибирования составляли  $IC_{50}=0,35 \pm 0,04$  мМ,  $P_{max}=103 \pm 5\%$ ,  $n=1,36 \pm 0,15$ . Ингибитор аденилатциклазы SQ 22536 в концентрации 10 мкМ реакцию на кофеин не изменяет. Показано, что эффективность ингибирующего действия кофеина (0,1 - 1 мМ) на холинергическую реакцию на фоне действия рианоидина (5 мкМ) возрастала. В бескальциевом физиологическом растворе (10 мин) КБХ способен вызывать небольшое по амплитуде тоническое сокращение, которое блокируется кофеином (1 мМ). Как один из вероятных путей действия кофеина в амнионе куриного эмбриона можно рассматривать блокаду IP3 рецепторов, что представляет интерес при изучении механизмов генерации и регуляции кальциевого сигнала в клетках в условиях стимуляции рецепторов, приводящих к активации фосфоинозитидного цикла. Активность IP3R в амнионе подтверждает действие U73122, ингибитора фосфоинозитид-специфической

фосфолипазы C, который приводит к прекращению ритмической сократительной реакции амниона на КБХ и падению тонической реакции в 3 раза. Показано, что торможение вызванных сокращений в амнионе опосредуется бета-адренергическими рецепторами. Бета-адреномиметик изопротеренол (5нМ – 1мкМ) и активатор аденилатциклазы (АЦ) форсколин (2,5 – 5 мкМ) действуют синергично, полностью блокируют сократительную активность амниона и взаимно усиливают эффекты друг друга, что свидетельствует о вовлечении цАМФ-зависимых механизмов в реализацию реакции амниона на бета-адренергические агонисты. Ингибитор АЦ MDL-12330A (1 – 10 мкМ) вызывает незначительное расслабление интактного препарата (не более 10% от максимальной реакции на карбахол) и снижение амплитуды и частоты вызванных КБХ сокращений. Тоническая реакция на КБХ под воздействием MDL-12330A снижалась на 35% как в случае предварительного введения ингибитора (10 мин), так и на фоне действия КБХ. При этом блокирующая способность изопротеренола и форсколина либо не изменялась совсем, либо снижалась не более чем на 10-20%. Таким образом, полностью действие изопротеренола и форсколина MDL-12330A не отменяет. При исследовании биологических реакций, опосредуемых цАМФ, следует учитывать неспецифические эффекты ингибитора АЦ MDL-12330A.

#### **6.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Модулирующее действие агонистов и антагонистов различных систем (адренергической, серотонинергической и холинергической) на связывание рецепторами другой системы, может свидетельствовать о том, что присутствие в межклеточной среде различных нейротрансмиттеров и других активных веществ обеспечивает в организме их аллостерическое регуляторное взаимодействие (cross talk) на уровне специфических рецепторов. Действие нейротрансмиттеров и антагонистов на активность неспецифических для них нейрорецепторов является одним из путей адаптивной регуляции работы нервной системы. Для радиолигандных экспериментов вероятен рецепторный уровень. Количественная оценка содержания моно- и димерных рецепторов в пуле с единой аффинностью ( $K_d$ ) позволяет получить принципиально новые функциональные характеристики исследуемых рецепторных систем.

В физиологических реакциях взаимодействие различных нейротрансмиттерных систем может осуществляться как на рецепторном, так и пострецепторном внутриклеточном уровне. Отсутствие иннервации в амнионе куриного эмбриона позволяет анализировать прямые воздействия на рецепторы, участвующие в регуляции его сократительных реакций, исключив пресинаптические влияния.

Полученные нами данные о механизмах реализации рецепторных сигналов в неиннервированном амнионе куриного зародыша согласуются с результатами исследований  $M_3$ -холинорецепторов и бета-адренорецепторов иннервированных гладких мышц.

## **Раздел 7. Развитие внутримозговых связей: афферентные и эфферентные связи преоптической области гипоталамуса. Развитие внутримозговых связей в процессе перинатального онтогенеза**

### **7.1. ВВЕДЕНИЕ**

Одним из наиболее важных, однако, мало изученным фундаментальным вопросом в исследовании развития мозга позвоночных животных остается вопрос о том, как происходит последовательное формирование специфической пространственной структуры внутримозговых связей. До сих пор существуют лишь единичные данные о том, какие проводящие системы мозга формируются пренатально, а какие постнатально, и в какой последовательности, тогда как существует мнение, что подобные сведения могут быть чрезвычайно важны при анализе возникающей позднее патологии мозга. Исследование пренатального и ранних этапов постнатального развития проводящих систем мозга, на стадиях, когда они еще не достигли сложности, характерной для взрослых животных, представляет особый интерес, т.к. может внести существенный вклад в наши представления о ходе развития и усложнения организации нервной системы в целом. Подобные исследования

Гипоталамус на протяжении ряда лет является объектом исследования автора проекта. Его роль в центральной нервной системе, как главного подкоркового центра интеграции висцеральных процессов, и многообразие его афферентных и эфферентных аксональных связей с другими отделами мозга делают этот отдел промежуточного мозга чрезвычайно важным объектом изучения формирования аксональных связей в процессе перинатального развития.

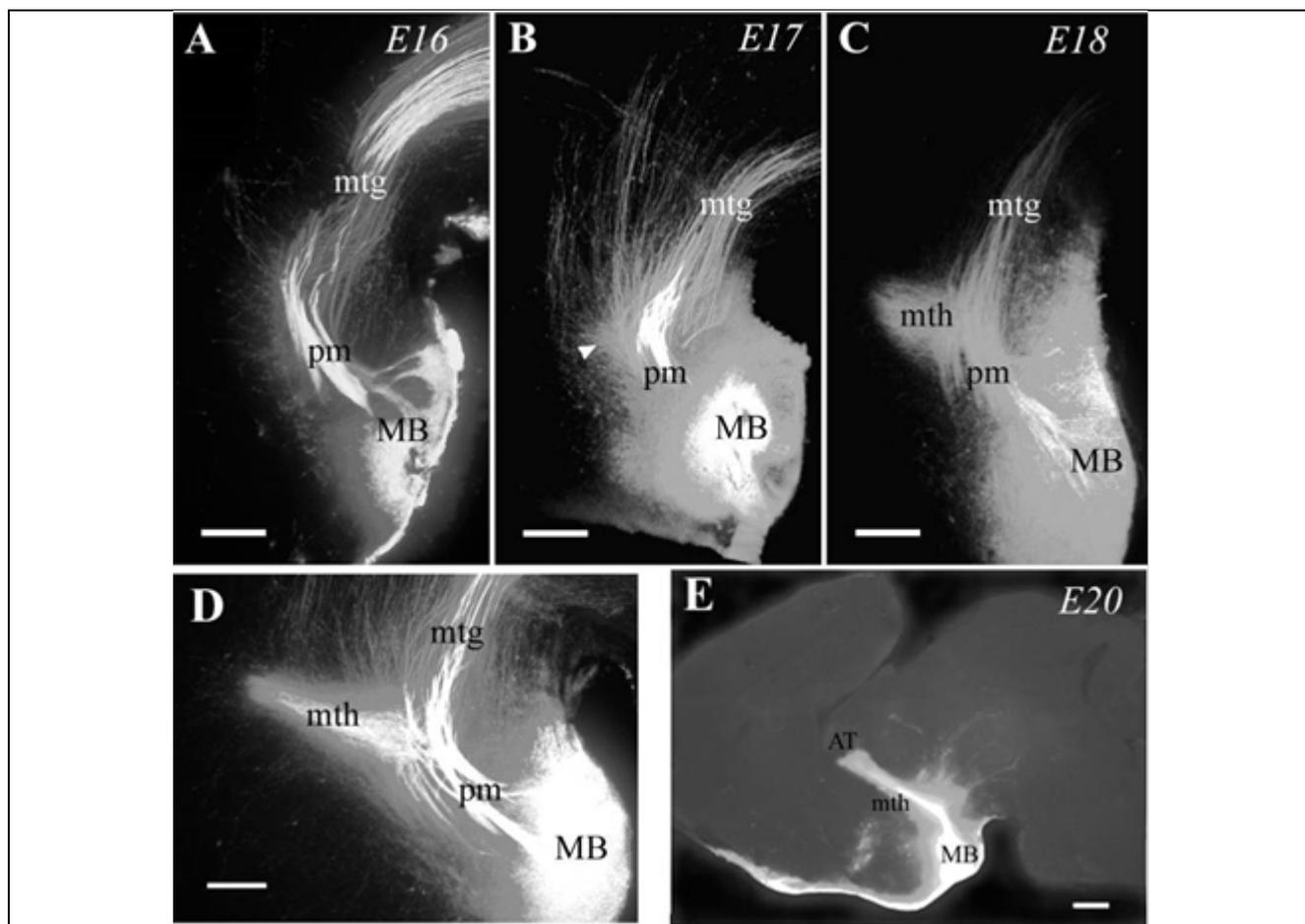
С помощью метода диффузии липофильного карбоцианинового красителя DiI исследовано и описано нормальное перинатальное развитие проекций латеральной преоптической области и латерального гипоталамуса с ядрами уздечки у крыс, осуществляемых посредством медуллярной полоски.

### **7.2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Были обобщены и проанализированы посвященного развитию гипоталамуса данные многолетних исследований перинатального развития нескольких важных систем связей гипоталамуса: гипоталамо-гипофизарные проекции, септо-гипоталамические, маммилло-таламические, маммилло-теgmentальные проекционные системы. Особенностью этих работ является использование уникального метода диффузии карбоцианиновых красителей по мембранам нейронов.

Был использован наиболее эффективный краситель DiI (1,10-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (DiI) (Molecular Probes, Eugene, OR). В результате были

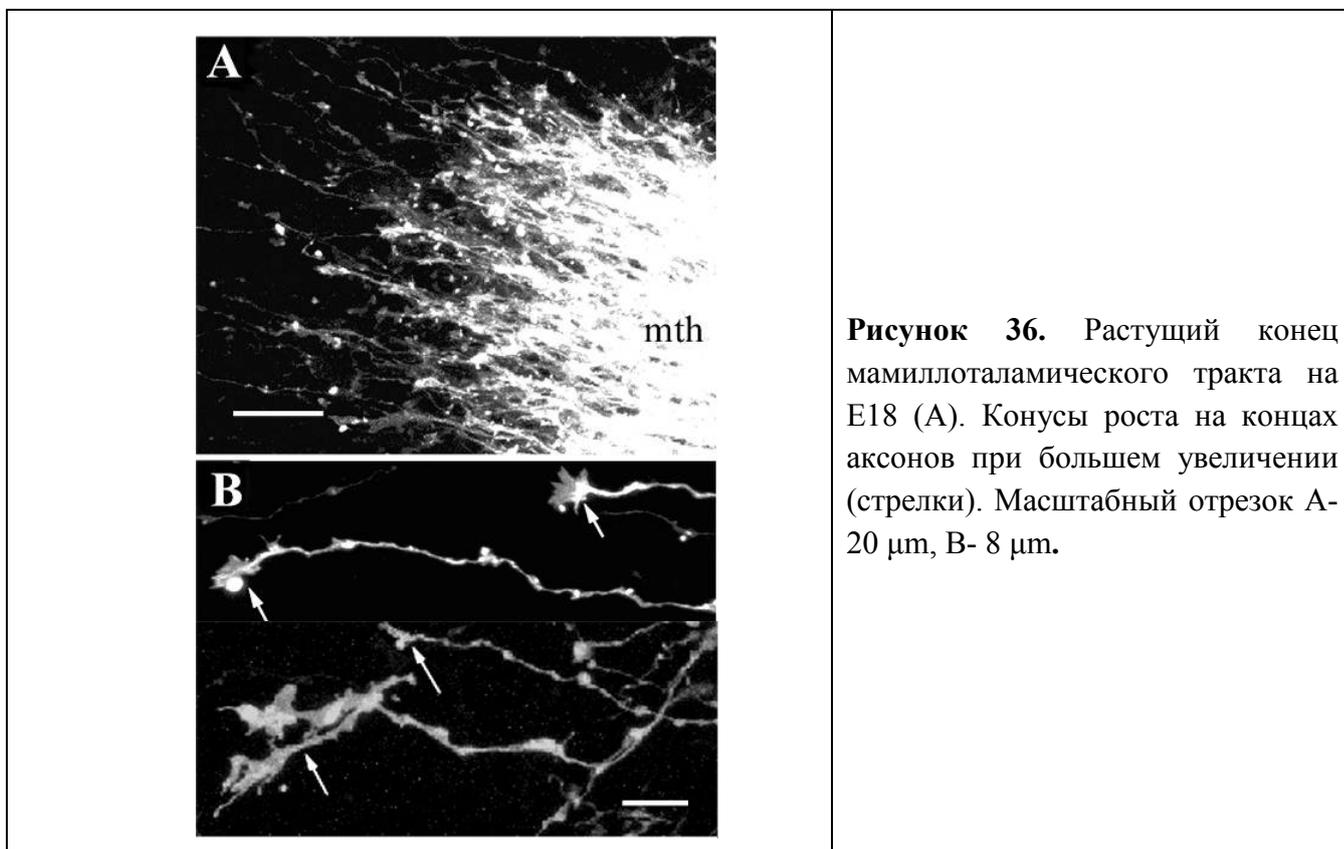
установлены сроки формирования всех исследованных систем. Эти материалы были опубликованы в виде обзора в специальном выпуске журнала *Frontiers in Neuroanatomy* (doi: 10.3389/fnana.2014.00144), посвященного развитию гипоталамуса. Было подтверждено, что использование карбоцианиновых красителей является адекватным методом для изучения развития проводящих систем мозга. При четкой постановке эксперимента (точное нанесение маркера на мозг на разных сроках перинатального развития) он дает возможность проследить все этапы формирования исследуемой системы связей.



**Рисунок 35.** Сагиттальные срезы мозга плодов крыс на разных сроках развития (E16 –E20) после нанесения кристаллов DiI в область мамиллярных тел (MB). А - Мамиллотегментальный тракт(mtg) хорошо выражен уже на E16 (шестнадцатый день эмбрионального развития). В – первые признаки появления коллатералей от аксонов mtg обнаруживаются на E17; С, D – с E18 появляется мамиллоталамический тракт (mth) в виде компактного пучка, растущего в направлении переднего таламуса; Е – к E20 mth вентральных отделов передней группы ядер таламуса. Масштабный отрезок - 200  $\mu$ m.

Наглядным примером служит исследование развитие проекций мамиллярных тел на средний мозг (мамилло-тегментальный тракт) и передние ядра таламуса (мамиллоталамический тракт) (Рис. 35).

Интерес представляет тот факт, что аксоны мамиллоталамического тракта растут одновременно, формируя на концах конусы роста, что было показано с помощью конфокальной микроскопии (Рис. 36). Был также описан характер распределения терминальных ветвлений аксонов в трех парных ядрах переднего таламуса и особенности формирования ипсилатеральных и контралатеральных проекций.



**Рисунок 36.** Растущий конец мамиллоталамического тракта на E18 (А). Конусы роста на концах аксонов при большем увеличении (стрелки). Масштабный отрезок А- 20  $\mu\text{m}$ , В- 8  $\mu\text{m}$ .

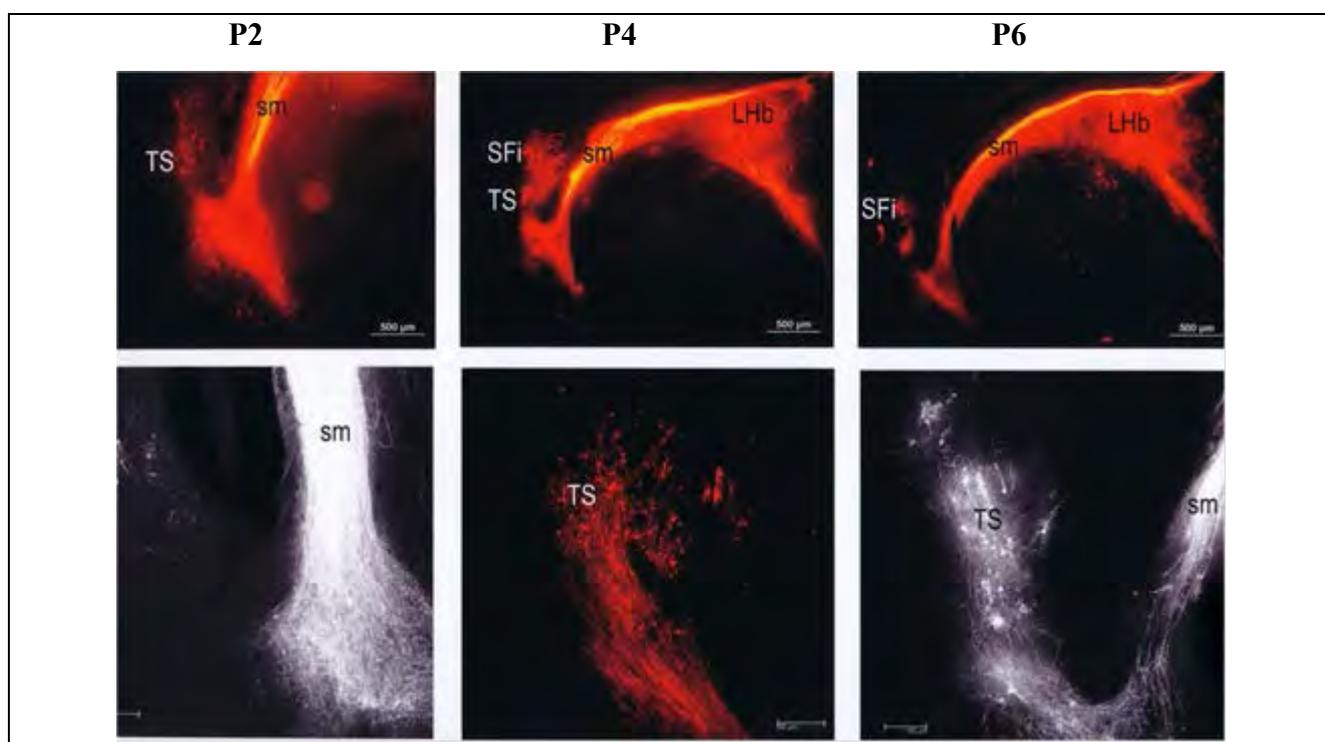
Было впервые описано, что формирование иннервации ядер перегородки мозга крыс, нейронами гипоталамуса и таламуса начинается на ранних стадиях эмбрионального развития и к моменту рождения обнаруживаются все источники данных связей, описанные у взрослых животных.

На следующем этапе было начато исследование развития дорзальной проводящей системы мозга, которая своеобразным связующим звеном между ядрами лимбической системы, гипоталамусом, и ядрами среднего мозга с переключением в ядрах уздечки. Она состоит из двух основных трактов (медуллярная полоска и хабенулоинтерпедункулярный тракт), которые в свою очередь включают по несколько проводящих систем каждый.

Было изучено развитие 1 компонента медуллярной полоски - проекций ядра ложа конечной полоски (Bed nucleus of Stria terminalis - BST) на уздечку с помощью карбоцианинового красителя DiI. Маркер наносили, как в область уздечки, выявляя тела нейронов в BST, так и в ядра уздечки для исследования распределения аксонов в ядрах уздечки. Проекция BST на латеральное ядро

уздечки обнаружены начиная с 18 дня эмбрионального развития и позже вплоть до 6 дня постнатального развития. Связи BST с медиальным ядром уздечки не выявлены на исследованных сроках развития.

Вторая составляющая медуллярной полоски: проекции ядер перегородки на уздечку. Было показано, что нейроны треугольного и септофимбриального ядер перегородки у крыс иннервируют только медиальное ядро уздечки, причем эти связи начинают формироваться преимущественно в течение первой недели после рождения. Нанесение маркера на уздечку выявило нейроны в септофимбриальном ядре уздечки начиная с P0 (первого дня постнатального развития), тогда как первые нейроны в треугольном ядре обнаруживались уже на 21 день эмбрионального развития (Рис. 37).



**Рисунок 37.** Нанесение DiI на уздечку (LHb) на разных сроках постнатального развития выявляет меченые аксоны в медуллярной полоске (sm) которые прослеживаются на сагиттальных срезах мозга вплоть до задних ядер перегородки (верхний ряд). Нероны меченые DiI в септофимбриальном (SFi) и треугольном (TS) ядрах перегородки при большем увеличении (нижний ряд).

Было изучено развитие третьего компонента в составе медуллярной полоски:

проекций латеральной преоптической области гипоталамуса. Нанесение кристаллов маркера в уздечку выявляло меченые нейроны в преоптической области лишь в случаях, когда маркер в месте нанесения распространялся в латеральном ядре уздечки. На пренатальных стадиях развития

(E17-21) число клеток в ЛПО было невелико, и возрастало лишь после рождения. На P2 и позже нейроны P0 иннервирующие латеральное ядро уздечки имели вид мультиполярных клеток и образовали несколько групп. Эти данные были подтверждены и в случаях с нанесением DiI в преоптическую область, поскольку липофильный краситель DiI распространяется по мембранам нейронов не только ретроградно, но и антероградно. Меченые аксоны прослеживались в медуллярной полоске вплоть до ЛУ, начиная с Э17. На E20-21 наблюдалось их характерное распределение терминальных ветвлений аксонов в дорзолатеральном, вентролатеральном и вентромедиальном отделах латерального ядра уздечки. Такой же характер иннервации по периферии, а не в центральной части был обнаружен и постнатально. Следовательно, проекции латеральной преоптической области гипоталамуса на уздечку начинают формироваться пренатально, имеют специфическую топографическую организацию и хорошо развиты к P6.

### **7.3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Все полученные результаты уникальны и не описаны ранее в литературе. Они являются важным вкладом в фундаментальные представления о развитии проводящих систем мозга позвоночных животных. Анализ полученных результатов указывает на необходимость проведения дальнейших исследований.

## Заключение

Представленные отчетные результаты по всем семи разделам темы научной работы показали, что поставленные авторами задачи исследования в отчетный период выполнены.

Накопленные, проанализированные результаты в основном опубликованы.

В ходе выполнения поставленных задач для исследователей практически в каждом разделе наместились новые задачи для дальнейшего исследования.

Прежде всего, наместились интересные задачи по раскрытию активности определенных генов, чья экспрессия непосредственно обеспечивает активацию метаболизма и транспорта ключевых медиаторных систем, задействованных в реализации определенных программ поведения.

Таким образом, исследование клеточных и молекулярных механизмов формирования и реализации поведения выходит на молекулярно-генетический уровень.

Вторым крайне актуальным направлением дальнейших исследований могут стать выяснение роли посттрансляционных модификаций медиаторных систем как значимых факторов регуляции развития, которые в таком химически стабильном виде могут участвовать в процессах адаптации к стрессорам, обеспечивать процессы памяти, обучения, реализовать оптимальные взаимодействия внутри и между популяциями разных видов.

Это направление дополняет и обеспечивает целостное представление о значении медиаторных систем в онтогенезе изучение их становления на донервных стадиях развития, на начальных этапах эмбриогенеза, а также в процессе химической коммуникации «мать-зародыш».

Анализ лиганд-рецепторных взаимодействий в физиологических и биохимических реакциях как направление дальнейших исследований оптимально представлен разрабатываемыми программными продуктами для более углубленного анализа данных.

Исследование развития внутримозговых связей в процессе перинатального онтогенеза и становления внутримозговых связей в различных отделах мозга актуальное направление, существенно обогащающее знания о формировании морфофункциональных связей.

## **Публикации по теме**

### Главы в книгах

1. **Voronezhskaya E.E.**, Croll R.P. (2016) Mollusca: Gastropoda. Invited chapter in "Structure and evolution of invertebrate nervous systems." Eds. Schmidt-Rhaesa, A., Harzsch, S. and Purschke, G. Oxford University Press. PP. 196-221

**Авдониин П.В.** Рецепторы. // Большая Российская энциклопедия. 2015. Т. 28. С. 449-451.

### Патент РФ

Юрченко О.В., Дячук В.А., **Хабарова М.Ю.**, Ивашкин Е.Г., **Воронежская Е.Е.** Патент на изобретение № 2538396 «Способ культивирования двустворчатых моллюсков». Заявка № 2013144645. Приоритет изобретения 07 октября 2013 г. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 20 ноября 2014 г.

### Статьи в периодических изданиях

1. Erokhina M.V., Avdienko V.G., Lepekha L.N., Nezlin L.P., Voronezhska E.E. Immunohistochemical detection of Mycobacterium tuberculosis in tissues of consumptives using laser scanning microscopy.// Biology Bulletin. 2016. Т. 43. № 1. С. 21-25. DOI: 10.1134/S1062359016010052
2. Fofanova E.G., Nezlin L.P., Voronezhskaya E.E. iliary and nervous structures in juvenile female of the annelis *Dinophilus*, 1848) *gyrociliatus* (O.Schmidt)(Annelida: Polychaeta). // Russian Journal of Marine Biology. 2014. Т. 40. № 1. С. 43-52.
3. Glebov K., Voronezhskaya E., Khabarova M., Ivashkin E., Nezlin L., Ponimaskin E., 2014. Mechanisms underlying dual effects of serotonin during development of *Helisoma trivolvis*. // BMC Developmental Biology, DOI: 10.1186/1471-213X-14-14
4. Ivashkin E, Khabarova MY, Melnikova V, Nezlin LP, Kharchenko O, Voronezhskaya EE, Adameyko I. Serotonin Mediates Maternal Effects and Directs Developmental and Behavioral Changes in the Progeny of Snails. // Cell Reports (2015). 12(7):1144-1158. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.022.
5. Ivashkin E., Voronezhskaya E. and Adameyko I. A paradigm shift in neurobiology: peripheral nerves deliver cellular material and control development // Zoology (2014) 117(5):293-294
6. Kerbl A., **Fofanova E.G.**, **Mayorova T**, **Voronezhskaya E.E.**, Worsaae K. Comparison of neuromuscular development in two dinophilid species (Annelida) suggests progenetic origin of *Dinophilus gyrociliatus* // Frontiers in Zoology. 2016. DOI: 10.1186/s12983-016-0181-x
7. **Korshunova T**, Sanamyan N, Zimina O, Fletcher K, Martynov A. Two new species and a remarkable record of the genus *Dendronotus* from the North Pacific and Arctic oceans (Nudibranchia) // ZooKeys. 2016. V. 630. P. 19–42. DOI: 10.3897/zookeys.630.10397

8. **Korshunova T.A., Vorontsov D.D., Dyakonova V.E.** Previous motor activity affects transition from uncertainty to decision-making in snails // *J Exp Biol.*, 2016: DOI: 10.1242/jeb.146837
9. **Korshunova TA, Sanamyan NP, Martynov AV .** Morphological and molecular evidence indicate *Dendronotus primorjensis* is a valid species that has priority over *D. dudkai* (Nudibranchia) // *ZooKeys*. 2016. V. 634. P. 15–28. DOI: 10.3897/zookeys.634.10231
10. **Mayorova TD, Tian S, Cai W, Semmens DC, Odekunle EA, Zandawala M, Badi Y, Rowe ML, Egertová M and Elphick MR (2016)** Localization of Neuropeptide Gene Expression in Larvae of an Echinoderm, the Starfish *Asterias rubens* // *Front. Neurosci.* 10:553. DOI: 10.3389/fnins.2016.00553
11. **Nikishin D.A., Milošević I., Gojković M., Rakić Lj., Bezuglov V.V. and Shmukler Yu.B.** Expression and functional activity of neurotransmitter system components in sea urchins' early development // *Zygote*. 2016. V. 24. I. 02. P. 206-218. DOI:10.1017/S0967199415000040
12. **Orlova O., Emirova K., Avdonin Pavel, Evgeniya Tolstova, Tatiana Pancratenko, Tatiana Abaseeva, Alexandr Muzurov, Alexandr Burovand Alexandr Burov.** Analysis of serum activity of ADAMTS13 of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) hemolytic uremic syndrome (HUS) in children. // *Nephrology Dialysis Transplantation* 31 (Supplement 1): i147–i159, 2016. DOI:10.1093/ndt/gfw162.37 <http://ndt.oxfordjournals.org/>
13. **Orlova O., Emirova K., Tolstova E., Pancratenko T., Abaseeva T., Muzurov A., Burov A., Avdonin P.** Association Between Serum Activity of Adamts13 and Severity of Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) in Children // *Pediatric Nephrology*. 2016. T. 31 B. 10. C. 1885-188.
14. **Rasnitsyn A.P., Bashkuev A.S., Kopylov D.S., Lukashevich E.D., Ponomarenko A.G., Popov Yu.A., Rasnitsyn D.A., Ryzhkova O.V., Sidorchuk E.A., Sukatsheva I.D., Vorontsov D.D.** Sequence and scale of changes in the terrestrial biota during the Cretaceous (based on materials from fossil resins) // *Cretaceous Research*. 2016. P. 234-255, DOI: 10.1016/j.cretres.2015.12.025
15. **Shipway J.R., O Conner R., Stein D., Cragg S.M., Korshunova T., Martynov A., Haga T., Distel D.L.** *Zachsia zenkewitschi* (Teredinidae), a rare and unusual seagrass boring bivalve revisited and redescribed // *PLOS one*. 2016. V. 11. P. 1-12. DOI 10.1371/0155269
16. **Асеев Н.А., Малышев А.Ю., Коршунова Т.А., Браваренко Н.И., Лемак М.С., Рошин М.В., Захаров И.С., Балабан П.М.** Адаптация физиологической реакции органа равновесия к условиям микрогравитации: эксперименты на спутниках «Фотон» // *Сенсорные системы*. 2013, Т. 27, № 4, С. 327–337.
17. **Богуславский Д.В., Захаров И.С.** Педальные пептиды и их роль в центральной нервной системе моллюсков // *Успехи современной биологии*, 2015, Т. 135, №3. С. 307-320.
18. **Бойко О.В., Манухин Б.Н.** Внутриклеточная передача холинергического сигнала в амнионе куриного эмбриона // *Известия РАН. Серия биологическая*. 2014. № 1. С.1-5.

19. Воронежская Е.Е. Как серотонин матери определяет тип поведения потомков?// Природа. 2016. № 2. С. 80-81.
20. Ерохина М.В., Незлин Л.П., Авдиенко В.Г., **Воронежская Е.Е.**, Лепеха Л.Н. Иммуногистохимическое выявление *Mycobacterium tuberculosis* в ткани легких у больных туберкулезом с использованием лазерной сканирующей микроскопии. // Известия РАН. Серия биологическая. 2016. №1. С. 27-31. DOI: 10.7868/S0002332916010057
21. Жарких И.Л., Надеев А.Д., **Цитрин Е.Б.**, Гончаров Н.В., **Авдонин П.В.** Подавление блокаторм двупоровых каналов trans-NED19 и пероксидом водорода индуцированных гистамином расслабления аорты крысы и кальциевого сигнала в эндотелиальных клетках // Известия РАН Серия биологическая. 2016, №3, С.1-9.
22. **Манухин Б.Н., Нестерова Л.А.** Аллостерическое влияние серотонина и миансерина на кинетику связывания специфических [3H]лигандов адренергическими и мускариновыми рецепторами в мембранах клеток коры головного мозга крыс // Известия РАН. Серия биологическая. 2015., № 2, С. 1–11.
23. Мехтиев А.А., Гайсина А.А., **Воронежская Е.Е., Хабарова М.Ю.**, Гудратов Н.О., Гусейнов Ш.Б. Участие серотонин-модулируемого антиконсолидационного белка в регуляции развития эмбрионов большого прудовика (*Lymnaea stagnalis*) и саркомы Льюиса у мышей гибридной линии (FL C57B2/6 X DBA) // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2016. Т. 102. № 4. С. 490-499.
24. **Муслихов Э.Р., И.Ф. Суханова, П.В. Авдонин.** Арахидоновая кислота активирует выброс ионов кальция из ретикулума скелетных миотубул C2C12 через рианодин-чувствительные каналы. // Биохимия, 2014, том 79, вып. 5, с. 553–559.
25. Надеев А. Д., В.П. Зинченко, **П. В. Авдонин**, Н. В. Гончаров. Токсические и сигнальные свойства активных форм кислорода. // Токсикологический вестник 2014, №2 (125), с.22-27.
26. Надеев А. Д., И. Л. Жарких, **П. В. Авдонин**, Н. В. Гончаров. Серотонин и рецепторы серотонина в клетках сердечно-сосудистой системы. // Экспериментальная и клиническая фармакология 2014;77(5):32-7.
27. **Нестерова Л.А. Манухин Б.Н.** Агонисты и антагонисты серотониновых рецепторов – модуляторы активности  $\alpha 2$ -адренорецепторов мембран коры головного мозга крыс // Биологические мембраны 2013, Т. 30, №4, С. 297-303.
28. **Нестерова Л.А., Бойко О.В., Манухин Б.Н.** Модуляция активности альфа-адренорецепторов мембран коры головного мозга крыс агонистом и антагонистом бета-адренорецепторов // Биологические мембраны, 2016, Т. 33, № 4, С. 252–262.

29. Обухова А.Л., **Воронежская Е.Е.**, Малахов В.В. Морфология фронтальных филаментов у науплиев *Verruca stroemica* (Muller, 1776) и *Hesperibalanus hesperius* (Pilsbry, 1916) (Cirripedia Thoracica). // Биология моря, (2015). 41 (5): 331-339
30. Обухова А.Л., **Воронежская Е.Е.**, Малахов В.В. Тонкая морфология фронтальных филаментов у науплиев усоногих ракообразных (Cirripedia) // Доклады Академии наук. 2016. Т. 468. № 3. С. 351-353
31. **Обухова А.Л., Воронежская Е.Е.**, Малахов В.В. Тонкая морфология фронтальных филаментов у науплиев усоногих ракообразных (Cirripedia) // Доклады Академии наук. 2016. Т. 468. № 3. С. 351-353
32. Силина С.Г., **Никишин Д.А.**, Кремнёв С.В. Пространственно-временной паттерн экспрессии генов механочувствительных ионных каналов семейства TRP в раннем развитии *Xenopus tropicalis* // Биологические мембраны. 2015. Т. 32(3). С. 1-8.
33. Фофанова Е.Г., **Незлин Л.П., Воронежская Е.Е.** Ресничные и нервные элементы у ювенильных самок аннелиды *Dinophilus gyrociliatus* (O. Schmidt, 1848) (Annelida; Polychaeta) // Биология моря. 2014. том 40, № 1, с. 46–56.

#### Тезисы, статьи в сборниках

1. **Zakharov I., Boguslavsky D.**, Balaban P. Behavioral patterns and patterns of neurospecific gene expression in embryonic and postembryonic development in snail / XI East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology “Simpler Nervous Systems” Zvenigorod 15-19 May 2016. P.87.
2. **Авдониин П.В.**, Надеев А.Д., Жарких И.Л., Фёдорова Е.С., Суханова И.Ф., Кожевникова Л.М., Гончаров Н.В. Влияние агонистов 5HT1B- и 5HT2B-рецепторов CGS12066B и BW723C на обмен ионов кальция в эндотелиальных клетках и сосудистую сократимость. Сборник статей международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пущино 2013, Т.1, С. 176-180
3. **Богуславский Д.В., Захаров И.С.** Новый ген, экспрессирующийся в серотонинергических нейронах виноградной улитки / Молодые ученые – медицине: Материалы XIV научной конференции молодых ученых и специалистов с международным участием – Владикавказ: ГБОУ ВПО СОГМА Минздрава России. Изд-во «Олимп». 2015, С. 31-34.
4. **Бойко О.В.** Влияние тамоксифена на мускариновые холинергические реакции в амнионе куриного эмбриона // V съезд биофизиков России. Материалы докладов. 4-10 октября 2015 г. Ростов-на-Дону. Издательство Южного Федерального университета. 2015. Т.1. С. 178.

5. **Бойко О.В.** Действие MDL-12330A на цАМФ-опосредуемые бета-адренергические реакции в неиннервированном амнионе куриного эмбриона // Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM // Сочи-Дагомыс, Россия, 4–8 октября 2016 г., Acta naturae. Спецвыпуск. Том 1. С. 62-63.
6. **Бойко О.В.** Действие кофеина на сократительные реакции, опосредованные М3-холинорецепторами в амнионе куриного эмбриона // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 2. / Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – Пущино: 2015, С. 592-595. (Международная конференция 25–28 мая 2015 г.).
7. **Бойко О.В.** Передача сигнала при активации М3 рецепторов амниона куриного эмбриона // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – М.: ООО «ИД В. Ема». 2013. Т.1. С. 186–191.
8. **Бойко О.В.** Торможение кофеином сократительной реакции амниона куриного эмбриона на карбахалин // IV съезд физиологов СНГ. Сочи-Дагомыс, 8-12 октября 2014 г., С. 82.
9. **Воронежская Е.Е.** Ранние события в нейрогенезе моллюсков и аннелид: что важно при проведении сравнительных исследований и филогенетических построений. // В сборнике : Современные проблемы эволюционной морфологии животных материалы школы для молодых специалистов и студентов с международным участием к 110-летию со дня рождения академика А. В. Иванова. 2016. С. 13-15.
10. **Дьяконова В.Е., Коршунова Т. А., Воронцов Д.Д.** Влияние двигательной активности на скорость принятия решения в витальной ситуации у улитки. // Материалы Конференции «Когнитивная наука в Москве: новые исследования». Москва. 2015 С. 125-130.
11. **Муслихов Э.Р., Авдонин П.В.** Арахидоновая кислота активирует выброс ионов кальция из саркоплазматического ретикулума через рианодиновые рецепторы в миотубулах линии С2С12. // Сборник статей международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пущино 2013, Т.1, С.217-221
12. **Надеев А.Д., Зинченко В.П., Авдонин П.В., Гончаров Н.В.** Сигнальные и токсические эффекты активных форм кислорода (АФК). Часть 1: Источники АФК. // Сборник статей международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пущино 2013, Т.2, С.569-576.
13. **Нестерова Л.А.** Агонисты и антагонисты бета-адренорецепторов - модуляторы активности альфа-адренорецепторов мембран коры головного мозга крыс // Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM // Сочи-Дагомыс, Россия, 4–8 октября 2016 г., Acta naturae. Спецвыпуск. Т. 1. С. 63.
14. **Нестерова Л.А., Бойко О.В.** Аллостерическая модуляция активности альфа-адренорецепторов атропином и карбахолом в мембранах коры головного мозга крыс // XII

Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» Судак, Крым, Россия, 1-11 июня 2016 г. С. 296.

15. **Нестерова Л.А., Манухин Б.Н.** Влияние активации и ингибирования серотониновых рецепторов на кинетику связывания специфических [3H]-лигандов адренергическими и мускариновыми рецепторами в мембранах клеток коры головного мозга крыс // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том. 1-2 . Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – Пушкино: 2015, С. 121-123. (Международная конференция 25–28 мая 2015 г.).

16. **Нестерова Л.А., Манухин Б.Н.** Модулирующее влияние изопропилнорадреналина и пропранолола на активность альфа-адренорецепторов мембран коры головного мозга крыс // V съезд биофизиков России. Материалы докладов. 4-10 октября 2015 г. Ростов-на-Дону. Издательство Южного Федерального университета. 2015, Т. 1, С. 366.

17. **Нестерова Л.А., Манухин Б.Н.** Модуляция активности  $\alpha 1$ -адренорецепторов мембран коры головного мозга крыс агонистом и антагонистом бета-адренорецепторов. // 9-й международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». 3–13 июня 2013 года. Судак (Крым, Украина). С. 241-242.

18. **Нестерова Л.А., Манухин Б.Н.** Модуляция активности альфа2-адренорецепторов мембран коры головного мозга крыс агонистами и антагонистами серотониновых рецепторов // IV съезд физиологов СНГ. Сочи-Дагомыс, 8-12 октября 2014 г., С. 84.

19. **Нестерова Л.А., Манухин Б.Н.** Модуляция активности альфа-адренорецепторов мембран коры головного мозга крыс агонистом и антагонистом бета-адренорецепторов // "Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга". Всероссийская конференция с международным участием. Санкт-Петербург, 24-26 июня 2014 г. Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2014, С. 101.

20. **Фёдорова Е.С., Суханова И.Ф., Соломонова В.Г., Авдонин П.В.** Роль двупоровых кальциевых каналов эндолизосомальных везикул в поддержании спонтанного ритма сокращения сердца. // Сборник статей международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пушкино 2013, Т.1, С. 237-240.

21. **Хабарова М.Ю., Воронежская Е.Е., Мельникова В.И., Харченко О.А.,** Ивашкин Е.Г. Нейромедиаторное программирование «пихотипа» на стадии яйцеклетки? Простые модели свидетельствуют. // В сборнике: Когнитивная наука в Москве. Под редакцией Е.В. Печенковой, М.В. Фаликман. 2015. БукиВеди. С. 456-462.

Отчет утвержден решением Ученого совета ИБР РАН «27» декабря 2016 г., Протокол № 14.