

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

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

УДК 612.017.1612.8.01

№ ИНГЗ 0108-2016-0003

№ НИОКТР АААА-А16-116120810088-2



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ТЕМА 2. МЕДИАТОРНЫЕ, МЕМБРАННЫЕ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ
ФАКТОРЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ СИСТЕМ РЕГУЛЯЦИИ И РЕАЛИЗАЦИИ АДАПТАЦИОННЫХ
ПРОГРАММ РАЗВИТИЯ И ПОВЕДЕНИЯ

(заключительный отчет)

Руководитель темы д.б.н., зав. лаб.

Н.П. Шарова

подпись, дата

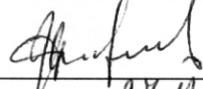
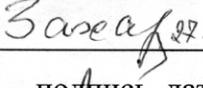
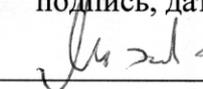
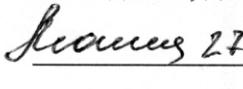
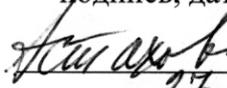
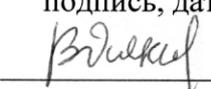
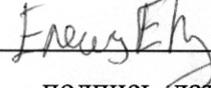
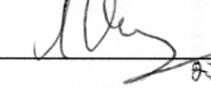
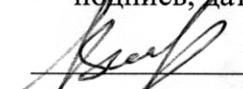
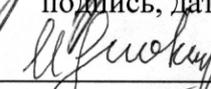
Руководитель темы д.б.н., зав. лаб.

И.С. Захаров

подпись, дата

Москва, 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, д-р биологических наук	 _____ подпись, дата	Н.П. Шарова (раздел 1) 27.12.2017
Руководитель, д-р биологических наук	 _____ подпись, дата	И.С. Захаров (раздел 4) 27.12.2017
Исполнители:		
Доктор биол. наук, профессор	 _____ подпись, дата	Л.А. Захарова (раздел 1) 27.12.17
Доктор биол. наук, профессор	 _____ подпись, дата	В.С. Михайлов (раздел 2) 27.12.2017
Кандидат биол. наук	 _____ подпись, дата	О.В. Люпина (раздел 2) 27.12.17
Кандидат биол. наук	 _____ подпись, дата	Т.М. Астахова (раздел 3) 27.12.17
Доктор биол. наук	 _____ подпись, дата	В.Е. Дьяконова (раздел 4) 27.12.2017
Кандидат биол. наук	 _____ подпись, дата	Т.А. Коршунова (раздел 4) 27.12.2017
Доктор биол. наук	 _____ подпись, дата	Е.Е. Воронежская (раздел 5) 27.12.2017
Доктор биол. наук	 _____ подпись, дата	Л.П. Незлин (раздел 5) 27.12.2017
Доктор биол. наук, профессор	 _____ подпись, дата	П.В. Авдонин (раздел 6) 27.12.2017
Доктор биол. наук	 _____ подпись, дата	Ю.Б. Шмуклер (раздел 7) 27.12.2017
Кандидат биол. наук	 _____ подпись, дата	И.Г. Макаренко (раздел 8) 27.12.2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат	4
Определения, обозначения и сокращения	5
Введение	6
Раздел 1. Регуляция развития иммунной и нейроэндокринной систем в норме и при физиологических нарушениях	13
Раздел 2. Молекулярные механизмы регуляции клеточных процессов с участием протеасом и шаперонов при инфицировании беспозвоночных	15
Раздел 3. Протеасомы в развитии злокачественных опухолей. Поиск приложения к медицинской практике	16
Раздел 4. Механизмы поведенческого выбора и развития поведенческих состояний	17
Раздел 5. Нейрогуморальная регуляция развития и формирования адаптивных программ на примере личинок водных беспозвоночных и низших позвоночных	27
Раздел 6. Механизмы регуляции обмена ионов кальция в гладкомышечных и эндотелиальных клетках кровеносных сосудов	39
Раздел 7. Многообразие медиаторных систем в эмбриогенезе	45
Раздел 8. Развитие внутримозговых связей у крыс	51
Заключение	56
Публикации по теме	58

Реферат

Отчет 63 с., 8 ч, 22 рис. 1 табл., 53 источника (16 ссылки, 37 публикаций по теме)

Ключевые слова: онтогенез, молекулярные механизмы развития, иммунная система, центральная нервная система, репродуктивная система, протеасомы, онкологические заболевания, онкогенез, липополисахарид, тимус, головной мозг, 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, губки, амперометрия

Получен результат, который, вопреки устоявшимся представлениям об иммунных протеасомах, указывает на их наработку и функционирование в нейронах, но не клетках глии головного мозга млекопитающих. Выдвинута гипотеза о том, что иммунные протеасомы продуцируют пептиды, участвующие во взаимодействии между нейронами.

Установлено, что клетки разных цветовых морф холодноводных морских губок из класса Demospongiae – *Halichondriapanicea* (Pallas, 1766) отличаются по содержанию эписимбионтов бактерий рода *Pseudoalteromonas*. Эписимбионты бактерий рода *Pseudoalteromonas* оказывают влияние на убиквитин-протеасомную систему клеток холодноводных морских губок и обеспечивают их адаптивную пластичность.

Обнаружено, что количество иммунных субъединиц и химотрипсинподобная активность протеасом могут служить потенциальными маркерами, прогнозирующими эффективность неоадьювантной химиолучевой терапии при раке прямой кишки.

Установлено, что в развивающемся тимусе плодов крыс эффект серотонина регулируется рецепторами Htr1a типа. Их активация приводит к экспрессии определенных цитокинов и дифференцировке предшественников Т-лимфоцитов.

Показано, что нарушения полового созревания у самок крыс могут быть связаны с повышенным содержанием провоспалительных цитокинов, вызванным пренатальным введением ЛПС, и как следствие, повышенным содержанием половых стероидов в препубертатный период. Проведение коррекции антагонистами половых стероидов возникших в эти периоды расстройств может обеспечить нормальное развитие репродуктивной системы самок.

На модели выбора направления движения моллюска - большого прудовика - показано, что предварительная двигательная нагрузка облегчает и ускоряет выбор принятия решения, при этом световое прекондиционирование не влияет на скорость принятия решения.

Получены 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.

Сенсорное обеспечение поведения имеет существенное значение как в механизмах запуска адекватных поведенческих программ, так и в формировании функционального состояния нервной системы. В рамках настоящего раздела программы проведено исследование механизмов анализа слуховой информации у комаров, для которых этот канал является ключевым для запуска и реализации сложного комплекса полового поведения и показаны уникальные особенности работы сенсорных клеток.

Исследовались особенности экспрессии нейроспецифических генов и изменения активности протеасомного аппарата при изменении функционального состояния, в частности при влиянии микрогравитации в ходе длительного космического полета, в нейронах и в сенсорных клетках органа равновесия, а также в онтогенезе поведения модельных животных, для которых с хорошо описана нейробиология.

Сравнительное исследование особенностей онтогенеза моллюсков, обеспечивающих новые адаптации вида, дает существенную информацию о эволюционных механизмах изменения их разнообразия, и они составляют значительную часть экспериментальной работы, связанной с выполнением данного раздела программы.

Описано расположение ранних нейронов, являющихся пионерными, при формировании нервной системы у представителей моллюсков и аннелид. Выявлено, что в подавляющем большинстве случаев пионерные нейроны являются сенсорными клетками. Обнаружена локальная сеть серотонинсодержащих нервных элементов в женской части репродуктивной системы пресноводного моллюска. Отработана методика повышения уровня моноаминов в развивающихся нейронах, позволяющая проводить их визуализацию на самых ранних этапах дифференцировки и определять функционирование систем синтеза и захвата моноаминов у личинок морских ежей. Выявлено парадоксальное действие серотонина на ресничную локомоцию архианнелид.

Показано, что двупоровые кальциевые каналы (TPC) в эндотелиальных клетках активируются физиологически релевантными концентрациями перекиси водорода, и одной из мишеней H₂O₂ в эндотелиальных клетках являются именно кальциевые каналы TPC.

Получены и проанализированы данные о состоянии и уровне активности в тканях яичника 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.

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:

ЛПС – липополисахарид

ЦНС – центральная нервная система

ИЛ – интерлейкин

АДФ-рибоза – циклическая аденозин дифосфат рибоза

АП II - 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 – парахлорфенилалани, ингибитор фермента синтеза серотонина триптофангидоксилазы
SERT – транспортер серотонина
TPC - двупоровые кальциевые каналы (two-pore calcium channels)
VMAT – везикулярный транспортер моноаминов

Введение

Исследование механизмов развития и функционирования иммунной, нервной и эндокринной систем имеет большое значение не только для фундаментальной науки, но и для понимания причин возникновения различных патологий и, как следствие, для применения полученных знаний в практической медицине. Для разработки данной проблемы актуально изучение функционирования убиквитин-протеасомной системы деградации белков, регулирующей клеточные процессы. Имеющиеся в мировой литературе сведения об особенностях функционирования протеасом в раннем развитии органов иммунной системы и ЦНС млекопитающих являются разработками авторов темы. Кроме того, были обнаружены изменения в функционировании протеасом, связанные со злокачественной трансформацией клеток экспериментальных животных и человека. Дальнейшие исследования в данной области являются крайне важными для создания новых противоопухолевых лекарств и инновационных способов диагностики онкологических заболеваний.

Еще одним направлением в рамках темы является актуальное в последнее время исследование механизмов взаимодействия нейроэндокринной и иммунной систем в перинатальном онтогенезе. Цитокины, синтезируемые после перинатальной стимуляции иммунной системы бактериальной или вирусной инфекцией, программируют развитие этих систем, что увеличивает риск возникновения неврологических и психических заболеваний у потомков в постнатальный период. Индуцируя иммунный ответ у матери, ЛПС способен изменять уровень цитокинов в различных органах плода.

В русле этого направления изучается регуляторное влияние моноаминов на функционирование иммунной системы. Нет данных о наличии рецепторов к серотонину на клетках иммунокомпетентных органов, в частности тимуса плодов. Данные о морфогенетическом эффекте дофамина на иммунную систему также неизвестны. Все это делает данную проблему актуальной и крайне перспективной. Планируемые исследования позволят расширить наши представления о механизмах регуляции процессов становления и функционирования нейроэндокринной и иммунной систем на протяжении всей жизни, включая пренатальное развитие.

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 рецепторы к сигнальным молекулам, лиганд-рецепторные взаимодействия, развитие внутримозговых связей и организация поведенческих актов.

Одно из основных направлений исследований в настоящем разделе программы связано с определением роли химических факторов в механизмах организации поведения. Мы исходим из того положения, что моторное поведение дискретно – оно представлено некоторым репертуаром поведенческих актов, и каждый такой акт продуцируется определенным паттерн-генерирующим ансамблем нейронов.

При этом, экспериментально установлено, в том числе и в наших экспериментах, что функциональное состояние нервной системы определяется нейрохимическим 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.

Сенсорное обеспечение поведения имеет существенное значение как в механизмах запуска адекватных поведенческих программ, так и в формировании функционального состояния нервной системы. В силу этого, в рамках настоящего раздела программы проводится исследование механизмов анализа слуховой информации у комаров, для которых этот канал является ключевым для запуска и реализации сложного комплекса полового поведения.

Слуховые органы комаров - Джонстоновы органы (ДО) — считаются наиболее высокочувствительными и сложными по устройству среди насекомых. Один из двух парных ДО самца комаров содержит порядка 15 тысяч слуховых нейронов. По всей вероятности, впечатляющие возможности слуха комаров были отточены в ходе полового отбора, поскольку именно слух играет у них ключевую роль во взаимодействии самцов и самок и определяет выбор партнера в момент встречи. Наши предыдущие исследования поведения комаров показали, что комары способны различать частоты звука. В то же время, исследования механизмов работы ДО долгое время были ограничены методикой регистрации активности слуховых нейронов, которая позволяла записывать только суммарные ответы на звук от большого числа нейронов или от ДО целиком.

В ходе исследования локомоторных генераторов у модельного объекта – прудовика – в наших предыдущих экспериментах была разработана новая экспериментальная модель, позволившая проверить предположение, что предшествующая двигательная нагрузка может на длительное время менять функциональное состояние животного, в том числе ускорять принятие решения. Развитие этой модели стало главной задачей экспериментов 2016-17 годов. 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.

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.). Следующий этап изменения внутриклеточных механизмов функционирования клеток нервной системы связан с работой протеасомного аппарата. У нас имеются некоторые данные относительно изменений в этой сфере внутриклеточных регуляторов на наших объектах в процессе формирования поведения в онтогенезе, но они пока очень недостаточны. И в целом, необходимо отметить, что механизм молекулярной машины пластичности нервной системы еще недостаточно изучен. Этим обусловлена актуальность исследования роли экспрессии нейроспецифических генов и изменения активности протеасомного аппарата при изменении функционального состояния и в онтогенезе поведения модельных животных, для которых с хорошо описана нейробиология.

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 отчетный период были продолжены исследования в этой области.

Сравнительное исследование особенностей онтогенеза моллюсков, обеспечивающих новые адаптации вида, дает существенную информацию о эволюционных механизмах изменения их разнообразия, и они составляют значительную часть экспериментальной работы, связанной с выполнением данного раздела программы.

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

Закономерности и особенности развития нервной системы широко исследуются биологами и медиками различных специальностей. Одной из перспективных моделей в этой области, позволяющей выявить фундаментальные механизмы нейрогенеза и аксональной навигации, являются беспозвоночные животные. Самые ранние стадии развития, именно момент дифференцировки первых нервных клеток, является чрезвычайно важным. На модели развития беспозвоночных и при формировании периферической нервной системы позвоночных было показано, что аксоны уже дифференцировавшихся нервных клеток могут являться направляющими путями для формирующихся впоследствии нейрональных кластеров и связывающих их путей. Однако природа самых ранних клеток до настоящего времени до конца не выяснена, неизвестно, зависит ли их дифференцировка от внешних сигналов окружения, содержания моноаминов в организме матери, каким именно образом эти химические сигналы влияют на ход дифференцировки. Метод иммунохимического маркирования нейрональных элементов с использованием специфических маркеров позволяет выявить нервные клетки в момент начала синтеза в них нейромедиатора. Совместное выявление ресничных структур, мышечных элементов, филаментов и других клеточных компонентов, дает информацию о природе самых ранних дифференцировавшихся клеток. Детальное маркирование формирования последующих нервных элементов и структур позволяет установить роль ранних периферических нейронов в инициации нейрогенеза и навигации отростков в процессе формирования нервной системы.

В 2017 г. были продолжены исследования регуляции и физиологических функций двупоровых кальциевых каналов (two-pore calcium channels – TPC). Название двупоровые каналы обусловлено тем, что функциональный кальциевый канал образован двумя субъединицами, в каждой из которых есть две формирующие пору петли. Каналы TPC локализованы в лизосомах и лизосомоподобных везикулах и активируются под действием вторичного мессенджера NAADP (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) Ранее мы показали, что каналы TPC в эндотелиальных клетках активируются физиологически релевантными концентрациями перекиси водорода. Как сейчас установлено перекись водорода образуется не только как фактор, направленный на уничтожение инородных клеток, но выполняет также функцию внутриклеточного вторичного мессенджера.

Серотонин и дофамин, наряду с другими классическими нейротрансмиттерами, являются универсальными сигнальными веществами, контролирующими разнообразные процессы развития, такие как созревание половых продуктов, оплодотворение, контроль клеточного цикла, межбластомерные взаимодействия, ресничная моторика, морфогенетические движения клеток и т.д. Известно пять типов мембранных рецепторов дофамина, сопряженных с разными системами вторичных мессенджеров. В системе везикулярного транспорта синтезированный нейроном дофамин локализуется в синаптических везикулах, после он поступает в синаптическую щель к системе обратного

захвата. На разных биологических объектах выявлены свидетельства присутствия и функционирования дофамина на ранних стадиях эмбриогенеза, но молекулярно-генетические исследования элементов моноаминергических систем фрагментарны. Целью работы было исследование экспрессии компонентов катехоламинергических систем в раннем развитии *Xenopus tropicalis*.

Участие этих веществ в регуляции процессов роста и созревания женских половых клеток показано для широкого ряда животных, в том числе млекопитающих, и, по всей видимости, является одной из его консервативных функций. В яичнике млекопитающих серотонин определяется в физиологических концентрациях, в частности, в ооцитах, клетках кумулюса и в фолликулярной жидкости. На различных моделях показано, что серотонин обладает стимулирующим действием на функцию фолликулярных клеток. Потенциальными источниками экзогенного по отношению к овариальному фолликулу серотонина являются тромбоциты кровяного русла, тучные клетки, локализующиеся в строме яичника, а также немногочисленные нервные волокна, сопровождающие крупные медуллярные сосуды.

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.

Раздел 1. Регуляция развития иммунной и нейроэндокринной систем в норме и при физиологических нарушениях

Получен результат, который, вопреки устоявшимся представлениям об иммунных протеасомах, указывает на их наработку и функционирование в нейронах, но не клетках глии головного мозга млекопитающих. Выдвинута гипотеза о том, что иммунные протеасомы продуцируют пептиды, участвующие во взаимодействии между нейронами. Эта гипотеза объясняет повышенную устойчивость крыс линии Август к острому эмоциональному стрессу по сравнению с контрольными крысами Вистар поддержанием в нейронах увеличенного уровня иммунных протеасом. Производимые ими пептиды, по-видимому, обеспечивают устойчивые межнейронные взаимодействия и адаптацию головного мозга к неблагоприятным условиям.

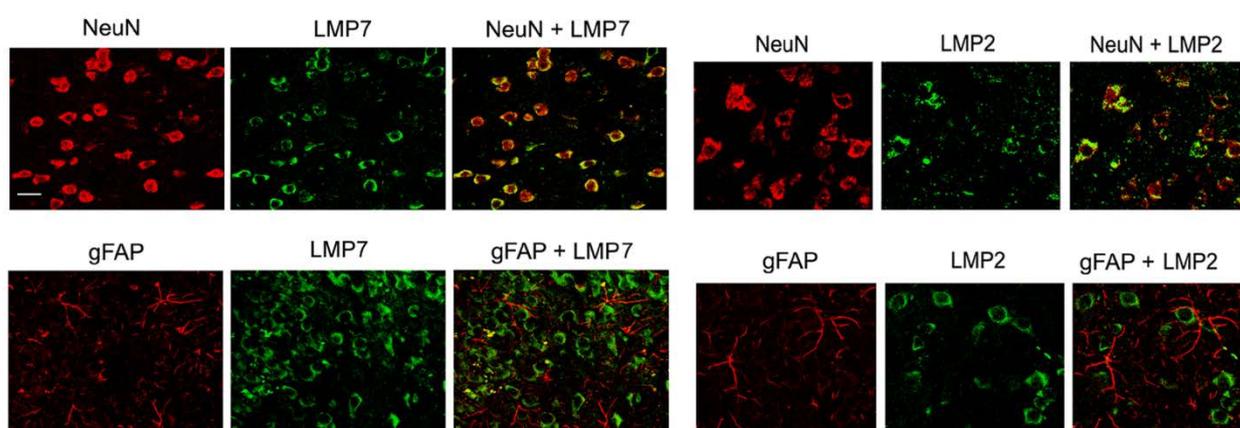


Рис.1. Иммунные субъединицы LMP7 и LMP2 протеасом локализованы в нейронах (маркер NeuN), но не в клетках глии (маркер gFAP) головного мозга крыс линии Август. Шкала: 10 мкм.

Исследованы механизмы регуляции развития иммунокомпетентного органа тимуса серотонином. Показано, что в развивающемся тимусе крыс антагонист 5-HT_{1a} рецепторов серотонина ускоряет ранние этапы дифференцировки предшественников Т-лимфоцитов. Численность незрелой субпопуляции Т-клеток снижается почти в 2 раза, тогда как численность более зрелых Т-клеток (двойных позитивов) увеличивается в 3 раза.

Экзогенный серотонин или агонист Htr1a рецепторов стимулировали секрецию интерлейкина (ИЛ)-10 клетками тимуса 18-дневных плодов и не влияли на секрецию других цитокинов. Селективный антагонист подавлял секрецию ИЛ-10 и интерферона-гамма.

Таким образом, в развивающемся тимусе плодов крыс эффект серотонина регулируется рецепторами Htr1a типа. Их активация приводит к экспрессии определенных цитокинов и дифференцировке предшественников Т-лимфоцитов.

Исследованы роль половых стероидов в развитии нарушений полового созревания у самок крыс, подвергавшихся пренатальному воздействию бактериального эндотоксина

липополисахарида (ЛПС) и отдаленные последствия воздействия антагонистов половых стероидов. Показано, что введение ЛПС самкам крыс на ранних стадиях беременности (Э12) приводит к нарушениям структуры и функций гонад у половозрелого потомства самок. У них замедляется начало открытия полового отверстия и первый эструс. Введение антагониста эстрадиола (фульвестранта) приводит к ещё большей задержке, а введение антагониста тестостерона (флютамида) приводит к их нормализации. Кроме того, у половозрелого потомства самок наблюдается снижение числа первичных и вторичных фолликулов, число фолликулов в стадии атрезии увеличивается, желтые тела не обнаруживаются. После введения антагонистов половых стероидов уровень атрезии снижается, а численность фолликулов восстанавливается. Восстановление структуры яичников приводит к восстановлению концентрации половых стероидов в крови.

Итак, наблюдаемые нарушения полового созревания у самок крыс могут быть связаны с повышенным содержанием провоспалительных цитокинов, вызванным пренатальным введением ЛПС, и как следствие, повышенным содержанием половых стероидов в препубертатный период. Проведение коррекции антагонистами половых стероидов возникших в эти периоды расстройств может обеспечить нормальное развитие репродуктивной системы самок.

Раздел 2. Молекулярные механизмы регуляции клеточных процессов с участием протеасом и шаперонов при инфицировании беспозвоночных

Пластичность как защитное и адаптивное свойство губок, возможно, связана с особенностями функционирования УПС в клетках, а также наличием симбиотических микроорганизмов. Установлено, что клетки разных цветовых морф холодноводных морских губок из класса Demospongiae – *Halichondriapanicea* (Pallas, 1766) отличаются по содержанию эпибионтов бактерий рода *Pseudoalteromonas*: более 50% (тип 1) и менее 10% (тип 2). В клетках, имеющих повышенный уровень эпибионтов бактерий рода *Pseudoalteromonas* (тип 1), повышена экспрессия белков Hsp70 и снижен уровень каталитической бета 5 субъединицы протеасом, сопровождающийся изменением активности протеасом (Рис. 1). Вероятно, эпибионты бактерий рода *Pseudoalteromonas* оказывают влияние на убиквитин-протеасомную систему клеток холодноводных морских губок и обеспечивают их адаптивную пластичность.

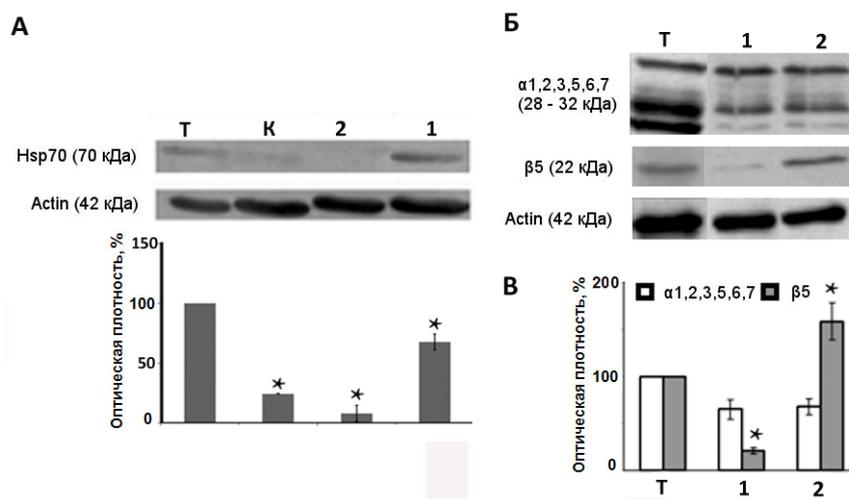


Рис. 2. Показатели адаптивной пластичности клеток холодноводной морской губки *H. panicea*. **А:** Вестерн-блот и относительное содержание белков теплового шока Hsp70 по отношению к актину. **Б:** Вестерн-блот субъединиц протеасом α -типа (1,2,3,5,6,7) и β 5. **В:** Относительное содержание субъединиц протеасом α -типа (1,2,3,5,6,7) и β 5 по отношению к актину. Т- ткань, К – клетки (смешанные типы клеток 1 и 2), 1 (тип 1 клеток), 2 (тип 2 клеток), * - $P < 0.01$, по отношению к ткани.

Раздел 3. Протеасомы в развитии злокачественных опухолей. Поиск приложения к медицинской практике

У пациентов в отсутствие лечения химотрипсинподобная активность протеасом в ткани рака прямой кишки в три раза превышает таковую в условно нормальной ткани, что обусловлено увеличением экспрессии иммунных протеасом и тотального пула протеасом. У пациентов после неoadъювантной химиолучевой терапии экспрессия тотального пула протеасом и иммунных протеасом в опухоли, а также отношение этих показателей в опухоли и условно нормальной ткани уменьшены в 1,4-3,3 раза по сравнению с нелечеными пациентами. Эти изменения сопровождаются значительным снижением активности протеасом в опухоли (в 4,5 раза) и уменьшением отношения активности протеасом в опухоли и условно нормальной ткани (в 3,7 раза). Количество иммунных субъединиц и химотрипсинподобная активность протеасом могут служить потенциальными маркерами, прогнозирующими эффективность неoadъювантной химиолучевой терапии при раке прямой кишки.

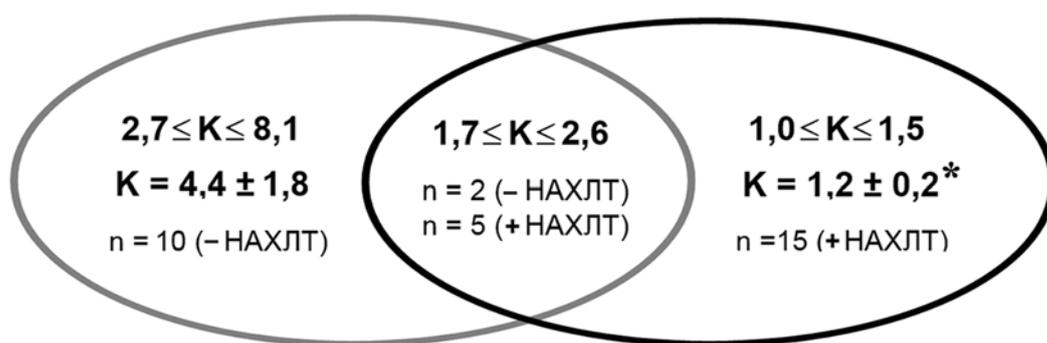


Рис. 3. Значения отношения ХТП активности протеасом в экстрактах ткани рака прямой кишки и условно нормальной ткани у нелеченых пациентов и у пациентов после лечения НАХЛТ. К – показатель отношения ХТП активности протеасом в экстрактах опухоли и условно нормальной ткани. Приведено стандартное отклонение от среднего. *Достоверное отличие от соответствующего показателя у нелеченых пациентов при $p < 0,05$.

Раздел 4. Механизмы поведенческого выбора и развития поведенческих состояний

4.1 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 рецепторы к сигнальным молекулам, лиганд-рецепторные взаимодействия, развитие внутримозговых связей и организация поведенческих актов.

Одно из основных направлений исследований в настоящем разделе программы связано с определением роли химических факторов в механизмах организации поведения. Мы исходим из того положения, что моторное поведение дискретно – оно представлено некоторым репертуаром поведенческих актов, и каждый такой акт продуцируется определенным паттерн-генерирующим ансамблем нейронов.

При этом, экспериментально установлено, в том числе и в наших экспериментах, что функциональное состояние нервной системы определяется нейрхимическим 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.

Сенсорное обеспечение поведения имеет существенное значение как в механизмах запуска адекватных поведенческих программ, так и в формировании функционального состояния нервной системы. В силу этого, в рамках настоящего раздела программы проводится исследование механизмов анализа слуховой информации у комаров, для которых этот канал является ключевым для запуска и реализации сложного комплекса полового поведения.

Слуховые органы комаров - Джонстоновы органы (ДО) — считаются наиболее высокочувствительными и сложными по устройству среди насекомых. Один из двух парных ДО

самца комаров содержит порядка 15 тысяч слуховых нейронов. По всей вероятности, впечатляющие возможности слуха комаров были отточены в ходе полового отбора, поскольку именно слух играет у них ключевую роль во взаимодействии самцов и самок и определяет выбор партнера в момент встречи. Наши предыдущие исследования поведения комаров показали, что комары способны различать частоты звука. В то же время, исследования механизмов работы ДО долгое время были ограничены методикой регистрации активности слуховых нейронов, которая позволяла записывать только суммарные ответы на звук от большого числа нейронов или от ДО целиком.

В ходе исследования локомоторных генераторов у модельного объекта – прудовика – в наших предыдущих экспериментах была разработана новая экспериментальная модель, позволившая проверить предположение, что предшествующая двигательная нагрузка может на длительное время менять функциональное состояние животного, в том числе ускорять принятие решения. Развитие этой модели стало главной задачей экспериментов 2016-17 годов. 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.

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.). Следующий этап изменения внутриклеточных механизмов функционирования клеток нервной системы связан с работой протеасомного аппарата. У нас имеются некоторые данные относительно изменений в этой сфере внутриклеточных регуляторов на наших объектах в процессе формирования поведения в онтогенезе, но они пока очень недостаточны. И в целом, необходимо отметить, что механизм молекулярной машины пластичности нервной системы еще недостаточно изучен. Этим обусловлена актуальность исследования роли экспрессии нейроспецифических генов и изменения активности протеасомного аппарата при изменении функционального состояния и в онтогенезе поведения модельных животных, для которых с хорошо описана нейробиология.

Показано, что влияние микрогравитации в ходе длительного космического полета на поведение виноградной улитки связано с изменением уровня экспрессии нейрон-специфических

генов, кодирующих секретизируемые пептиды в сенсорных клетках органа равновесия (Асеев Н.А., и др. 2013). В отчетный период были продолжены исследования в этой области.

Сравнительное исследование особенностей онтогенеза моллюсков, обеспечивающих новые адаптации вида, дает существенную информацию о эволюционных механизмах изменения их разнообразия, и они составляют значительную часть экспериментальной работы, связанной с выполнением данного раздела программы.

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

4.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Активация гиперлокомоции. На прудовике применена разработанная в коллективе методика активации циклической мышечной локомоции при формировании поведенческого состояния активного поиска перемещением моллюска из воды аквариума на поверхность, покрытую тонким слоем.

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.

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.

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

проводилась стандартными методами нейроэтологии с использованием внутриклеточных микроэлектродов.

В экспериментах на сенсорной системе комаров мы применили разработанный нами уникальный метод акустической стимуляции с положительной обратной связью, который позволил зарегистрировать ответы отдельных сенсорных нейронов.

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.

Для анализа экспрессии генов нейронных сетей, управляющих моторными программами поведенческих актов, использовали **метод иммуногистохимического картирования с использованием конфокального микроскопа.** В работе были использованы поликлональные антитела кролика к иммунным субъединицам протеасом $\beta 1i$ (LMP2) и $\beta 5i$ (LMP7) (Affiniti, Великобритания), набор ECL, нитроцеллюлозные мембраны Hybond-ECL и антитела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой (Amersham Biosciences, Великобритания), PBS – 0,1M Na-фосфатный буфер с добавлением 0,9% NaCl, pH 7,2-7,4 (Sigma).

Используя **метод ПЦР-РВ** (полимеразная цепная реакция в реальном времени) создавали систему определения профиля экспрессии генов медиаторных путей нейронов, **методом синтеза библиотек кДНК** определена генная 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.

В сравнительных исследованиях особенностей онтогенеза моллюсков различных видов мы используем: классические морфологические и гистологические методы, включая сканирующую электронную и световую микроскопию. Молекулярно-генетические методы - секвенирование отдельных генов и проведение молекулярно-филогенетического анализа. А также исследование онтогенетических циклов моллюсков

Объекты.

Модельный объект – пресноводный легочный моллюск большого прудовика - *Lymnaea 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 пульмонат – два вида виноградных улиток *Helix lucorum* и *Helix aspersa*.

Они обладают важными достоинствами:

- (1) доступностью - круглогодичное культивирование обоих видов;
- (2) высокой степенью изученности (включая собственный опыт коллектива);

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что предшествующая моторная нагрузка способна влиять на скорость принятия решения при выборе направления движения у большого прудовика. Известно, что моторная нагрузка способна временно изменять состояние (потенциал, активность и др.) как отдельных нейронов, так и все нейрональной сети. Однако остается неясна динамика таких изменений, а так же какие изменения на уровне нейрона и всей сети нейронов происходят при этом.

Исследование проводилось на изолированном педальном ганглий большого прудовика для того, чтобы исключить влияние от нейронов из других ганглиев. В первой серии экспериментов сравнивались частоты потенциалов действия (ПД) нейронов педального кластера у группы животных, регистрируемых сразу после моторной нагрузки, и контрольной группы животных, которые моторной нагрузке не подвергались. Были выявлены различия между опытной и контрольной группами животных на уровне спайковой активности, что подтверждает предположение, что память о функциональном состоянии животного поддерживается в существенной степени за счет перестроек в педальном ганглий. У опытной группы активность в среднем была выше ($49,5 \pm 8,7$ ПД/мин против $36,1 \pm 7,2$ ПД/мин, $p < 0,05$, $N = 6$, критерий знаковых рангов Уилкоксона). Во второй серии сравнивались частоты ПД нейронов педального кластера у группы животных, регистрируемых через два часа после моторной нагрузки, и контрольной группы животных. Были выявлены противоположные различия между контрольной и опытной группой животных: частота ПД у контрольной группы в этой серии оказалась выше ($19,2 \pm 3,9$ ПД/мин против $40,2 \pm 6,0$ ПД/мин, $p < 0,05$, $N = 9$, критерий знаковых рангов Уилкоксона). Этот результат показывает наличие тормозного механизма, понижающего частоты ПД нейронов педального кластера в педальном ганглий.

В ходе выполнения данного раздела программы исследований проводился более углубленный анализ этологических особенностей ранее предложенной нами модели активации исследовательского поведения и двигательной активности, способствующей принятию решений не только у людей и млекопитающих, но также и у моллюсков. В применяемой поведенческой парадигме улитки *Lymnaea stagnalis* были удалены из их естественной среды (воды) и помещены на сухую асимметрично освещенную арену, из которой они должны были решить, куда идти,

чтобы достичь водной среды. Одним из возможных объяснений наблюдаемых эффектов предшествующей двигательной активности было то, что это могло повлиять на память улитки о световых условиях, которые соответствовали ее предыдущей водной среде обитания. В настоящей работе мы получили экспериментальные результаты, которые позволяют отбросить эту гипотезу. Мы полагаем, что предшествующая интенсивная локомоция, вероятно, облегчает принятие решений путем повышения степени уверенности.

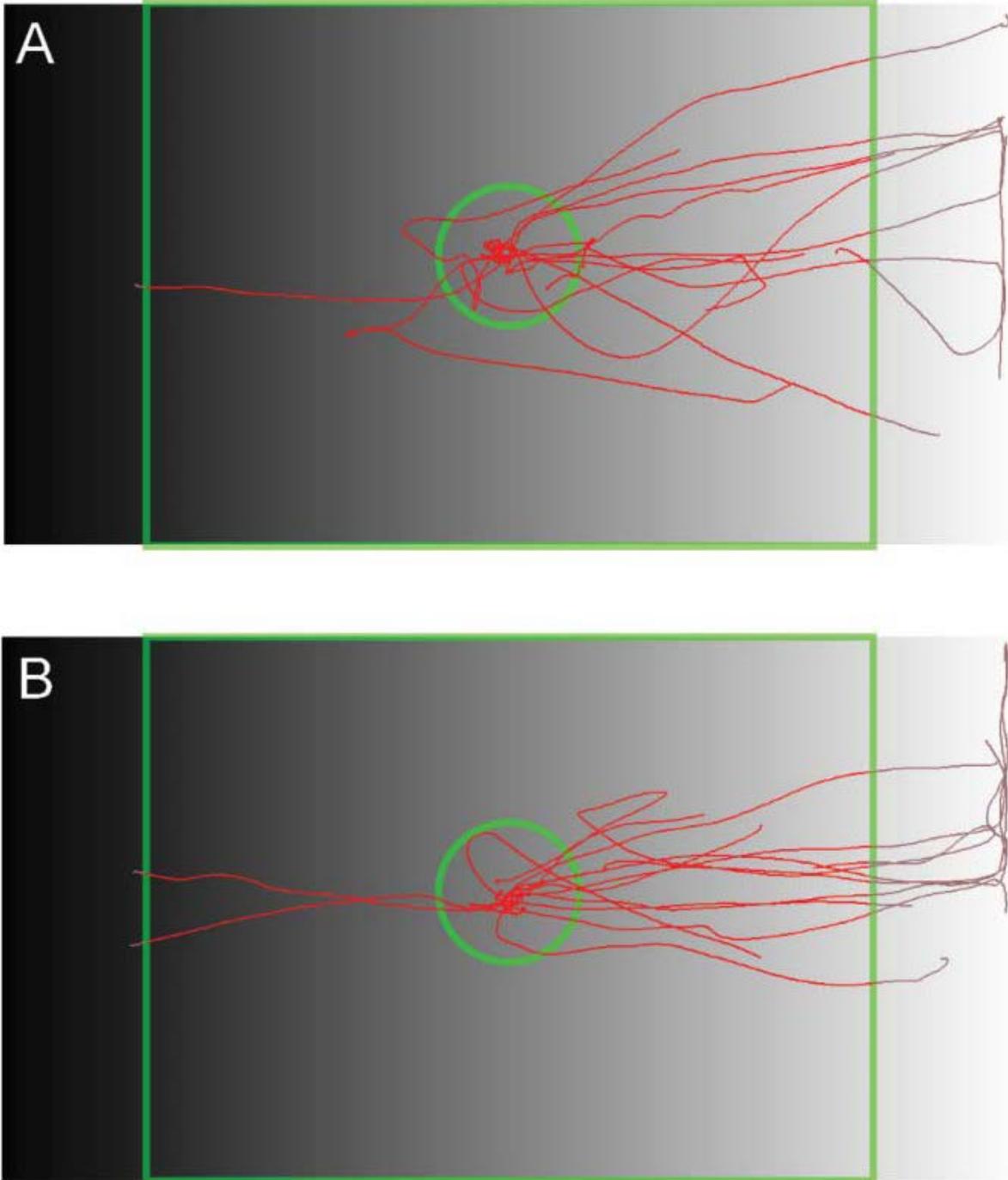


Рис. 4. Треки движения улиток, прекондиционированных к условиям темноты и освещенности.

А: Улики, адаптированные к темноте (прекондиционированные: до выноса на арену в воде контейнера была освещенность 8 lux.

В: Улики, адаптированные к свету (прекондиционированные: до выноса на арену в воде контейнера была освещенность 90 lux.

Мы содержали улиток в водных контейнерах в разных условиях освещения до проведения теста на сухой арене. Первый контейнер был освещен ярче (90 люкс), чем площадь около яркой стены экспериментальной арены (83 люкс), а вторая была освещена темнее (8 люкс), чем площадь около темной стены арены (12 люкс). Сначала мы протестировали эффект темновой преадаптации в течение 2 часов, что соответствует длительности нагрузки в предыдущей серии экспериментов. Затем было протестировано более длительное темновое-световое preconditionирование (24 часа). Мы не обнаружили существенных различий ни по одному из параметров поведения (выбор света или тени, время, проведенное в центральной зоне и на виртуальной арене, перемещение расстояния, скорость) между двумя группами.

Наш следующий вопрос будет заключаться в том, способствует ли двигательная нагрузка процессу принятия решений, повышая уверенности (confidence). Уверенность обычно рассматривается как сложный метакогнитивный процесс, основанный на статистических расчетах и выполняемый префронтальной корой у людей. Однако известно, что уверенность также зависит от общего поведенческого состояния организма, гомеостаза, эмоций. Мы предполагаем, что внутреннее регулирование уверенности при принятии решений является адаптивным даже для простых организмов, поскольку оно позволяет определенную гибкость в соотношении между скоростью и точностью принятия решений. В последнее время уверенность и лежащие в ее основе нейрофизиологические механизмы изучены у грызунов.

Выяснения нейрохимической и клеточной основы уверенности у беспозвоночных могло бы стать интересной задачей на будущее. *Lymnaea* является многообещающей моделью в этом отношении, так как является известным организмом в клеточной нейробиологии и позволяет проводить электрофизиологические и молекулярные исследования на одиночных нейронах.

В исследованиях слуховых органов комаров - Джонстоновых органов (ДО) мы применили разработанный нами уникальный метод акустической стимуляции с положительной обратной связью, который позволил зарегистрировать ответы отдельных сенсорных нейронов. Как оказалось, слуховые нейроны комаров действительно настроены на разные частоты в диапазоне 85-470 Гц, большинство настроено на 190-270 Гц и делятся на как минимум 8 обособленных групп. Неожиданно выяснилось, что аксоны слуховых нейронов передают в мозг не потенциалы действия (спайки), а усиленные аналоговые сигналы, воспроизводящие форму звуковых колебаний. При этом соседние нейроны сгруппированы в пары и триплеты с неслучайно подобранными

параметрами чувствительности. В целом наши результаты говорят о сложном частотном анализе звука в слуховой системе комаров, и в её работе можно проследить аналогию с обработкой зрительной информации в сетчатке.

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. В рамках нашего исследования существенный интерес представляет пространственное распределение изменений экспрессии. Для начала мы поставили задачу, оценить в каких ганглиях наблюдается наиболее заметная динамика экспрессии. Для исследований нами было взято по три парных ганглия – церебральный, pedalный и париетальный. Была изучена экспрессия в ЦНС в трех временных точках – через 1 час, 2 часа и 3 часа после начала моторной активности. По результатам ПЦР стало видно, что изменения экспрессии изучаемых генов происходят в основном в pedalном ганглии через 1 час.

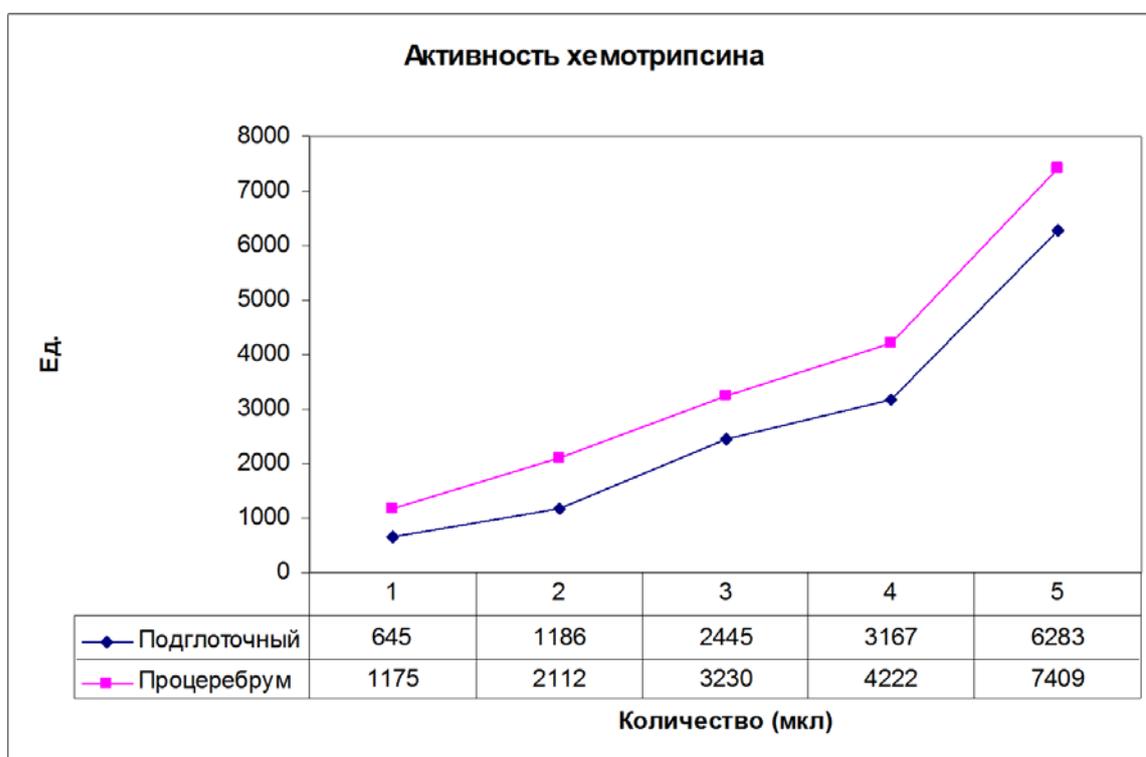
Прежде всего, следует отметить увеличение экспрессии гена, кодирующего FMRF амид – пептид, играющий важную роль в регуляции сердечной деятельности, дыхательной ритмики и двигательной активности. Кроме того, эти данные косвенно подтверждают нашу гипотезу о том, что FMRF амидергическая система принимает 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 ДОФА-декарбоксилаза. В отношении катехоламинергической системы полученные результаты в еще большей степени позволяют локализовать процессы, поскольку в ЦНС улитки есть очень ограниченное число тел катехоламинергических нейронов. В частности, можно с большой уверенностью предполагать, что изменение уровня экспрессии декарбоксилазы в pedalном ганглии обязано активности гигантского pedalного дофаминового нейрона, принимающего участие в контроле дыхательных движений улитки.

Результаты, указывающие на вовлеченность ДОФА-декарбоксилазы и FMRFамида в эффекты моторной нагрузки, свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения нейрохимических факторов, которые, наряду с серотонином, могут играть существенную роль в механизме оптимизации когнитивных функций.

На первом этапе исследования связи изменения поведенческих состояний экспериментальных животных с активностью молекулярных механизмов в нервных клетках, мы пытались установить возрастную зависимость количества протеасом в центральной нервной системе наземного моллюска *Helix aspersa* с возрастом ювенильных улиток. Нам известна динамика развития основных форм поведения улитки в разные периоды созревания животного. В

частности, активное пищевое поведение включается в срок после 7-10 первых дней после вылупления из яйца. Это связано с тем, что первые дни после вылупления улитки мало двигаются, находясь в гнезде и продолжают питаться яйцевыми запасами, ходя и обладают полностью сформированной буккальной системой.

Для решения этой задачи была проведена иммуногистохимия на изолированной ЦНС ювенильных улиток разного возраста: 2, 4, 6 и 8 недель и взрослых (зрелые особи – возраст от 6 месяцев до года). Иммунофлуоресценция антител к альфа субъединице протеасом наблюдалась во всех исследованных возрастных группах, но видимо в разной степени в разных областях нервной системы. Наибольшая иммунофлуоресценция антител к альфа субъединице протеасом наблюдалась у улиток двух – четырех недель возрастом в процеребруме и в подглоточном комплексе ганглиев.



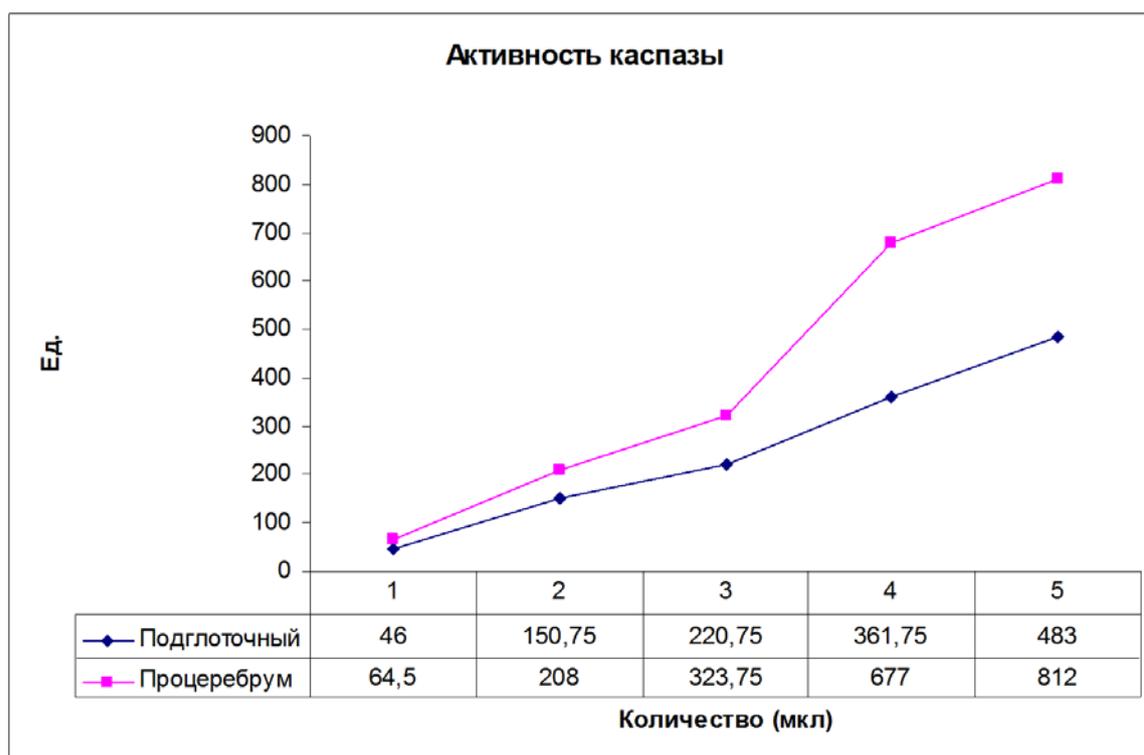


Рис.5 Активность протеасом в ганглиях улитки

В отчетный период были продолжены исследования в этой области влияния микрогравитации в ходе длительного космического полета на поведение виноградной улитки связано и связи этих влияний с изменением уровня экспрессии нейрон-специфических генов, кодирующих секреторируемые пептиды в сенсорных клетках органа равновесия.

В отношении эффектов поведенческих состояний, вызванных стрессом, сформулирована и опубликована оригинальная гипотеза, в соответствии с которой повышение пластичности генома мозга в ответ на стресс или новизну необходимо для активации когнитивных функций и повышения пластичности поведения в сложных обстоятельствах. А повышение пластичности генома на уровне организма может быть побочным эффектом этой когнитивной активации. Этот «побочный эффект» может сыграть важную роль в эволюции путем увеличения изменчивости наследственного генома. Последнее может привести к появлению новых признаков.

Исследования 2017 года были посвящены отбору модельных объектов, удобных для экспериментального анализа клеточных механизмов перестроек поведения и сравнительных онтогенетических исследований. Получены важные результаты по эволюционной истории морских беспозвоночных животных. Выявлены общие закономерности, объединяющие онтогенетическое развитие и биологическое разнообразие организмов. (Коршунова)

Раздел 5. Нейрогуморальная регуляция развития и формирования адаптивных программ на примере личинок водных беспозвоночных и низших позвоночных

5.1 ВВЕДЕНИЕ

Закономерности и особенности развития нервной системы широко исследуются биологами и медиками различных специальностей. Одной из перспективных моделей в этой области, позволяющей выявить фундаментальные механизмы нейрогенеза и аксональной навигации, являются беспозвоночные животные. Самые ранние стадии развития, именно момент дифференцировки первых нервных клеток, является чрезвычайно важным. На модели развития беспозвоночных и при формировании периферической нервной системы позвоночных было показано, что аксоны уже дифференцировавшихся нервных клеток могут являться направляющими путями для формирующихся впоследствии нейрональных кластеров и связывающих их путей. Однако природа самых ранних клеток до настоящего времени до конца не выяснена, неизвестно, зависит ли их дифференцировка от внешних сигналов окружения, содержания моноаминов в организме матери, каким именно образом эти химические сигналы влияют на ход дифференцировки. Метод иммунохимического маркирования нейрональных элементов с использованием специфических маркеров позволяет выявить нервные клетки в момент начала синтеза в них нейромедиатора. Совместное выявление ресничных структур, мышечных элементов, филаментов и других клеточных компонентов, дает информацию о природе самых ранних дифференцировавшихся клеток. Детальное маркирование формирования последующих нервных элементов и структур позволяет установить роль ранних периферических нейронов в инициации нейрогенеза и навигации отростков в процессе формирования нервной системы.

подавляющее большинство водных беспозвоночных животных имеет бифазный пелаго-бентический жизненный цикл, в котором дефинитивной молоподвижной стадии предшествует свободно плавающая или инкапсулированная личинка. Личинки предназначены для расселения и обычно имеют короткую по сравнению с имагинальной стадией продолжительность жизни и упрощенное строение. Простота организации делает личинок удобным объектом для сравнительно-морфологических и филогенетических исследований, при этом их нервные системы, состоящие иногда из нескольких десятков клеток, позволяют изучать фундаментальные процессы нейрогенеза на уровне единичных идентифицированных нейронов (см. обзор Croll, 2000; Nezhlin, 2010; Voronezhskaya, Ivashkin, 2010).

Преимущества таких нервных систем в сочетании с современными методами визуализации нейрональных элементов (флуоресцентная иммуноцитохимия и лазерная сканирующая микроскопия) позволили по-новому взглянуть на закладку нервной системы у представителей

трохофорных животных различных таксономических групп. Было показано, что самые первые нейроны в развитии пресноводного легочного моллюска *Lymnaea stagnalis* дифференцируются на периферии в задней части зародыша, а их идущие вперед отростки образуют остов, вдоль которого впоследствии формируется дефинитивная нервная система (Croll, Voronezhskaya, 1996; Voronezhskaya, Elekes, 1996).

Проведенные исследования по раннему нейрогенезу ряда видов моллюсков и полихет с использованием иммунохимического маркирования антителами против нейромедиаторов серотонина (5-HT) и нейропептида FMRFамида (FMRFa), а также ацетилированного тубулина показали, что у всех исследованных животных нейрогенез начинается с ранних периферических нейронов, которые не входят в состав центральной нервной системы, а отростки некоторых из этих нейронов образуют остов, вдоль которого затем формируется ЦНС взрослого постметаморфного животного, что позволяет считать такие нейроны пионерными (Bentley, Keshishian, 1982). При этом, число, расположение и химическая специфичность ранних нейронов у разных видов отличаются.

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.

То, что в онтогенезе всех изученных до настоящего времени представителей Lophotrochozoa, в развитии которых имеется стадия трохофоры, всегда присутствуют ранние периферические нейроны, заставляет предположить, что они имеют сходные физиологические и/или морфогенетические функции. При этом, гомологичность ранних нейронов проблематична, поскольку у разных видов они возникают, скорее всего, из разных зон презумптивной эктодермы и имеют разную химическую специфичность. Предполагается, что ранние периферические нейроны у трохофорных животных участвуют в управлении развитием, воспринимая сигналы из внешней среды. В этом случае, они должны иметь морфологические характеристики, предполагающие их

сенсорную природу, а фармакологическое воздействие на содержание в них медиатора должно приводить к определенным изменениям в личиночном развитии.

5.1 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 . И морской аннелиды - платинереиса *Platynereis dymerilii*.

Пресноводные улитки *H. trivolvis* и *L. stagnalis* представляют собой чрезвычайно удобный объект для экспериментальной эмбриологии и фармакологии. Известно строение как нервной системы взрослых животных, так и развивающихся личинок поздних стадий развития. Все развитие проходит внутри яйца, внутри одного яйца содержится один зародыш и, что особенно важно, развитие всех личинок проходит строго синхронизовано.

Морские аннелиды *Platynereis* и *Dinophilus* – это модельные объекты, чья популярность стремительно растет как для биологии развития, так и для молекулярной биологии. 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 личинок и зародышей.

Тип развития выбранных модельных объектов 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 твистина, 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 длительного 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).

5.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено детальное исследование природы ранних периферических нейронов в развитии моллюсков и аннелид. Выявлена сенсорная природа большинства ранних дифференцирующихся нейронов, установлена роль нейромедиатора серотонина в навигации формирующихся аксонов.

У трохофорных животных, имеющих бифазный пелаго-бентический жизненный цикл, нейрогенез личиночной стадии начинается с дифференцировки ранних периферических нейронов, которые являются транзиторными и не входят в состав центральной нервной системы. Ранние нейроны локализованы чаще всего в апикальном сенсорном органе и в гипосфере. В случае, когда отростки нейронов образуют остов, вдоль которого затем формируется ЦНС взрослого животного, они являются пионерными. Иммунохимическое маркирование ранних нейронов у ряда видов моллюсков и полихет антителами против нейромедиаторов серотонина и FMRFамида в сочетании с антителами против ацетилированного α -тубулина показало, что практически все ранние периферические нейроны имеют строение, характерное для сенсорных (вероятно хемосенсорных) нейронов: булавовидная форма, апикальный дендрит, выходящий на поверхность тела и имеющий терминальное утолщение, а также реснички на конце дендрита или в ампулярной полости. Локализация, форма и медиаторная специфичность ранних сенсорных клеток и ход их отростков различаются у трохофор разных видов. Подавление синтеза серотонина в ранних нейронах у личинок полихет фармакологическими препаратами не влияло на развитие, в то время как усиление синтеза приводило к торможению развития и нарушению морфологии формирующейся нервной системы. Это свидетельствует об участии ранних периферических сенсорных нейронов в регуляции нейрогенеза и темпов развития.

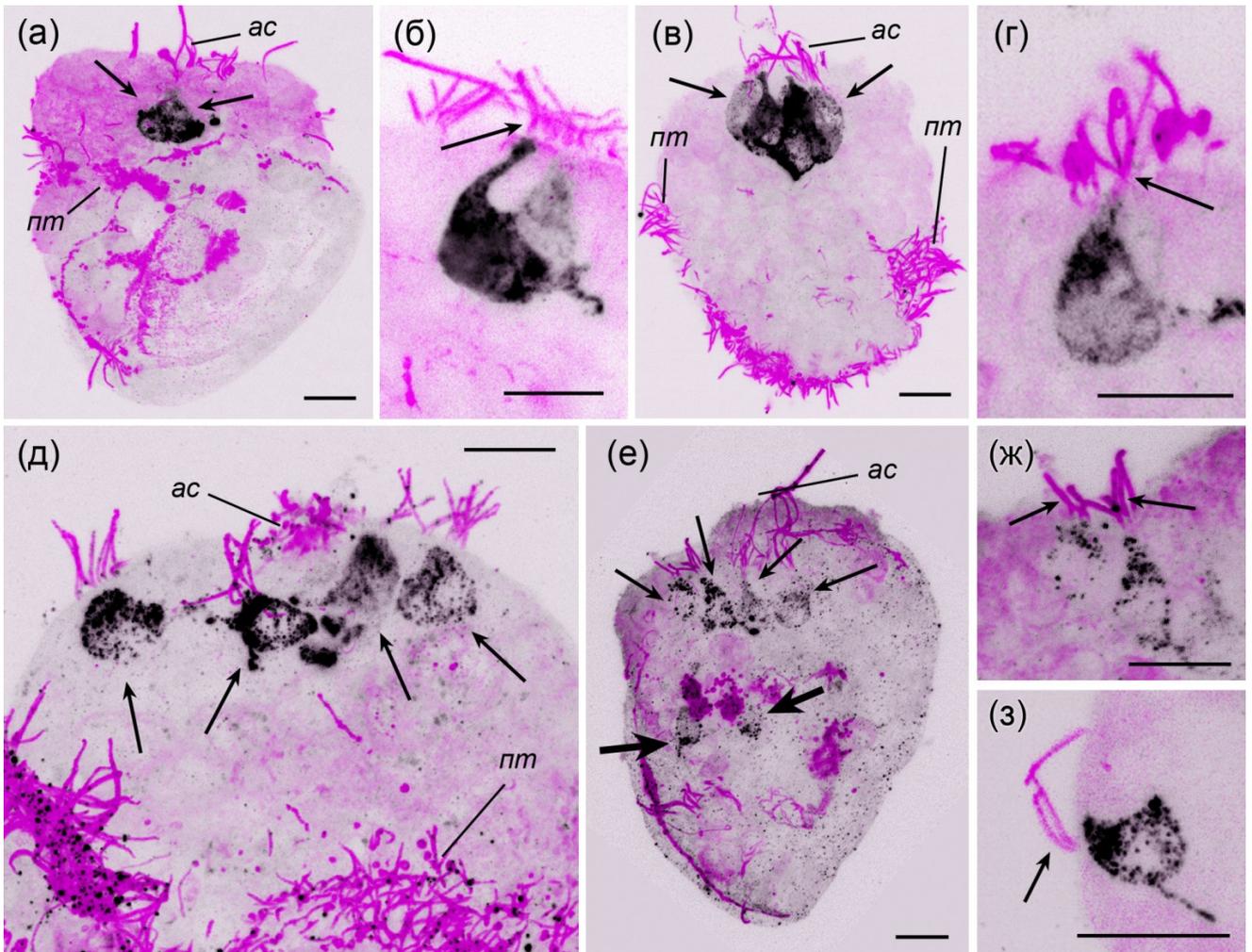


Рис. 6. Примеры маркирования ранних нейронов у моллюсков. Каждая клетка имеет реснички на конце длинного отростка, выходящего на поверхность, что подтверждает сенсорную природу ранних нейронов. (Незлин, Воронежская, Онтогенез, 2017).

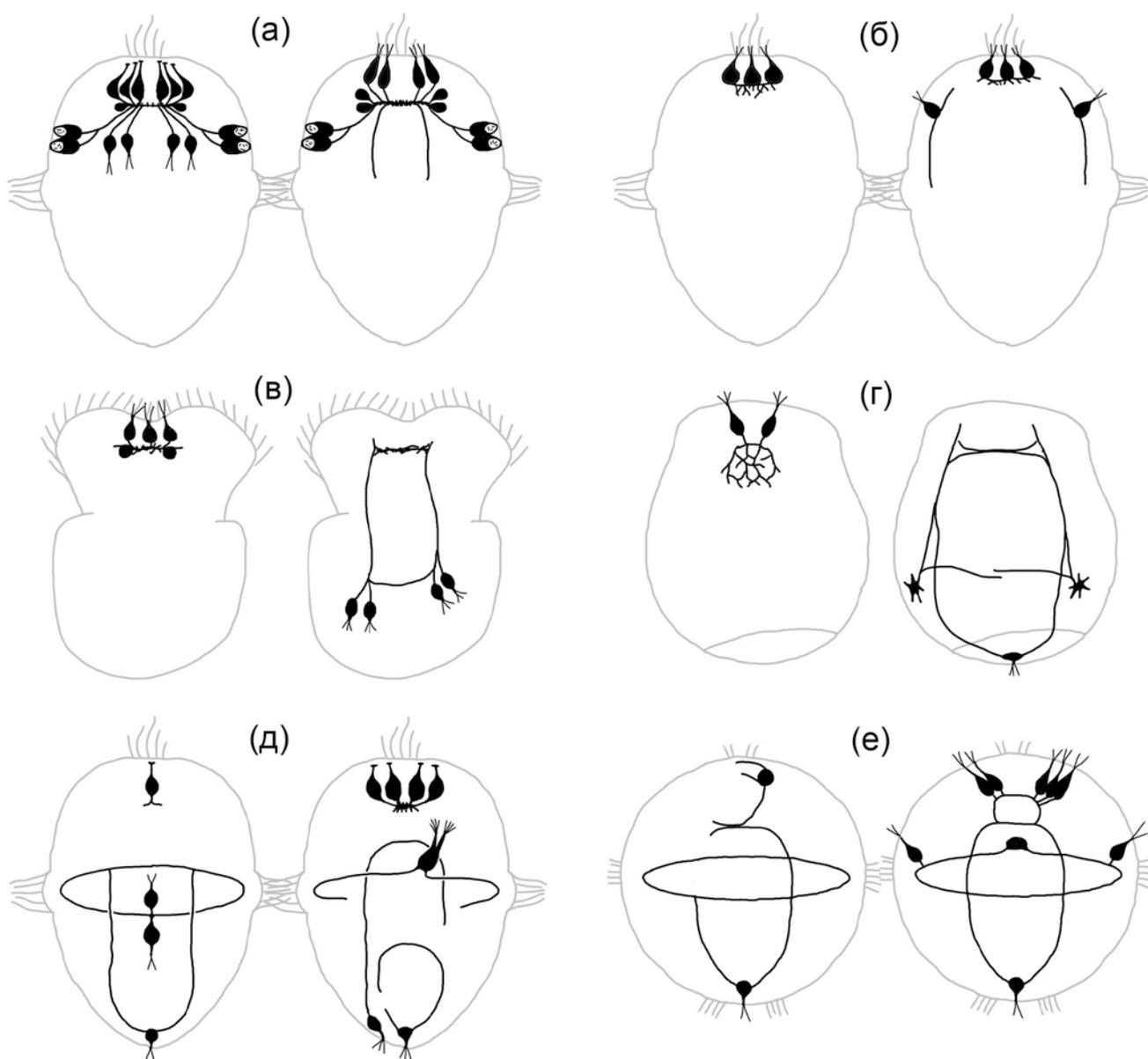


Рис. 7. Схема дифференцировки ранних периферических сенсорных нейронов и последующее формирование зачатков дефинитивной нервной системы у представителей моллюсков и аннелид: *I. hacodadensis* (а), *C. gigas* и *M. trossulus* (б), *T. diomedea* (в), *L. stagnalis* (г), *P. maculata* (д) и *P. dumerilii* (е). Вид с вентральной стороны. В каждой паре слева схема 5-НТ-ИР нейронов, а справа FMRFa-ИР нейронов. (Незлин, Воронежская, Онтогенез, 2017)

Проведено детальное исследование формирования нервной системы у *Platynereis dumerilii*. Развитие нервной системы начинается с дифференцировки периферических нейронов, появляющихся одновременно на переднем и заднем полюсах зародыша. Их аксоны маркируют пути, по которым в дальнейшем следуют отростки появляющихся нейронов, в узлах пересечения

отростков формируются ганглии. Два вентральных отростка каудального нейрона формируют парные вентральные стволы. На переднем конце тела формируется апикальный орган. Затем на переднем конце формируется церебральный ганглий, вдоль вентральных стволов дифференцируются ганглии вентральной цепочки, связанные между собой комиссурами. Несмотря на то, что самый первый нейрон дифференцируется в самой каудальной части личинки, последующее формирование дефинитивных центральных нервных структур идет в передне-заднем направлении.

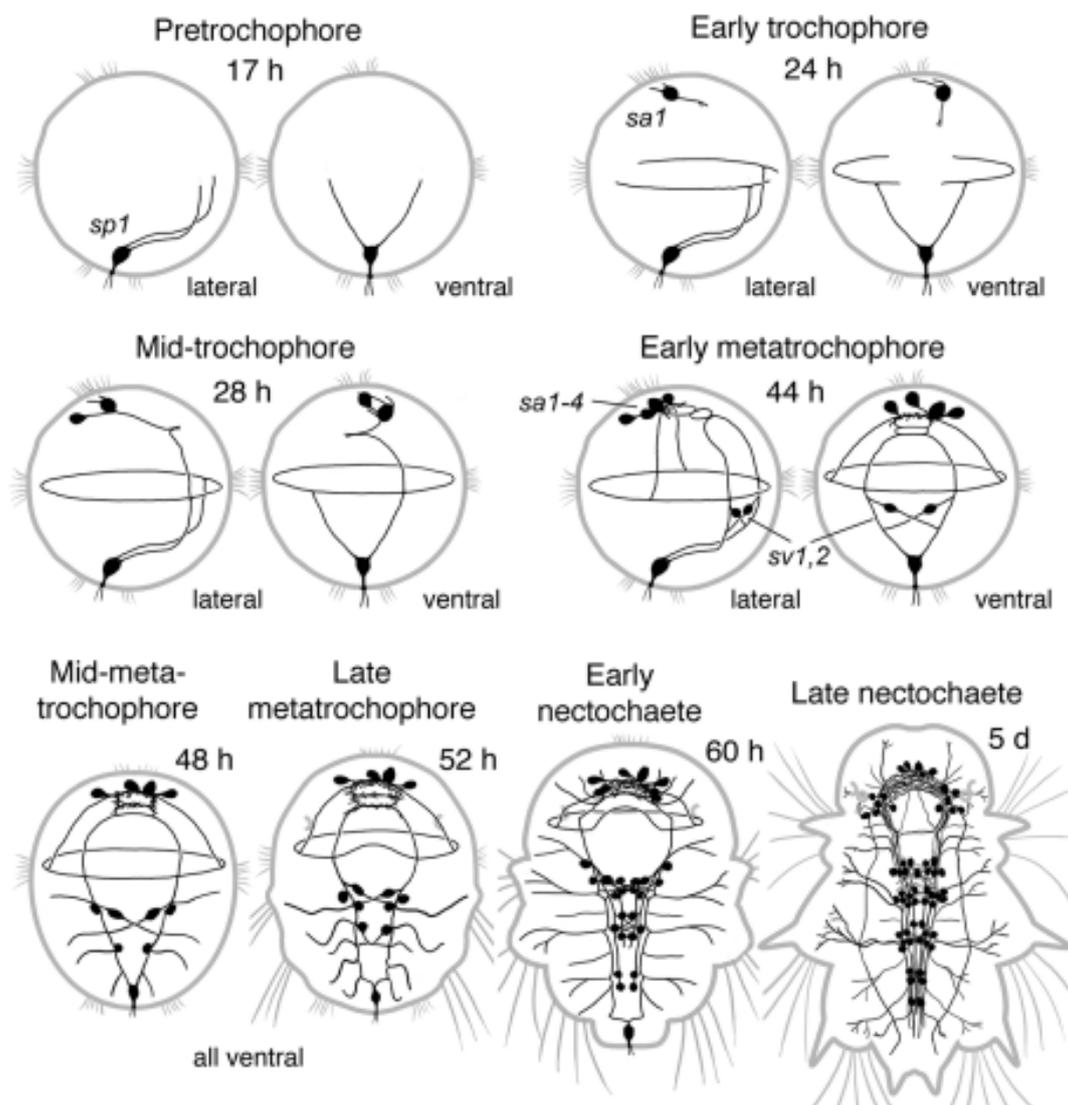


Рис. 8. Схема дифференцировки ранних нейронов и последующего формирования зачатков дефинитивной нервной системы у аннелиды *Platynereis.dumerilii*. (Starunov et al., Front. Zool., 2017).

Разобран нейрогенез серотонинергической системы и формирование паттерна локомоции у двух видов динофилид. Dinophilidae - уникальная группа архианнелид, представители которой

сочетают морфологические особенности различных таксонов Lophotrochozoa. Кроме того, взрослые динофилиды обладают признаками личинки трохофоры. Установлено, что структура серотонинсодержащих элементов несколько различается у двух видов. У *D. taeniatus* проявляются все черты ортогона, с концентрацией нервных клеток в узлах вентральной цепочки. В то время как у *D. gyrociliatus* строение вентральной системы диффузное, с рассеянным расположением нервных клеток. У обоих видов выявлено активное ветвление серотонинсодержащих отростков под вентральной ресничной полоской. Общий план строения не отличается у поздних личинок и взрослых особей обоих видов. Выявлено парадоксальное явление: в то время как у личинок аппликация серотонина или его предшественника ускоряла ресничную локомоцию, аналогичное воздействие никак не влияло или даже замедляло ресничную локомоцию взрослых особей. Высказано предположение о смене рецепторов серотонина в процессе развития архианнелид.

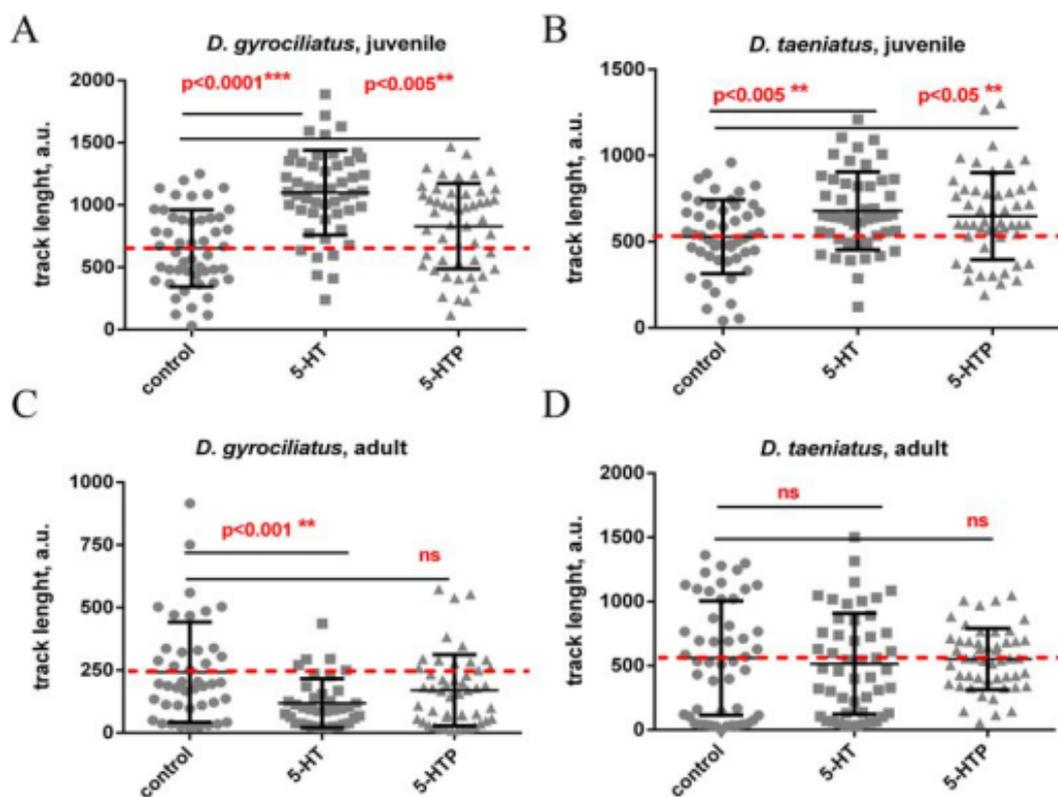


Рис. 9. Скорость ресничной локомоции при различных фармакологических воздействиях у поздних личинок и взрослых особей архианнелид. (Fofanova et al., Invert. Zool., 2017).

Модифицирована методика, ранее разработанная в лаборатории нейробиологии развития ИБР РАН (Sakharov, 1991)., позволяющая модулировать уровень моноаминов внутри нейронов. Аппликация нейромедиаторов или их непосредственных биохимических предшественников позволяет специфически повысить уровень медиатора в определенных нервных клетках. Ранее было показано, что для личинок моллюсков наиболее продуктивным методом повышения уровня серотонина внутри развивающихся клеток является предшественник серотонина (Ivashkin et al.,

2015). Для личинок морских ежей более адекватным оказалось использование непосредственно медиаторов: дофамина и серотонина. Кроме возможности визуализации на самых ранних стадиях дифференцировки, разработанная методика позволяет оценить уровень функциональной активности системы синтеза и захвата медиаторов, что является одной из основных характеристик степени дифференцировки нервной клетки.

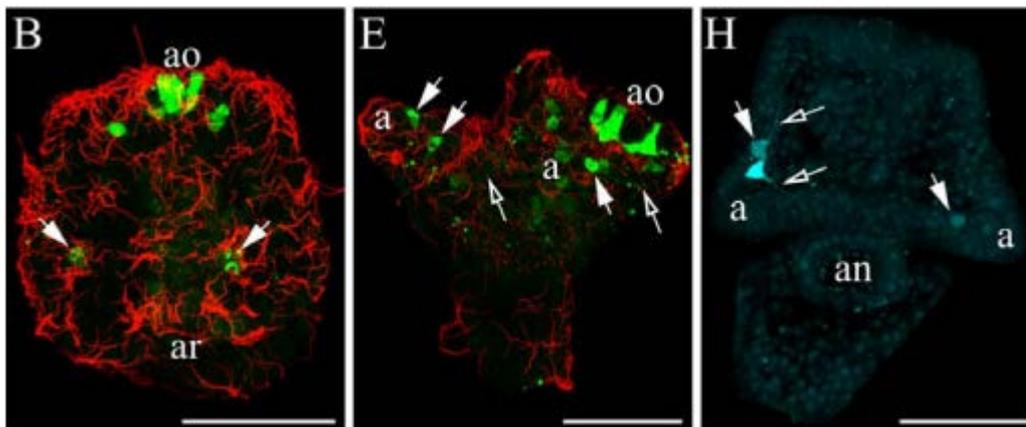


Рис. 10. Ранние серотонин – (зеленый) и дофамин- (циан) содержащие нервные клетки у личинок морского ежа на стадии гастролы и плутеуса (Obukhova et al., *Invert. Zool.*, 2017).

Впервые получены данные о существовании локальной серотонинергической системы в женской части репродуктивной системы моллюска большого прудовика. Выявлены несколько типов клеток, расположенных в эпителиальном слое *pars contorta*, а также мощная сеть их отростков в поверхностном слое репродуктивного канала. Высказывается предположение о возможной модулирующей роли серотонина, вырабатываемого этими клетками, на созревание яйцеклетки и последующее развитие зародыша.

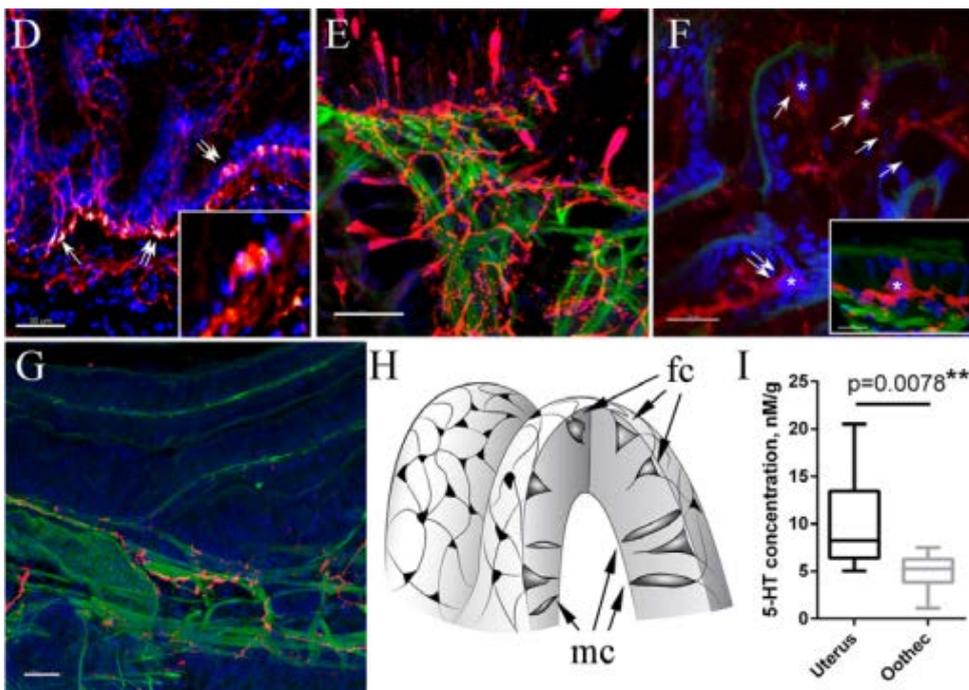


Рис. 11. Локальная серотонинсодержащая нервная сеть в маточной части репродуктивной системы моллюска большого прудовика (Ivashkin et al., *Invert. Zool.*, 2017).

5.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе анализа полученных результатов по проведению комплексного исследования роли нервной системы в процессах развития, участия серотонина в реализации значимых адаптивных программ, а также роли формирующейся нервной системы в развитии организма, выявлены перспективные задачи для дальнейших исследований в рамках этой актуальной области современной биологии развития:

- продолжить исследование по определению консервативных клеточных и молекулярных механизмов, задействованных на самых ранних стадиях нейрогенеза, чтобы в ключевых пространственно-временных промежутках установить взаимодействие нервных и локомоторных элементов, на основе которых происходит формирование поведенческих паттернов у зародышей и взрослых животных.
- установить роль локальной моноаминергической системы, расположенной в определенных областях репродуктивной системы, в модуляции паттерна развития и формировании поведения у потомков, выявить возможные естественные причины изменения уровня различных моноаминов в элементах этой системы.

5.4 ССЫЛКИ

1. Bentley D., Keshishian H. Pathfinding by peripheral pioneer neurons in grasshoppers // *Science*. 1982. V. 218. P. 1082–1088.
2. Croll R.P. Insights into early molluscan neuronal development through studies of transmitter phenotypes in embryonic pond snails // *Microsc. Res. Tech.* 2000. V. 49. P. 570–578.
3. Croll R.P., Voronezhskaya E.E. Early elements in gastropod neurogenesis // *Devel. Biol.* 1996. V. 173. P. 344–347.
4. Ivashkin E., Khabarova M.Yu., Melnikova V. et al. Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails // *Cell Reports* 2015. V. 18. P. 1144-1158.
5. Nezlin L.P. The Golden Age of Comparative Morphology: Laser Scanning Microscopy and Neurogenesis in Trochophore Animals // *Rus. J. Dev. Biol.* 2010, V. 41. №. 6. P. 381–390.
6. Sakharov D.A. Use of transmitter precursors in gastropod neuroethology. In *Molluscan neurobiology: proceedings of the third symposium* (ed. K.S. Kits, H.H. Boer and J. Joose), 1991, pp. 236-242. Amsterdam, The Netherlands: North-Holland.

7. Starunov V.V. , Voronezhskaya E.E., Nezhlin L.P. Development of the nervous system in *Platynereis dumerilii* (Nereididae, Annelida) // *Frontiers in Zoology*. 2017. В печати.
8. Voronezhskaya E.E., Elekes K. Transient and sustained expression of FMRFamide-like immunoreactivity in the developing nervous system of *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Pulmonata) // *Cell. Mol. Neurobiol.* 1996. V. 16. P. 661–676.
9. Voronezhskaya E.E., Ivashkin E.G. Pioneer neurons: a basis or limiting factor of Lophotrochozoa nervous system diversity? // *Russ. J. Dev. Biol.* 2010. V. 41. P. 337-346.

Раздел 6. Механизмы регуляции обмена ионов кальция в гладкомышечных и эндотелиальных клетках кровеносных сосудов

6.1 ВВЕДЕНИЕ

В 2017 г. были продолжены исследования регуляции и физиологических функций двупоровых кальциевых каналов (two-pore calcium channels – TPC). Название двупоровые каналы обусловлено тем, что функциональный кальциевый канал образован двумя субъединицами, в каждой из которых есть две формирующие пору петли. Каналы TPC локализованы в лизосомах и лизосомоподобных везикулах и активируются под действием вторичного мессенджера NAADP (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) [1].

В прошедшем году впервые показано, что каналы TPC в эндотелиальных клетках активируются физиологически релевантными концентрациями перекиси водорода. Как сейчас установлено перекись водорода образуется не только как фактор, направленный на уничтожение инородных клеток, но выполняет также функцию внутриклеточного вторичного мессенджера [2]. И как показано в нашей работе, одной из мишеней H₂O₂ в эндотелиальных клетках являются кальциевые каналы TPC.

6.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток.

Эндотелиальные клетки выделяли из пупочной вены человека по методике, описанной ранее [3], с модификациями [4]. Пупочную вену промывали раствором Хэнкса с антибиотиками, после чего заполняли средой M199 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 M199 с солями Эрла, содержащую 20 % бычьей эмбриональной сыворотки («Invitrogen», США), 300 мкг/мл эндотелиальной ростовой добавки, полученной из мозга кролика методом Мациага [5], 100 мкг/мл гепарина, 100 мкг/мл гентамицина.

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

Эндотелиальные клетки выращивали в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. В работе использовали клетки 2–4 пассажей, для снятия клеток при пассировании применяли раствор акъютазы (SigmaAldrich, США).

6.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты проводились на культивируемых эндотелиальных клетках пупочной вены человека 2-4 пассажей. На первом этапе мы оценили экспрессию каналов TPC в клетках. В организме человека экспрессируются два вида этих каналов – TPC1 и TPC2. Содержание в

эндотелиальных клетках кодирующих данные каналы мРНК, определенное относительно мРНК β -актина методом количественной полимеразной реакции, показано в таблице. Как видно из этих данных, уровни экспрессии кодирующих каналов генов TPCN1 и TPC2 в эндотелиальных клетках достоверно не отличаются.

Таблица. 1. Содержание транскриптов, кодирующих каналы белки TPC1 и TPC2, и структура зондов и праймеров, используемых в полимеразной цепной реакции

.	Содержание мРНК относительно мРНК β -актина	Праймер F 5'-3'	Праймер R 5'-3'	Зонд
TPC1	0,00106 \pm 0,00037	GCACACAATCAC CTCTTCTACCTG	GACGCCACCGC AATACCG	CCTGCTGCTGCTG CTGCTCTCCCTG
TPC2	0,00095 \pm 0,00034	GATGATTCCTGC GTATTCCAAGAA C	ATGGAGGATAG GACTTCAAAGG C	TCCCAGCCGCCTC CGAAACAGC

Внутриклеточную локализацию каналов TPC оценивали с помощью cis-NED19, флуоресцентного селективного антагониста NAADP, и специфических маркеров внутриклеточных органелл. Локализация участков связывания cis-NED19 соответствует положению окрашенных лизотрекером лизосом и лизосомоподобных везикул (рис.1). Для оценки колокализации двух флуоресцентных меток использовался программный пакет Imaris 7.0.0 (BitPlane, UK). В качестве критерия колокализации использовался коэффициент корреляции Пирсона, рассчитываемый по формуле:

$$PCC = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R}) \times (G_i - \bar{G})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \times (G_i - \bar{G})^2}}$$

где, R_i и G_i - интенсивности флуоресценции каждого канала в пикселе i , а \bar{R} и \bar{G} средняя интенсивность флуоресценции обоих каналов по всему изображению. Т.к. площадь изображения, занятая объектами, невелика, измерения проводились в выделенной области интереса, полученной с помощью функции *threshol*d. Коэффициент корреляции Пирсона в данном эксперименте составил 0,7911, что говорит о значительной колокализации. После 10 минут инкубации, cis-NED преимущественно локализуется в лизосомах. При анализе колокализации cis-NED с маркерами эндоплазматического ретикулума (ER-tracker) и митохондрий (Mitotracker) не выявилось какой-либо значительной колокализации ($PCC = 0.2917$ и -0.1172 соответственно).

Кинетика увеличения $[Ca^{2+}]_{цит}$ в эндотелиальных клетках под действием пероксида водорода характеризуется быстрым подъёмом в течение менее 1 мин и чуть более медленным спадом (рис.2). В части клеточных препаратов при концентрациях пероксида водорода 100-200 мкМ наблюдалась вторая фаза кальциевого сигнала, которая имела большую продолжительность (более 5 мин). Этот эффект нами не исследовался. Полумаксимальный эффект H_2O_2 оказывал при концентрации 60 мкМ. Добавление ионов гадолиния в концентрации 100 мкМ также, как и помещение клеток в среду без кальция в присутствии 100 мкМ ЭГТА, не снижало кальциевый сигнал. Из этого следует что подъём $[Ca^{2+}]_{цит}$ в клетках, происходящий в быстрой фазе, осуществляется за счет высвобождения ионов кальция из внутриклеточных депо

Ранее было показано, что пероксид водорода может вызывать выброс Ca^{2+} из ретикулума эндотелиальных клеток пупочной вены человека через каналы, активируемые инозитолтрифосфатом [6]. Нашей задачей было выяснить, есть ли вклад лизосом и эндолизосомальных везикул и локализованных в них каналов ТРС в вызываемый пероксидом водорода подъём $[Ca^{2+}]_{цит}$. Для этого был использован антагонист NAADP, его структурный аналог trans-NED19. Этот стереоизомер имеет более слабую флуоресценцию по сравнению с cis-NED19, но более высокое сродство к участкам связывания NAADP. Как показано на рис.3, trans-NED19 подавляет подъём $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на добавление 100 мкМ H_2O_2 .

Полученные данные указывают на участие каналов ТРС в вызываемом пероксидом водорода подъёме $[Ca^{2+}]_{цит}$ в эндотелиальных клетках. Эти результаты позволяют высказать гипотезу о существовании для каналов ТРС механизма регуляции, альтернативного механизму их активации агонистами, стимулирующими синтез NAADP. К настоящему времени уже сформировалась концепция, согласно которой пероксид водорода выполняет роль внутриклеточного вторичного мессенджера. Ранее мы показали, что экзогенный пероксид водорода способен проникать через плазматическую мембрану эндотелиальных клеток. Можно поэтому предположить, что при его добавлении во внеклеточную среду имитируется действие агонистов, эффекты которых опосредованы образованием пероксида водорода в качестве вторичного мессенджера. К числу агонистов, стимулирующих продукцию пероксида водорода в эндотелиальных клетках, относятся фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) и трансформирующий ростовой фактор (TGF-beta) [7]. Выяснение влияния на активность каналов ТРС этих и других агонистов является задачей будущих исследований.

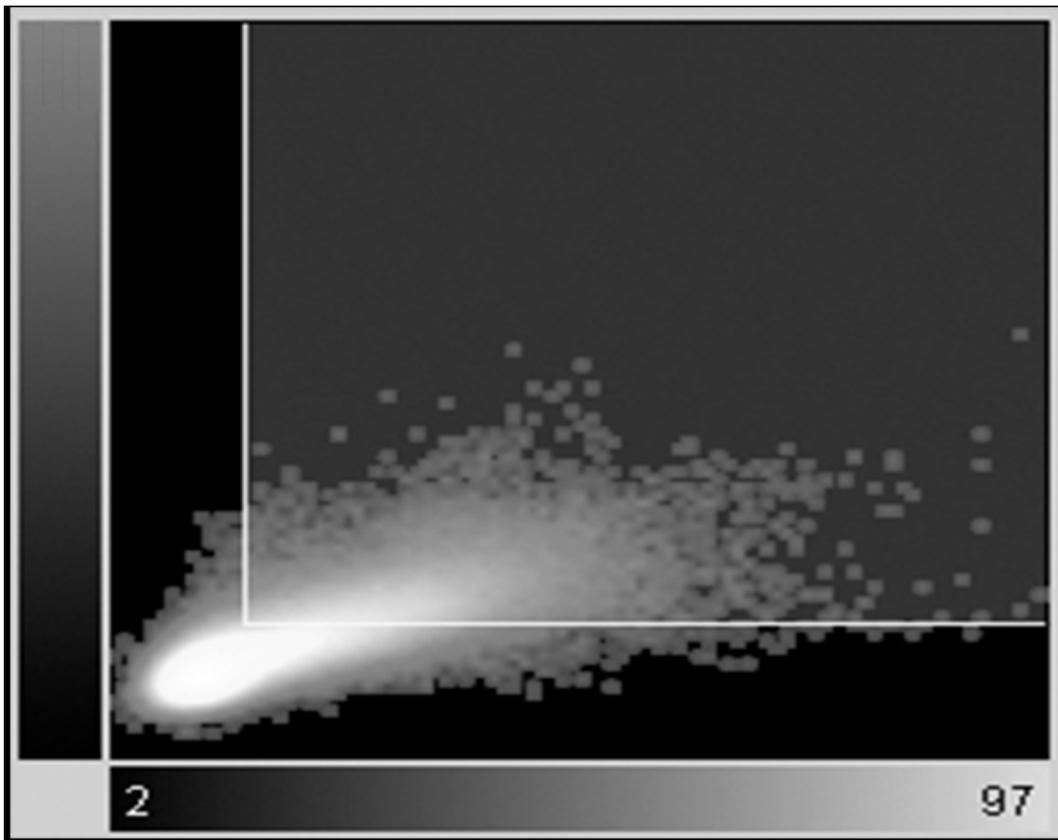


Рис.12. Анализ распределения интенсивностей флуоресценции cis-NED19 и лизотрекера. Эндотелиальные клетки окрашены антагонистом NAADP cis-NED19 и маркером лизосом лизотрекером. По оси абсцисс отложена интенсивность флуоресценции cis-NED19 после определения порога яркости, по оси ординат интенсивность флуоресценции лизотрекера.

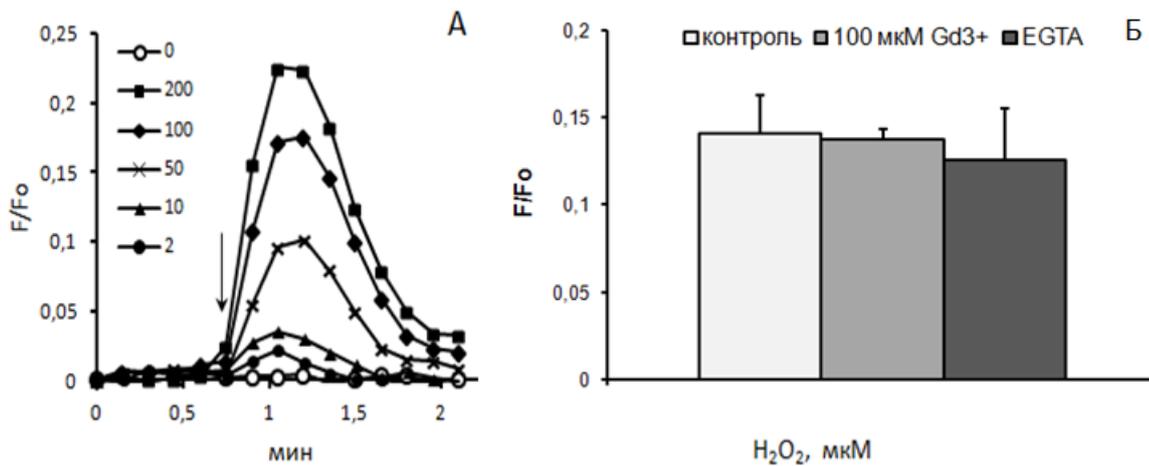


Рис. 13. Изменения $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на добавление H_2O_2 и Зависимость величины кальциевого сигнала в эндотелиальных клетках от концентрации H_2O_2 (А) и подъём $[Ca^{2+}]_{цит}$ под влиянием пероксида водорода в эндотелиальных клетках в контрольных условиях, в присутствии блокатора кальциевых каналов плазмалеммы ионов гадолиния и в среде без кальция в присутствии ЭГТА (Б). Концентрации H_2O_2 составляли от 2 до 200 мкМ (А).

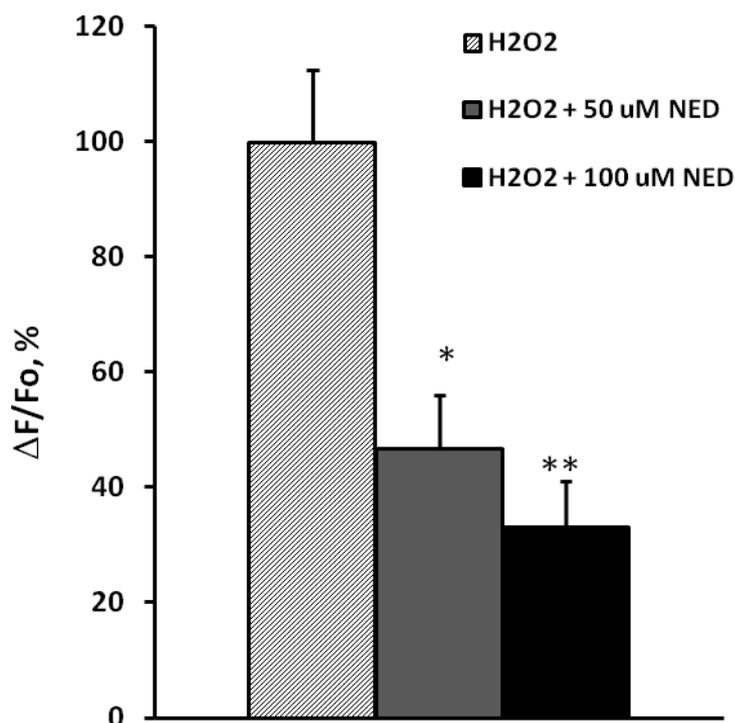


Рис. 14. Подавление вызванного пероксидом водорода подъёма $[Ca^{2+}]_{цит}$ под действием trans-NED19 в концентрации 50 и 100 мкМ. Концентрация H_2O_2 100 мкМ. Достоверность отличия от контроля * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Churchill, G.C., et al., *NAADP mobilizes $Ca(2+)$ from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs*. Cell, 2002. **111**(5): p. 703-8.
2. Rhee, S.G., et al., *Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(2): p. 183-9.
3. Jaffe, E.A., et al., *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*. J. Clin. Invest, 1973. **52**(11): p. 2745-56.
4. Goncharov, N.V., et al., *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. **104**(9): p. 376-8.
5. Maciag, T., et al., *An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1979. **76**(11): p. 5674-8.
6. Zheng, Y. and X. Shen, *H₂O₂ directly activates inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in endothelial cells*. Redox Rep, 2005. **10**(1): p. 29-36.

7. Chen, L., et al., *Both hydrogen peroxide and transforming growth factor beta 1 contribute to endothelial Nox4 mediated angiogenesis in endothelial Nox4 transgenic mouse lines*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014. **1842**(12 Pt A): p. 2489–99.

Раздел 7. Многообразие медиаторных систем в эмбриогенезе

7.1. Введение

Исследуются компоненты регуляторных систем с участием веществ, идентичных нейротрансмиттерам, и механизмы их функционирования в раннем развитии нескольких модельных объектов – шпорцевой лягушки (*Xenopus tropicalis*) и мышей.

Серотонин и дофамин, наряду с другими классическими нейротрансмиттерами, являются универсальными сигнальными веществами, контролирующими разнообразные процессы развития, такие как созревание половых продуктов, оплодотворение, контроль клеточного цикла, межбластомерные взаимодействия, ресничная моторика, морфогенетические движения клеток и т.д. Известно пять типов мембранных рецепторов дофамина, сопряженных с разными системами вторичных мессенджеров. В системе везикулярного транспорта синтезированный нейроном дофамин локализуется в синаптических везикулах, после он поступает в синаптическую щель к системе обратного захвата. На разных биологических объектах выявлены свидетельства присутствия и функционирования дофамина на ранних стадиях эмбриогенеза, но молекулярно-генетические исследования элементов моноаминергических систем фрагментарны. Целью работы было исследование экспрессии компонентов катехоламинергических систем в раннем развитии *Xenopus tropicalis*.

Участие этих веществ в регуляции процессов роста и созревания женских половых клеток показано для широкого ряда животных, в том числе млекопитающих, и, по всей видимости, является одной из его консервативных функций. В яичнике млекопитающих серотонин определяется в физиологических концентрациях, в частности, в ооцитах, клетках кумулюса и в фолликулярной жидкости. На различных моделях показано, что серотонин обладает стимулирующим действием на функцию фолликулярных клеток. Потенциальными источниками экзогенного по отношению к овариальному фолликулу серотонина являются тромбоциты кровяного русла, тучные клетки, локализующиеся в строме яичника, а также немногочисленные нервные волокна, сопровождающие крупные медуллярные сосуды. Не исключен и синтез серотонина в самом яичнике, однако прямыми методами он не показан. Одним из вероятных механизмов накопления серотонина в тканях яичника является его захват из межклеточной среды с помощью специфического мембранного транспортера Sert (Slc6a4). Известно, что этот транспортер экспрессируется и обладает специфической активностью в зрелых ооцитах, доимплантационных эмбрионах и клетках кумулюса. Однако пока неизвестно, в каких конкретно клеточных компонентах яичника экспрессируется транспортер серотонина и активен ли он на ранних стадиях оогенеза. Тем не менее, существуют литературные данные о возможной роли мембранного транспорта серотонина в регуляции функциональной активности яичника. Так, у самок костистой рыбы *Danio rerio* ингибитор обратного захвата серотонина флуоксетин приводит к уменьшению количества икры и содержания эстрадиола в яичниках, а также к снижению уровня

экспрессии мРНК овариальной ароматазы и рецепторов к гонадотропным гормонам, аналогичные данные получены на млекопитающих. Более того, у мышей, нокаутных по гену *Sert*, угнетена экспрессия ароматазы и, как следствие, уменьшается содержание эстрадиола в крови. Приведенные данные, однако, не отвечают на вопрос, каким образом реализуются эти эффекты — непосредственно путем прямого воздействия на яичник или косвенно через мозг и гипоталамо-гипофизарную систему.

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.

7.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

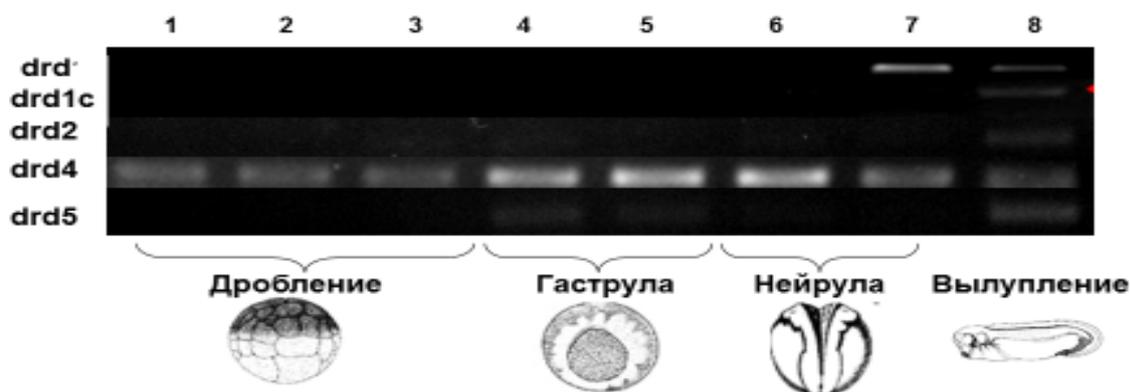
Зародыши шпорцевой лягушки *Xenopus* фиксировали и выделяли суммарную РНК. Проводили ОТ-ПЦР на термоциклере MJ Mini с помощью специфических олигонуклеотидов. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с этидиум бромидом. Праймеры готовили с помощью Lasergene PrimerSelect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

В работе на мышах использовали гибриды F1 линий C57BL/6J и CBA/J. Работу проводили с использованием стандартных методик. Для исследования функциональной активности мембранного транспорта серотонина мышам ежедневно в течение 5 дней подкожно вводили серотонин (Sigma Aldrich, 25 мг/кг). Яичники фиксировали в 4% параформальдегиде, после чего получали криосрезы толщиной 10 мкм. Процедуру гибридизации *in situ* проводили согласно опубликованному протоколу. Смысловой и антисмысловой РНК-зонды, меченые дигоксигенином, синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью набора HiScribe™ T7 (New England Biolabs). В качестве матрицы использовали линейризованную плазмиду pAL2-T (Евроген), в которую был клонирован продукт ПЦР (1033 пн), полученный с помощью следующих праймеров: прямой 5'-GGGATGAAGCGCCACACTCTACG-3' и обратный 5'-TCTTTGGCCACCTCGGACACG-3'. Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов проводили поликлональными антителами кролика против серотонина (AB938 Milipore) или против *Sert* (ab174770 Abcam), и вторичными антителами козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с дальним красным флуорофором Alexa Fluor® 647 (ab150079 Abcam). Препараты просматривали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica SP5.

7.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом ОТ-ПЦР была изучена экспрессия известных рецепторов, транспортеров, ферментов синтеза и деградации дофамина у *Xenopus* на последовательных стадиях эмбриогенеза. Экспрессия рецепторов *drd1*, *drd1c*, *drd2*, *drd5* выявлена, начиная с нейрулы, в то время как *drd4* обнаружен на всех стадиях.

Рис.



1

Рис. 15. Экспрессия мРНК рецепторов дофамина в развитии *Xenopus*

Лимитирующий фермент синтеза дофамина *th* также обнаружен на всех стадиях, ферменты синтеза катехоламинов норадреналина *dbh* и адреналина *pnmt* появляются со стадии нейрулы. На ранних стадиях экспрессируется везикулярный транспортер *vmat*, мембранные транспортеры катехоламиниов *net* и *dat* обнаружены со стадий гаструлы и нейрулы соответственно. Ферменты системы деградации *comt* и *maob* выявлены на всех стадиях и со стадии гаструлы соответственно. Результаты свидетельствуют о том, что на донервных стадиях эмбрионального развития *Xenopus*, наряду с серотонинергической, экспрессируются ключевые компоненты дофаминергической системы - ферменты синтеза, везикулярный транспортер и мембранный рецептор. При этом в отличие от серотонина, мембранные транспортеры дофамина, норадреналина и адреналина на ранних стадиях развития отсутствуют.

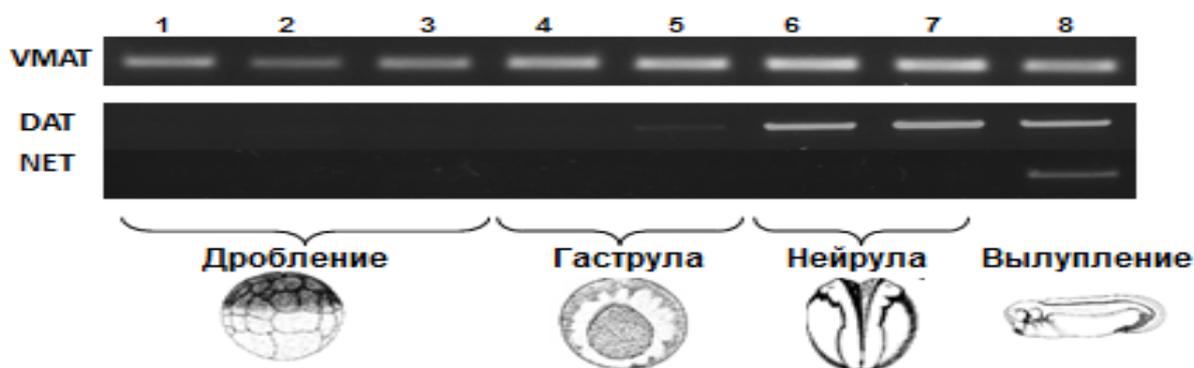


Рис. 16. Транспортеры дофамина в развитии *Xenopus*

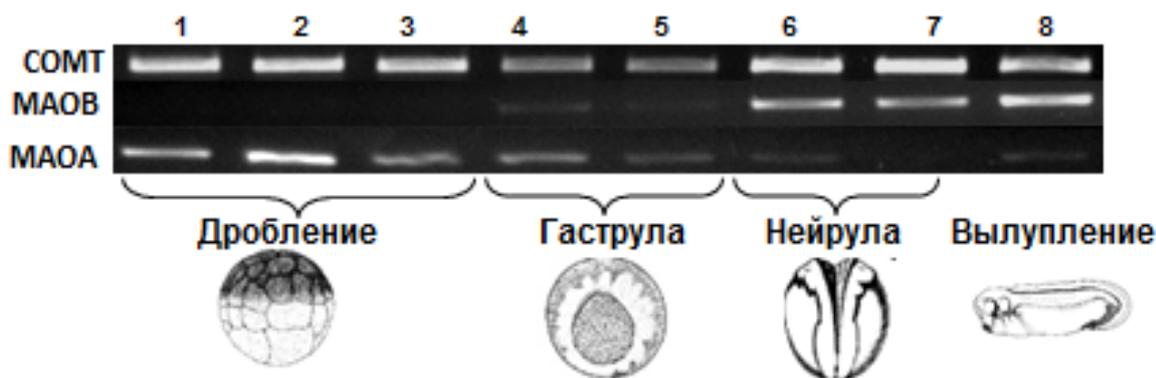


Рис. 17 Ферменты деградации дофамина в развитии *Xenopus*

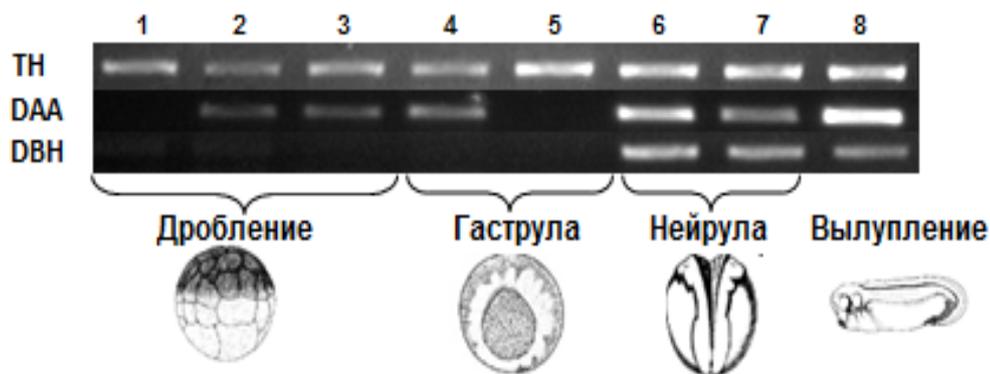


Рис. 18. Экспрессия ферментов синтеза дофамина в развитии *Xenopus*

В ходе оогенеза мышей происходит накопление в яйцеклетках большинства животных низкомолекулярных сигнальных молекул: серотонина и других моноаминергических транмиттеров (дофамина и норадреналина). Предполагается, что накопление серотонина в яйцеклетках происходит за счет активности системы мембранного транспорта в ооцитах и окружающих его фолликулярных клетках. При иммуногистохимическом окрашивании криосрезов яичника мыши антителами против серотонина было выявлено, что транмиттер локализуется в ооцитах. Проведено исследование экспрессии транспортера Sert в яичнике на более ранних этапах оогенеза. Для подтверждения наличия экспрессии мРНК мембранного транспортера серотонина в яичнике была проведена гибридизация *in situ*, позитивная реакция выявляется в овариальных фолликулах на всех стадиях фолликулярного роста. Иммуногистохимическое окрашивание антителами против Sert выявило, что транспортер локализуется в овариальных фолликулах, причем в гораздо большей степени иммунореактивность представлена в ооцитах (Рис. 5). Иммунореактивность наблюдается как в растущих ооцитах, так и в ооцитах примордиальных фолликулов, находящихся в состоянии блока мейоза. Контрольное окрашивание без первичных антител подтвердило специфичность иммунореакции.

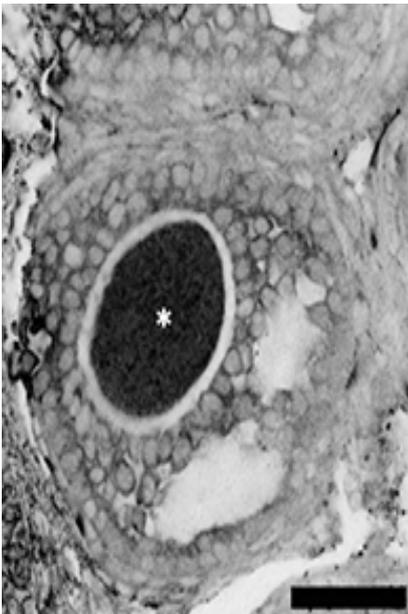


Рис. 19. Иммуноокрашивание мембранного транспортера Sert в яичнике мыши.

Полученные результаты демонстрируют, что в овариальных фолликулах выявляется как мРНК транспортера серотонина, так и сам мембранный белок, а также его функциональная активность. Полученные результаты указывают на наличие и функциональную активность транспортера серотонина в развивающихся овариальных фолликулах и позволяют предполагать, что его регуляторная роль появляется уже на самых ранних этапах оо- и фолликулогенеза. Это представляет особый интерес в связи с потенциальным влиянием широко распространенных антидепрессантов из ряда ингибиторов обратного захвата серотонина на репродуктивную функцию.

По заказу редакции специализированного выпуска журнала *Marine Drugs*, посвященного регуляции ионных каналов веществами, происходящими из морских организмов, опубликован обзор Yu. Shmukler & D. Nikishin. Ladder-shaped ion channels' ligands: current state of knowledge. *Marine Drugs*, 2017, 15(7), 232; doi:10.3390/md15070232. Рассмотрены функции бревне-, цигуа- и майтотоксинов как лигандов ионных каналов.

7.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, работами 2017 года заполнен пробел в знаниях, касающихся экспрессии в раннем развитии земноводных компонентов дофаминергического механизма, во многих случаях действующего как функциональный антагонист серотонинергического механизма. Основные компоненты дофаминергического механизма в раннем развитии шпорцевых лягушек присутствуют, однако, в отличие от серотонинергического механизма, на ранних стадиях развития экспрессируется мРНК только одного типа дофаминовых рецепторов.

Работами по изучению оогенеза и фолликулогенеза мышей продемонстрирована определенная преемственность серотонинергического механизма между тканями генеративных

органов и собственно овоцитами, которые, по крайней мере частично могут аккумулировать серотонин из межклеточной среды с участием специфического транспортера.

В 2018 году предполагается провести широкое систематическое изучение экспрессии компонентов различных сигнальных механизмов в эмбриогенезе основных объектов таких исследований – шпорцевых лягушек, морских ежей и млекопитающих. Предполагается продолжить изучение влияния трансммиттеров и их антагонистов на состояние активнового и тубулинового цитоскелета морских ежей, а также уточнить представления о специфичности трансммиттерных механизмов в период делений дробления.

При наличии финансовых возможностей будут начаты иммунологические исследования экспрессии белков – трансммиттерных рецепторов.

Раздел 8. Развитие внутримозговых связей у крыс

8.1. 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.

8.2 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.

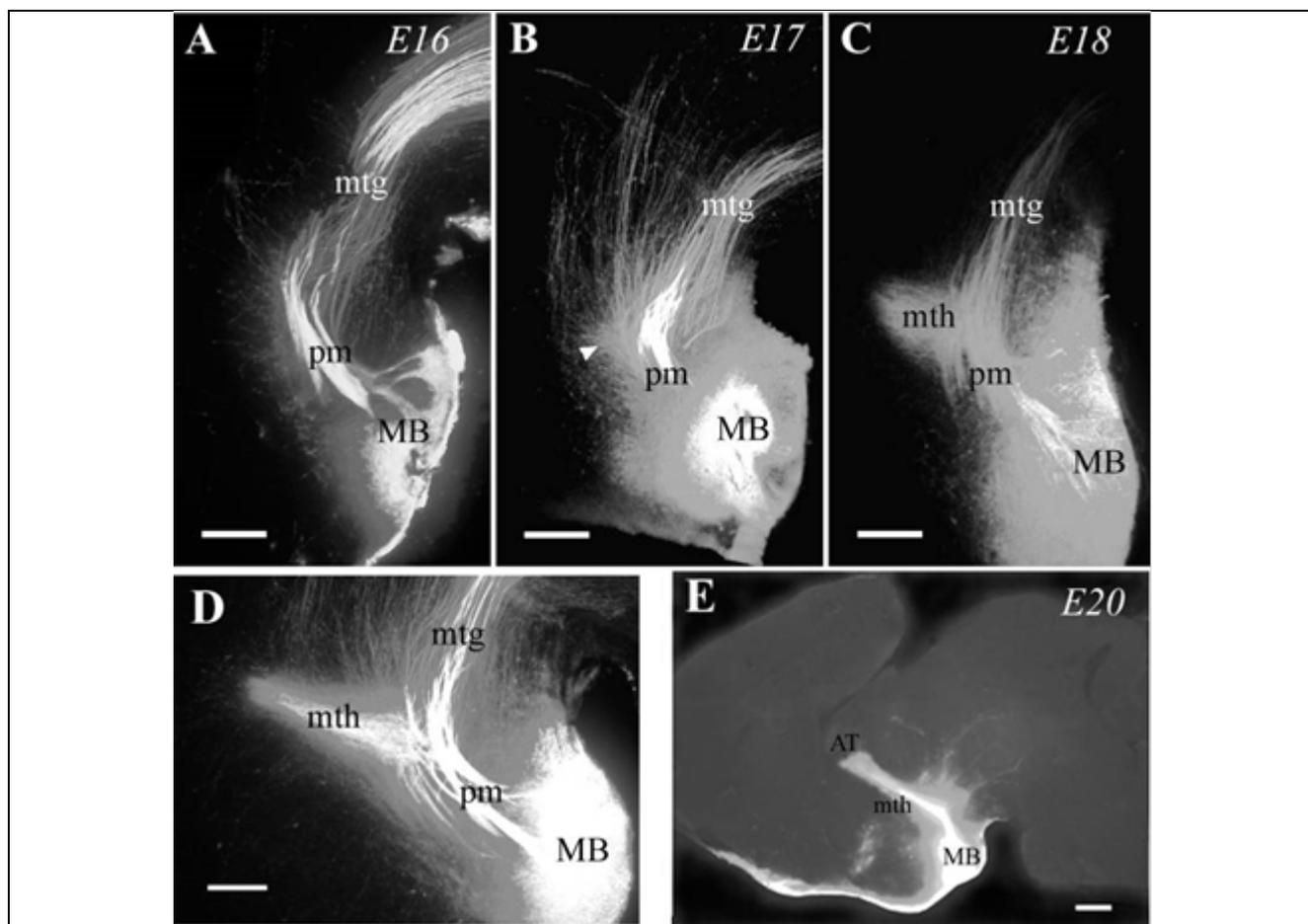


Рис. 20. Сагиттальные срезы мозга плодов крыс на разных сроках развития (E16 –E20) после нанесения кристаллов DiI в область мамиллярных тел (MB). А - Мамиллотегментальный тракт(mtg) хорошо выражен уже на E16 (шестнадцатый день эмбрионального развития). В – первые признаки появления коллатералей от аксонов 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 μm .

Наглядным примером служит исследование развитие проекций мамиллярных тел на средний мозг (мамилло-теgmentальный 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.

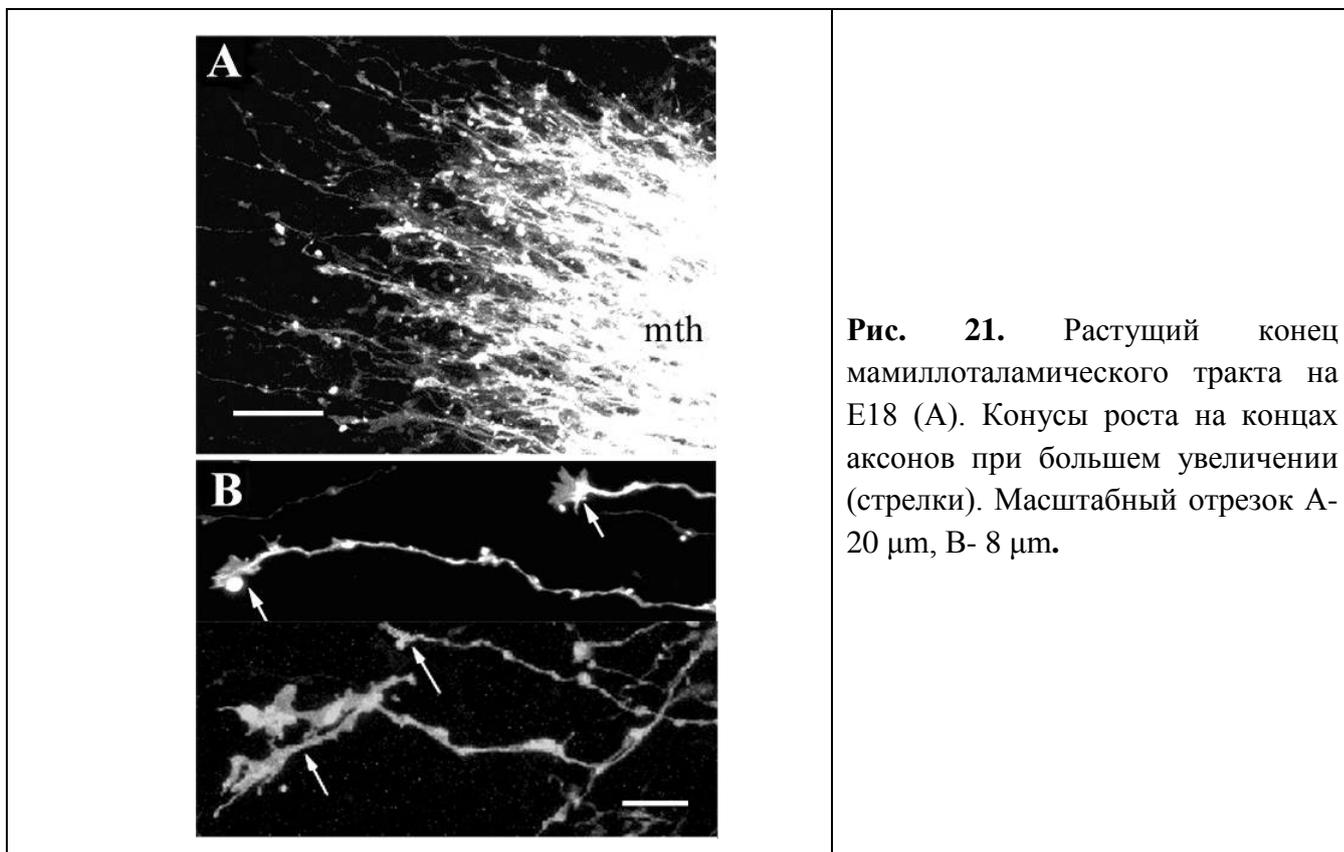


Рис. 21. Растущий конец мамиллоталамического тракта на E18 (А). Конусы роста на концах аксонов при большем увеличении (стрелки). Масштабный отрезок А- 20 μm , В- 8 μm .

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. Проекции 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).

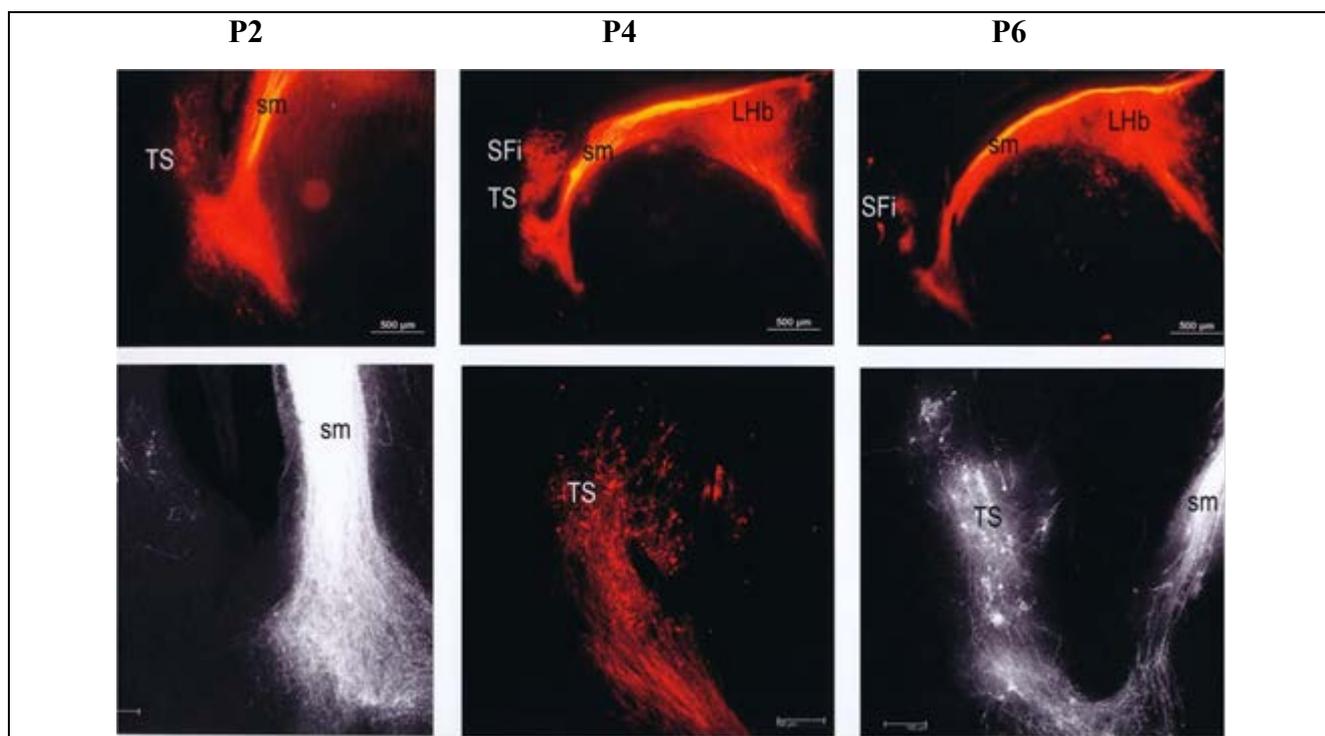


Рис. 22. Нанесение DiI на уздечку (LHb) на разных сроках постнатального развития выявляет меченые аксоны в медуллярной полоске (sm) которые прослеживаются на сагиттальных срезах мозга вплоть до задних ядер перегородки (верхний ряд). Нероны меченые DiI в септофимбриальном (SFi) и треугольном (TS) ядрах 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом задачи, поставленные в рамках темы, по всем разделам выполнены. Полученные данные и их анализ важны для дальнейшего развития данной тематики, посвященной исследованию регуляторного потенциала протеасом в функционировании беспозвоночных и ЦНС млекопитающих, роли протеасом в развитии рака прямой кишки, а также регуляторному взаимодействию иммунной и нейроэндокринной систем в развитии.

Представленная работа внесла существенный вклад в понимание неиммунных функций иммунных протеасом в нейронах головного мозга млекопитающих.

Отметим, что полученные результаты важны не только для фундаментальной науки, но имеют также большое практическое значение для медицинской практики. Так показано, что активность протеасом может служить потенциальным маркером, прогнозирующим эффективность неоадьювантной химиолучевой терапии при раке прямой кишки. Кроме того, обнаружено, что нарушения полового созревания у самок крыс могут быть связаны с повышенным содержанием провоспалительных цитокинов, вызванным пренатальным введением ЛПС, и как следствие, повышенным содержанием половых стероидов в препубертатный период. Проведение коррекции антагонистами половых стероидов возникших в эти периоды расстройств может обеспечить нормальное развитие репродуктивной системы самок.

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.

В ходе анализа полученных результатов по проведению комплексного исследования роли нервной системы в процессах развития, участия серотонина в реализации значимых адаптивных программ, а также роли формирующейся нервной системы в развитии организма, выявлены перспективные задачи для дальнейших исследований в рамках этой актуальной области современной биологии развития:

- продолжить исследование по определению консервативных клеточных и молекулярных механизмов, задействованных на самых ранних стадиях нейрогенеза, чтобы в ключевых пространственно-временных промежутках установить взаимодействие нервных и локомоторных элементов, на основе которых происходит формирование поведенческих паттернов у зародышей и взрослых животных.
- установить роль локальной моноаминергической системы, расположенной в определенных областях репродуктивной системы, в модуляции паттерна развития и формировании

поведения у потомков, выявить возможные естественные причины изменения уровня различных моноаминов в элементах этой системы.

Таким образом, работами 2017 года заполнен пробел в знаниях, касающихся экспрессии в раннем развитии земноводных компонентов дофаминергического механизма, во многих случаях действующего как функциональный антагонист серотонинергического механизма. Основные компоненты дофаминергического механизма в раннем развитии шпорцевых лягушек присутствуют, однако, в отличие от серотонинергического механизма, на ранних стадиях развития экспрессируется мРНК только одного типа дофаминовых рецепторов.

Работами по изучению оогенеза и фолликулогенеза мышей продемонстрирована определенная преемственность серотонинергического механизма между тканями генеративных органов и собственно овоцитами, которые, по крайней мере частично могут аккумулировать серотонин из межклеточной среды с участием специфического транспортера.

В 2018 году предполагается провести широкое систематическое изучение экспрессии компонентов различных сигнальных механизмов в эмбриогенезе основных объектов таких исследований – шпорцевых лягушек, морских ежей и млекопитающих. Предполагается продолжить изучение влияния трансммиттеров и их антагонистов на состояние активного и тубулинового цитоскелета морских ежей, а также уточнить представления о специфичности трансммиттерных механизмов в период делений дробления.

При наличии финансовых возможностей будут начаты иммунологические исследования экспрессии белков – трансммиттерных рецепторов.

Все результаты исследования, посвященного развитию гипоталамуса, уникальны и не описаны ранее в литературе. Они являются важным вкладом в фундаментальные представления о развитии проводящих систем мозга позвоночных животных.

Отчет утвержден Ученым советом 06 декабря 2017 г., протокол № 9

Публикации по теме за 2017 г.

1. A., Uroshlev L, Popova Y., Boyle R. D, Balaban P. M. Adaptive changes in the vestibular system of land snail to a 30-day spaceflight and readaptation on return to Earth // *Front. Cell. Neurosci.* 2017. 348. P 1-20. DOI: 10.3389/fncel.2017.00348. (WoS, Scopus)
2. Erokhov P.A., Lyupina Y.V., Radchenko A.S., Kolacheva A.A., Nikishina Y.O., Sharova N.P. Detection of active proteasome structures in brain extracts: Proteasome features of August rat brain with violations in monoamine metabolism // *Oncotarget.* 2017. V. 8. P. 70941–70957. DOI: 10.18632/oncotarget.20208. (WoS, Scopus)
3. Goncharov N.V., Alexander D. Nadeev A.D., Richard O. Jenkins R.O., Avdonin P.V. Markers and biomarkers of endothelium: when something is rotten in the state // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017. Article ID 9759735. 27 pages. DOI: 10.1155/2017/9759735 (WoS, Scopus)
4. Goncharov N.V., Belinskaia D.A., Shmurak V.I., Terpilowski M.A., Jenkins R.O., Avdonin P.V. Serum albumin binding and esterase activity: mechanistic interactions with organophosphates // *Molecules.* 2017. V. 22. P. 1201-1227. DOI: 10.3390/molecules22071201. (WoS, Scopus)
5. Korshunova T., Martynov A., Bakken T., Picton B. External diversity is restrained by internal conservatism: New nudibranch mollusc contributes to the cryptic species problem // *Zoologica Scripta.* 2017. V. 46. № 6. P. 683-692. DOI: 10.1111/zsc.12253. (WoS, Scopus)
6. Korshunova T., Martynov A., Picton B. Ontogeny as an important part of integrative taxonomy in Tergipedid aeolidaceans (Gastropoda: Nudibranchia) with a description of a new genus and species from the Barents Sea // *Zootaxa.* 2017. V. 4324. №1. P. 1-22. DOI: 10.11646/zootaxa.4324.1.1. (WoS, Scopus)
7. Korshunova T.A., Zimina O., Martynov A.V. Unique pleuroproctid taxa of the nudibranch family Aeolidiidae from the Atlantic and Pacific Oceans, with description of a new genus and species // *Journal of Molluscan Studies.* 2017. V. 83. P. 409-421. DOI: 10.1093/mollus/eyx036. (WoS, Scopus)
8. Korshunova T.A., Martynov A.V., Bakken T., Evertsen J., Fletcher K., Mudianta I.W., Saito H., Lundin K., Schrodler M., Picton B. Polyphyly of the traditional family Flabellinidae affects a major group of Nudibranchia: aeolidacean taxonomic reassessment with descriptions of several new families, genera, and species (Mollusca, Gastropoda) // *ZooKeys.* 2017. 717: 1-139. DOI: 10.3897/zookeys.717.2188. (WoS, Scopus)

9. Lapshin D.N., Vorontsov D.D. Frequency organization of the Johnston's organ in male mosquitoes (Diptera, Culicidae) // *Journal of Experimental Biology*. 2017. V. 220. P. 3927-3938. DOI: 10.1242/jeb.152017. (WoS, Scopus)
10. Martynov A., Hasegawa K., Korshunova T. The Japanese Red Data book marine mollusk *Japonacteon nipponensis* and a *Japonacteon* population from Russia belong to the same species: Molecular evidence and recommendations for conservation // *Global Ecology and Conservation*. 2017. V. 9. P. 82-89. DOI: 10.1016/j.gecco.2016.12.002. (Scopus)
11. Martynov A., Korshunova T. World's northernmost and rarely observed Nudibranchs: Three new Onchidoridid species (Gastropoda: Doridida) from Russian seas // *Zootaxa*. 2017. V. 4299. № 3. P. 391-404. DOI: 10.11646/zootaxa.4299.3.5. (WoS, Scopus)
12. Mironova G.Y., Avdonin P.P., Goncharov N.V., Jenkins R.O., Avdonin P.V. Inhibition of protein tyrosine phosphatases unmasks vasoconstriction and potentiates calcium signaling in rat aorta smooth muscle cells in response to an agonist of 5-HT_{2B} receptors BW723C86 // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017. V. 483. N 1. P. 700-705. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.079. (WoS, Scopus)
13. Nenasheva T., Nikolaev A., Diykanov D., Sukhanova A., Tcyganov E., Panteleev A., Bocharova I., Serdyuk Y., Nezlin L., Radaeva T., Adrianov N., Rubtsov Y., Lyadova I. The introduction of mesenchymal stromal cells induces different immunological responses in the lungs of healthy and *M. tuberculosis* infected mice // *PLoS ONE*. 2017. V. 12. No. 6. DOI: 10.1371/journal.pone.0178983. (WoS, Scopus)
14. Shmukler Y.B., Nikishin D.A. Ladder-shaped ion channel ligands: Current state of knowledge // *Marine Drugs*. 2017. V. 15. N 7. P. E232. DOI:10.3390/md15070232. (WoS, Scopus)
15. Vorontsov D.D., Dyakonova V.E. Light-dark decision making in snails: Do preceding light conditions matter? // *Commun Integr Biol*. 2017. Nov 3;10(5-6):e1356515. DOI: 10.1080/19420889.2017.1356515. eCollection 2017.)
16. Dyakonova V. The Puzzle of Behavioral Choice or How Organisms Channel Their Evolution: a Review of Rui Diogo's *Evolution Driven by Organismal Behavior: A Unifying View of Life, Function, Form, Mismatches, and Trends* // *Evolutionary Psychological Science*. 2017. DOI: 10.1007/s40806-017-0113-9. (Scopus)
17. Авдонин П.В., Надеев А.Д., Цитрин Е.Б., Цитрина А.А., Авдонин П.П., Миронова Г.Ю., Жарких И.Л., Гончаров Н.В. Участие двухпоровых каналов в вызываемом пероксидом водорода подъёме уровня ионов кальция в цитоплазме эндотелиальных клеток пупочной вены человека // *Доклады Академии наук*. 2017. Т. 474. № 4. С. 501-504. DOI: 10.7868/S0869565217040223. (РИНЦ) (Avdonin P.V., Nadeev A.D., Tsitirin E.B., Tsitrina A.A., Avdonin P.P., Mironova G.Y., Zharkikh I.L., Goncharov N.V. Involvement of two-pore channels

- in hydrogen peroxide-induced increase in the level of calcium ions in the cytoplasm of human umbilical vein endothelial cells // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017. V. 474. N 1. P. 209-212. DOI: 10.1134/S1607672917030152. (WoS, Scopus)
18. Авдонин П.В., Цитрина А.А., Миронова Г.Ю., Авдонин П.П., Жарких И.Л., Надеев А.Д., Гончаров Н.В. Пероксид водорода стимулирует экзоцитоз фактора Виллебранда эндотелиальными клетками пупочной вены человека // *Известия РАН. Серия биологическая*. 2017. № 5. С. 549-556. DOI: 10.7868/S0002332917050101. (РИНЦ) (Avdonin P.V., Tsitrina A.A., Mironova G.Y., Avdonin P.P., Zharkikh I.L., Nadeev A.D., Goncharov N.V. Hydrogen peroxide stimulates exocytosis of von Willebrand factor in human umbilical vein endothelial cells // *Biology Bulletin*. 2017. V. 44. N 5. P.531-537. DOI: 10.1134/S106235901705003X. (WoS, Scopus)
19. Белинская Д.А., Таборская К.И., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. Модуляция жирными кислотами сайтов взаимодействия альбумина с параоксоном: анализ методами молекулярного моделирования // *Биоорганическая химия*. 2017. Т. 43. № 4. С. 347-356. DOI: 10.7868/S0132342317030046 (РИНЦ). (Belinskaia D.A., Taborskaya K.I., Avdonin P.V., Goncharov N.V. Modulation of the albumin–paraoxon interaction sites by fatty acids: Analysis by the molecular modeling methods // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2017. V. 43. 4. P. 359-367. DOI: 10.1134/S1068162017030037. (WoS, Scopus)
20. Белинская Д.А., Шмурак В.И., Таборская К.И., Авдонин П.П., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. Сравнительный анализ *in silico* связывания параоксона сывороточным альбумином человека и быка // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2017. Т. 53. № 3. С. 170-177. (РИНЦ). (Belinskaya D.A., Shmurak V.I., Taborskaya K.I., Avdonin P.P., Avdonin P.V., Goncharov N.V. In silico analysis of paraoxon binding by human and bovine serum albumin // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2017. V.53. 3. P. 191-199. DOI: 10.1134/S0022093017030036. (WoS, Scopus)
21. Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Шмурак В.И., Белинская Д.А., Авдонин П.В. Сравнительный анализ эстеразной и параоксоназной активности различных видов альбумина // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2017. Т. 53, №. 4, С. 241—250 (РИНЦ) (Goncharov N.V., Terpilovskii M.A., Shmurak V.I., Belinskaya D.A., Avdonin P.V. Comparative analysis of esterase and paraoxonase activities of different serum albumin species // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2017. V. 53. 4. P.271-281. DOI: 10.1134/S0022093017040032. (WoS, Scopus)
22. Карпова Я.Д., Божок Г.А., Алабедалькарим Н.М., Люпина Ю.В., Астахова Т.М., Легач Е.И., Шарова Н.П. Протеасомы и трансплантология: современное состояние проблемы и поиск перспективных направлений // *Известия РАН. Серия биологическая*. 2017. № 3. С.

- 218-227. DOI: 10.7868/S0002332917030043. (РИНЦ). (Karpova Y.D., Bozhok G.A., Alabedal'karim N.M., Lyupina Y.V., Astakhova T.M., Legach E.I., Sharova N.P. Proteasomes and transplantology: Current state of the problem and the search for promising trends // *Biology Bulletin*. 2017. V. 44. 3. P. 237-244. DOI: 10.1134/S1062359017030049. (WoS, Scopus)
23. Незлин Л.П., Воронежская Е.Е. Ранние периферические сенсорные нейроны в развитии трохофорных животных // *Онтогенез*. 2017. Т. 48. № 2. С. 149-164. DOI: 10.7868/S0475145017020069. (РИНЦ). (Nezlin L.P., Voronezhskaya E.E. Early peripheral sensory neurons in the development of trochozoan animals // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2017. Т. 48. № 2. С. 130-143. DOI: 10.1134/S1062360417020060. (WoS, Scopus)
24. Суханова И.Ф., Кожевникова Л.М., Миронова Г.Ю., Авдонин П.В. Ингибитор белков Ерас ESI-09 устраняет тоническую фазу сокращения аорты крысы, вызванную эндогенными вазоконстрикторами // *Известия РАН. Серия биологическая*. 2017. № 2. С. 149-156. DOI: 10.7868/S0002332917020217. (РИНЦ). (Sukhanova I.F., Kozhevnikova L.M., Mironova G.Y., Avdonin P.V. The Eрас protein inhibitor ESI-09 eliminates the tonic phase of aorta contraction induced by endogenic vasoconstrictors in rats // *Biology Bulletin*. 2017. V. 44. 2. P. 179-186. DOI: 10.1134/S1062359017020200. (WoS, Scopus)
25. Таборская К.И., Белинская Д.А., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. Построение трехмерной модели молекулы крысиного альбумина методом гомологичного моделирования // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2017. Т. 53. № 5. С. 342-350. (РИНЦ) (Taborskaya K.I., Belinskaya D.A., Avdonin P.V., Goncharov N.V. Building a three-dimensional model of rat albumin molecule by homology modeling // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2017. V.53. N 5. P. 384-393 DOI: 10.1134/S0022093017050040. (WoS, Scopus)
26. Карпова Я.Д., Устиченко В.Д., Алабедалькарим Н.М., Степанова А.А., Люпина Ю.В., Богуславский К.И., Божок Г.А., Шарова Н.П. Изменение содержания иммунопротеасом и макрофагов в печени крыс при индукции донор-специфической толерантности // *Acta Naturae*. 2017. Т. 9. № 3 (34). С. 35-44. (РИНЦ). (Karpova Y.D., Ustichenko V.D., Alabedal'karim N.M., Stepanova A.A., Lyupina Y., Boguslavski K.I., Bozhok G.A., Sharova N.P. Change in the content of immunoproteasomes and macrophages in rat liver at the induction of donor-specific tolerance // *Acta Naturae*. 2017. V. 9. 3. P. 71-80. (WoS, Scopus)
27. Лифанцева Н. В., Конеева Ц. О., Воронежская Е. Е., Мельникова В. И.. Экспрессия компонентов серотонинергической системы в развивающемся тимусе крыс // *Доклады Академии наук (Биохимия, биофизика, молекулярная биология)*. 2017. Т. 477. № 6. С. 745-748. DOI: 10.7868/S0869565217360257.

28. Fofanova E.G., Mayorova T.D., Voronezhskaya E.E. Paradoxical effect of serotonin on ciliary locomotion of the adult archiannelid worms *Dinophilus gyrociliatus* and *D. taeniatus* (Annelida: Polychaeta) // *Invertebrate Zoology*, 2017, 14(2): 114–120. DOI: 10.15298/invertzool.14.2.03
29. Obukhova A.L., Khabarova M.Yu., Voronezhskaya E.E. Selective visualization of monoamine uptake and synthesis system in sea urchin larvae *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) // *Invertebrate Zoology*, 2017, 14(2): 162–166. DOI: 10.15298/invertzool.14.2.10
30. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.P., Zharkikh I.L., Avdonin P.V. Traumatic shock causes elevation of the serotonin 5-HT_{2B} receptor mRNA level in rat aorta // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2017. V. 11. 1. P. 82-86. DOI: 10.1134/S1990747816040140
31. Захарова Л.А. Отдаленные последствия перинатального стресса в функционировании иммунной и нейроэндокринной систем // *Медицинская иммунология*. 2017. Т.19. (Специальный выпуск). С. 284. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-0
32. Лифанцева Н.В., Конеева Ц.О., Воронова С.Н., Мельникова В.И. Дофамин как регулятор развития тимуса // *Медицинская иммунология*. 2017. Т.19. (Специальный выпуск). С. 43-44. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-0
33. Люпина Ю.В., Становова М.В., Ерохов П.А., Абатурова С.Б., Горностаев Н.Г., Михайлов В.С., Шарова Н.П. Роль протеасом и шаперонов в реактивности многоклеточных организмов при инфицировании вирусами и патогенами // *Медицинская иммунология*. 2017. Т. 19. Специальный выпуск. С. 44-45. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-0

Тезисы

1. Morozov A., Astakhova T., Garbuz D., Zatsepina O., Karpov V., Evgen'ev M. Reciprocal effects of Hsp70 on the activity of different proteasome forms: 20S proteasome degrades Hsp70 without ubiquitination // *FEBS Journal*. V. 284. Issue Supplement S1 P.299. FEBS Congress. 4-10 September 2017. Israel.
2. Морозов А.В., Астахова Т.М., Гарбуз Д.Г., Зацепина О.Г., Карпов В.Л., Евгеньев М.Б. Рекombинантный БТШ70 влияет на активность протеасом и разрушается 20S протеасомами по убиквитин-независимому пути // *Acta Naturae*. Спецвыпуск 2017. С. 61-62. Объединенный научный форум: Международная научная конференция по биоорганической химии «XII Чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды». 18-22 сентября 2017. Москва.
3. Дьяконова В.Е. Поведенческое состояние как результат формируемого организмом прогноза//VI Всероссийская конференция по поведению животных. Материалы

- конференции. 4декабря-7 деабря 2017 г.Москва. С. 45. Тов-во научных изданий КМК, 2017. ISBN 978-5-6040241-2-6
4. Султанахметов Г.С., Дьяконова В.Е. Влияние предшествующей моторной нагрузки на активность нейронов педального ганглия большого прудовика //VI Всероссийская конференция по поведению животных. Материалы конференции. 4декабря-7 деабря 2017 г.Москва. С. 154. Тов-во научных изданий КМК, 2017. ISBN 978-5-6040241-2-6).
 5. Захаров И.С., Богуславский Д.В. Влияние физической нагрузки на экспрессию генов в ЦНС большого прудовика *Lymnaea stagnalis* L. //VI Всероссийская конференция по поведению животных. Материалы конференции. 4декабря-7 деабря 2017 г.Москва. С. 54. Тов-во научных изданий КМК, 2017. ISBN 978-5-6040241-2-6)