



Форма направления реферативно-библиографических сведений
о результатах научно-исследовательской, опытно-конструкторской и
технологической работы

I. Сведения о НИОКТР

Номер государственного учета НИОКТР

Дата постановки НИОКТР на учет

AAAA-A19-119040290080-6	02/04/2019
-------------------------	------------

Наименование НИОКТР

Медиаторные, мембранные и внутриклеточные сигнальные факторы в развитии и реализации адаптационных программ

Руководитель НИОКТР

Фамилия, Инициалы

Ученая степень

Ученое звание

Шарова Н.П.	Доктор биологических наук	Не указано
-------------	---------------------------	------------

II. Сведения об отчете

Номер государственного учета отчета

Дата постановки отчета на учет

AAAA-B20-220032090129-4	20/03/2020
-------------------------	------------

Наименование отчета

МЕДИАТОРНЫЕ, МЕМБРАННЫЕ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ РАЗВИТИИ И РЕАЛИЗАЦИИ АДАПТАЦИОННЫХ ПРОГРАММ по Разделу № 50 «Биология развития и эволюции живых систем» Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг. (заключительный отчет)
--

Тематическая(-ие) рубрика(-и)

Индекс УДК

34.15.43; 34.15.51; 34.15.49; 34.43.29; 34.15.65	577.25
--	--------

Коды международной классификации отраслей наук

01.00.00

Дата утверждения отчета

27/12/2019

Кол-во книг (томов)

1

Общее кол-во страниц

81

Номера книг (томов)/Кол-во страниц

1/81	2/0	3/0	4/0	5/0	6/0	7/0	8/0	9/0	10/0	11/0	12/0	13/0	14/0	15/0	16/0	17/0	18/0	19/0	20/0
------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Приложений

0

Таблиц

3

Иллюстраций

27

Библиография

86

Публикаций по результатам НИОКТР

21

Фамилия, инициалы

Должность

СНИЛС

Подпись

Руководитель организации-исполнителя

Васильев А. В.

Директор

00133521977

Место для печати

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(ИБР РАН)

УДК 577.25

Рег. № ГЗ 0108-2019-0002

Рег. № НИОКТР АААА-А19-119040290080-6

УТВЕРЖДАЮ



Директор ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

А.В. Васильев

«27» декабря 2019 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МЕДИАТОРНЫЕ, МЕМБРАННЫЕ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ
ФАКТОРЫ В РАЗВИТИИ И РЕАЛИЗАЦИИ АДАПТАЦИОННЫХ ПРОГРАММ

по Разделу № 50 «Биология развития и эволюция живых систем»
Программы фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013-2020 гг.

(заключительный отчет)

Руководитель НИР,
заведующий лабораторией,
доктор биологических наук

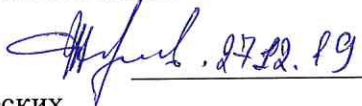
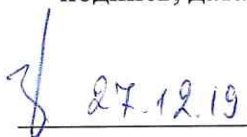
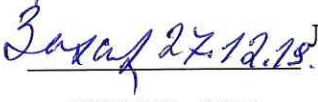

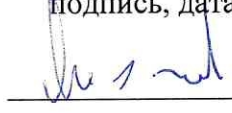
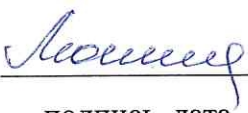


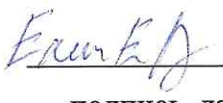
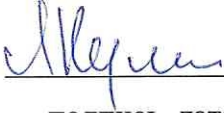

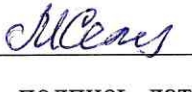

Н.П. Шарова

27.12.2019

подпись, дата

Москва 2019

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, заведующий лабораторией, доктор биологических наук	 27.12.19	Н.П. Шарова (раздел 1)
	подпись, дата	
Руководитель, главный научный сотрудник, доктор биологических наук	 27.12.19	И.С. Захаров (раздел 3)
	подпись, дата	
Исполнители:		
Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор	 27.12.19	Л.А. Захарова (раздел 1)
	подпись, дата	
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 27.12.19	Т.М. Астахова (раздел 1)
	подпись, дата	
Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор	 27.12.2019	В.С. Михайлов (раздел 2)
	подпись, дата	
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук	 27.12.19	Ю.В. Люпина (раздел 2)
	подпись, дата	
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор РАН	 27.12.19	В.Е. Дьяконова (раздел 3)
	подпись, дата	
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 27.12.19	О.В. Бойко (раздел 3)
	подпись, дата	
Главный научный сотрудник, доктор биологических наук	 27.12.19	Е.Е. Воронежская (раздел 4)
	подпись, дата	
Ведущий научный сотрудник доктор биологических наук	 27.12.19	Л.П. Незлин (раздел 4)
	подпись, дата	
Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор	 27.12.19	П.В. Авдонин (раздел 5)
	подпись, дата	
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 27.12.19	М.Н. Семенова (раздел 6)
	подпись, дата	
Нормоконтроль, ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук	 27.12.19	Е.Б. Абрамова
	подпись, дата	

РЕФЕРАТ

Отчет 81 с., 1 кн., 6 разделов, 27 рис., 3 табл., 86 источников, 21 публикация по теме ГЗ.

РАННИЙ ОНТОГЕНЕЗ, ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ ВЫБОР, МОРСКИЕ ГУБКИ, МОЛЛЮСКИ, МОРСКОЙ ЕЖ, ДАНИО, ЧЕШУЕКРЫЛЫЕ НАСЕКОМЫЕ, ГРЫЗУНЫ, ПОЛОВЫЕ ГОРМОНЫ, БИОГЕННЫЕ АМИНЫ, СЕРОТОНИЛИРОВАНИЕ, ПРОТЕАСОМЫ, КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ, ФАКТОР ВИЛЛЕБРАНДА, НЕЙРОЭНДОКРИННАЯ И ИММУННАЯ СИСТЕМЫ, ДОНОРСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ, РАЗВИТИЕ ОПУХОЛЕЙ.

Цель работы – исследование участия гормонов, трансммиттеров, отдельных форм протеасом и других факторов в раннем онтогенезе и развитии различных адаптивных и паталогических процессов у беспозвоночных и позвоночных (млекопитающих), поиск приложения результатов в медицинской практике.

Выявлена цитоморфологическая основа эпигенетической роли серотонина в процессе развития первично- и вторичноротых животных. Определена структура гена нейроглобина беломорской губки *H. Dujardini* и описаны ее особенности. Из клеток чешуекрылого насекомого выделены и охарактеризованы множественные формы 20S протеасомы.

Дальнейшее развитие получила оригинальная гипотеза о координирующей роли нейроактивного состава межклеточной среды, который социализирует индивидуальные нейроны и удерживает их в актуальном поведенческом контексте.

Получены новые результаты о взаиморегуляторном влиянии нейроэндокринной и иммунной систем в раннем развитии крысы. Установлены новые механизмы регуляции обмена ионов кальция в эндотелиальных и гладкомышечных клетках кровеносных сосудов. Сделано заключение о перспективности использования кальциевых каналов в качестве мишени для фармакологической коррекции нарушений нейроэндокринной регуляции тонуса кровеносных сосудов.

Выявлен субтип протеасом, «LMP2-PA28 $\alpha\beta$ », в аллотрансплантатах яичников и печени крыс, обеспечивающий приживание независимо от особенностей реципиентов. Этот результат важен для разработки новых технологий, направленных на увеличение экспрессии данного субтипа протеасом с целью повышения эффективности приживания трансплантата. Исследование протеасом рака прямой кишки человека показало, что активатор PA700 и химотрипсинподобная активность протеасом – перспективные мишени для терапии этого заболевания. На модели зародышей морского ежа обнаружены новые антимитотики, которые могут найти применение при разработке новых противоопухолевых лекарственных средств.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	8
РАЗДЕЛ 1 РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ ИНТЕГРИРУЮЩИХ СИСТЕМ В ОНТОГЕНЕЗЕ: РОЛЬ ПРОТЕАСОМ, ГОРМОНОВ И ШАПЕРОНОВ В АДАПТАЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ.....	8
Подраздел 1.1 Протеасомные механизмы развития иммунологической толерантности у млекопитающих с разным содержанием моноаминов в головном мозге.....	8
Подраздел 1.2 Регуляция развития нейроэндокринной и иммунной систем.....	17
Подраздел 1.3 Протеасомы в развитии злокачественных опухолей. Поиск приложения к медицинской практике.....	28
РАЗДЕЛ 2 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ С УЧАСТИЕМ ПРОТЕАСОМ И ШАПЕРОНОВ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ.....	32
Подраздел 2.1 Регуляция клеточных процессов с участием протеасом в воспалительном процессе у кольчатых червей.....	32
Подраздел 2.2 Регуляция протеома клеток насекомых при инфекции бакуловирусами.....	37
РАЗДЕЛ 3 МЕХАНИЗМЫ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ВЫБОРА И РАЗВИТИЯ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ.....	42
РАЗДЕЛ 4 НЕЙРОГУМОРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ И ФОРМИРОВАНИЯ АДАПТИВНЫХ ПРОГРАММ НА ПРИМЕРЕ ЛИЧИНОК ВОДНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И НИЗШИХ	58
РАЗДЕЛ 5 СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОГЕННЫХ АМИНОВ В КЛЕТКАХ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ.....	62
РАЗДЕЛ 6 МЕХАНИЗМЫ ХИМИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СТАБИЛИЗАЦИИ И ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ СТРУКТУР.....	67
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	74
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ.....	78

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода;
- БИПП – бензоимидазолилпиразолопиридиноны;
- ГКГ – главный комплекс гистосовместимости;
- ГМК – гладкомышечные клетки;
- ГРГ – гонадотропин-рилизинг гормон;
- ДО – Джонстоновы органы;
- ДСТ – донорспецифическая толерантность;
- ИЛ – интерлейкин;
- ЛИФ – лейкемия игибирующий фактор;
- ЛПС – липополисахарид;
- ПД 5, 14, 30 – постнатальные дни;
- ФНО – фактор некроза опухоли;
- ХТП – химотрипсинподобный;
- ЭД12, 18 – дни эмбрионального развития;
- ЭК – эндотелиальные клетки;
- ERK – extracellular signal-regulated kinase;
- FGF – fibroblast growth factor;
- FGFR – fibroblast growth factor receptor;
- 5-НТ – серотонин;
- МАРК – mitogen-activated protein kinase;
- ММП – matrix metalloproteinase, матриксная металлопротеиназа;
- NAADP – nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate;
- Ngb – нейроглобин;
- PI3K – phosphoinositide 3-kinase;
- РМС – primary mesenchyme cells; клетки первичной мезенхимы;
- Sf9 – линия клеток насекомого *Spodoptera frugiperda*;
- TGF β – transforming growth factor β ;
- TGF β R – transforming growth factor β receptor;
- TPC - two-pore channels, двупоровые каналы;
- VEGF – vascular endothelial growth factor;
- VEGFR – vascular endothelial growth factor receptor.

ВВЕДЕНИЕ

Значительный научный интерес представляет исследование роли гормонов, трансмиттеров, отдельных форм протеасом и других регуляторных факторов в раннем онтогенезе и развитии различных адаптивных и паталогических процессов у беспозвоночных и позвоночных (млекопитающих). Понимание этих вопросов важно не только для фундаментальной науки, но и для возможного применения в медицинской практике.

Одна из задач работы (Подраздел 1.1) – выявление субтипов протеасом, участвующих в развитии донорспецифической толерантности (ДСТ). Ранее мы показали, что у крыс Вистар и Август с разной генетической основой приживление гетеротопических аллотрансплантатов ткани яичников связано с увеличением числа моноклеарных клеток печени, экспрессирующих иммунные протеасомы с субъединицей LMP2, но не LMP7. Вместе с тем, остается неясным, существует зависимость экспрессии иммунных протеасом в аллотрансплантате от комбинаций пар «донор-реципиент» или не существует. В связи с различным влиянием активаторов протеасом на образование паттерна эпитопов при расщеплении аллоантигенов важно также иметь информацию об их экспрессии, как в печени, так и в аллотрансплантатах у разных пар «донор-реципиент».

Еще одна задача (Подраздел 1.2) связана с исследованием влияния гонадотропин-рилизинг гормона (ГРГ) на иммунную систему на разных этапах онтогенеза крысы и обратного влияния иммунной системы, активированной на ранних сроках беременности, на развитие репродуктивной системы потомства.

При нарушениях процессов онтогенеза млекопитающих и человека, связанных с несвойственным для нормальных клеток увеличением активности и экспрессии протеасом, зачастую развиваются злокачественные опухоли. В связи с этим была поставлена задача выявления наиболее существенных изменений в пуле протеасом такого значимого онкологического заболевания как рак прямой кишки с целью выбора перспективных мишеней для воздействия на данную опухоль (Подраздел 1.3).

Важным является изучение структуры регуляторных факторов, контролирующих качество протеома и обеспечивающих устойчивость клеток животных к неблагоприятным воздействиям внешней среды. Эти проблемы изучаются на модели морских беспозвоночных (губки) (Подраздел 2.1) и в клетках чешуекрылых насекомых (Подраздел 2.2).

Часть работы (Раздел 3) затрагивает различные аспекты развиваемой коллективом оригинальной гипотезы о координирующей роли нейроактивного состава межклеточной

среды, который социализирует индивидуальные нейроны и удерживает их в актуальном поведенческом контексте.

Раздел 4 посвящен исследованию внутриклеточных механизмов, обеспечивающих передачу серотонин-опосредованного эпигенетического сигнала на стадиях раннего развития модельных первичноротых (морские и пресноводные моллюски) и вторичноротых (морские ежи, костистая рыба).

В Разделе 5 изучается роль активных форм кислорода в реализации физиологического действия биогенных аминов в кровеносных сосудах и механизмы регуляции обмена ионов кальция в гладкомышечных клетках сосудов и роли в этом процессе кальциевых каналов.

Раздел 6 связан с успешным применением метода фенотипического скрининга на модели зародышей морского ежа для поиска новых веществ – ингибиторов клеточного деления, механизм действия которых обусловлен дестабилизацией микротрубочек. Этот метод дает высокопроизводимые результаты, сопоставимые с данными по цитотоксичности на культурах опухолевых клеток.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

РАЗДЕЛ 1 РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ ИНТЕГРИРУЮЩИХ СИСТЕМ В ОНТОГЕНЕЗЕ: РОЛЬ ПРОТЕАСОМ, ГОРМОНОВ И ШАПЕРОНОВ В АДАПТАЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ

Подраздел 1.1 Протеасомные механизмы развития иммунологической толерантности у млекопитающих с разным содержанием моноаминов в головном мозге

1.1.1 Введение

Ранее мы обнаружили, что индукция донорспецифической толерантности (ДСТ) у крыс линии Август путем введения в воротную вену клеток селезенки доноров-крыс Вистар увеличивает эффективность приживления аллотрансплантатов ткани яичников и активирует экспрессию иммунных протеасом с субъединицей LMP2 в печени и ткани яичников к 30 сут после трансплантации [1]. Кроме того, изучено влияние генетически детерминированных донор-реципиентных различий на экспрессию иммунных протеасом в клетках печени крыс-реципиентов и выявлено два важных факта. Во-первых, как у крыс Вистар, так и у крыс Август приживление гетеротопических аллотрансплантатов ткани яичников связано с увеличением числа мононуклеарных клеток печени, экспрессирующих иммунные протеасомы с субъединицей LMP2, но не LMP7. Во-вторых, у реципиентов-крыс Вистар эта разница более выражена, чем у реципиентов-крыс Август [2], что можно объяснить повышенным содержанием моноаминов и белка теплового шока 70 в головном мозге крыс Август [3]. Поскольку клетки печени обеспечивают развитие толерантности к чужеродным антигенам [4], неслучайно влияние различных факторов на этот процесс. Вместе с тем, остается неясным, существует зависимость экспрессии иммунных протеасом в аллотрансплантате от комбинаций пар «донор-реципиент» или не существует. В связи с различным влиянием активаторов протеасом на образование паттерна эпитопов при расщеплении аллоантигенов важно также иметь информацию об их экспрессии, как в печени, так и в аллотрансплантатах у разных пар «донор-реципиент».

Цель настоящей работы – исследовать динамику приживления ткани яичников крыс инбредной линии Август, трансплантированной аутобредным крысам Вистар, и, наоборот, на фоне индукции ДСТ, и выявить особенности пулов протеасом, включая экспрессию активаторов, в печени, прижившихся трансплантатах и ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты, у животных обеих групп.

1.1.2 Материалы и методы

Трансплантацию проводили 5-6-месячным самкам крыс инбредной линии Август (RT1^c) и аутбредной линии Вистар (RT1^u) в двух вариантах пар донор-реципиент (доноры – крысы Август, реципиенты – крысы Вистар и наоборот). Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с положениями «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых с экспериментальной и иной научной целью» (Страсбург, 1986) и Биоэтической комиссии ИБР РАН. Индукцию ДСТ проводили, как описано ранее [1]. Трансплантацию яичников неонатальных крыс (1-5 сутки после рождения) под капсулу почки осуществляли в соответствии с опубликованным протоколом [1], за исключением того, что у крыс-реципиентов не удаляли яичники с целью гормонального воздействия на трансплантат. Ткань яичников исследовали на 7, 14, 30 и 37 сут после трансплантации, печень – на 37 сут после трансплантации (по 5 животных для каждой точки).

Для морфологической диагностики отторжения/приживления из ткани трансплантатов, собранной на разных сроках после операции, готовили криостатные срезы и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Площадь сохранившейся ткани яичника оценивали в 7-8 серийных срезах трансплантатов, полученных от каждого животного, с помощью программы AxioVision Rel. 4.8. Результат нормировали на общую площадь трансплантата и выражали в процентах.

Для иммуногистохимии и Вестерн-блоттинга использовали моноклональные антитела мыши к субъединицам $\alpha 1,2,3,5,6,7$ протеасом, иммунным субъединицам LMP2 и LMP7 протеасом, субъединице Rpt6 активатора PA700 протеасом, поликлональные антитела кролика к субъединице PA28 α активатора PA28 $\alpha\beta$ протеасом (Enzo Life Sciences, США), моноклональные антитела мыши к β актину (Santa Cruz Biotechnology, США), антитела осла к IgG мыши, меченные Alexa 594 (Invitrogen, США), антитела козы к IgG мыши и кролика, конъюгированные с пероксидазой (Amersham Biosciences, Великобритания). Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (BD Bioscience, США) с использованием программного обеспечения CellQuestPro.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 7.0. Значимость различий между выборками оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Приживление трансплантатов анализировали с помощью метода Каплана-Майера, сравнение кривых приживления производили с использованием логарифмического рангового критерия.

1.1.3 Результаты и обсуждение

Приживление аллотрансплантатов яичников. Незначительная разница в приживлении аллотрансплантатов яичников при их гетеротопической пересадке под капсулу почки крысам Вистар и Август на фоне индукции ДСТ выявлена на 14 сут после операции (рисунок 1.1, *а*). Эта разница увеличивалась к 30 сут, а на 37 сут доля аллотрансплантатов ткани яичников с хорошо сохранившейся структурой и значительной васкуляризацией у крыс Вистар в 2,6 раз превышала таковую у крыс Август. Обнаруженный факт, очевидно, связан с особым состоянием центральной нервной системы крыс Август, обусловленным повышенным содержанием моноаминов и белка теплового шока 70 [3]. Следует отметить, что при гетеротопической пересадке ткани яичников под капсулу почки в отсутствие индукции ДСТ происходит ее отторжение и полное замещение соединительной тканью вследствие развития иммунного ответа на 22–25 сут после операции у 100% реципиентов [5].

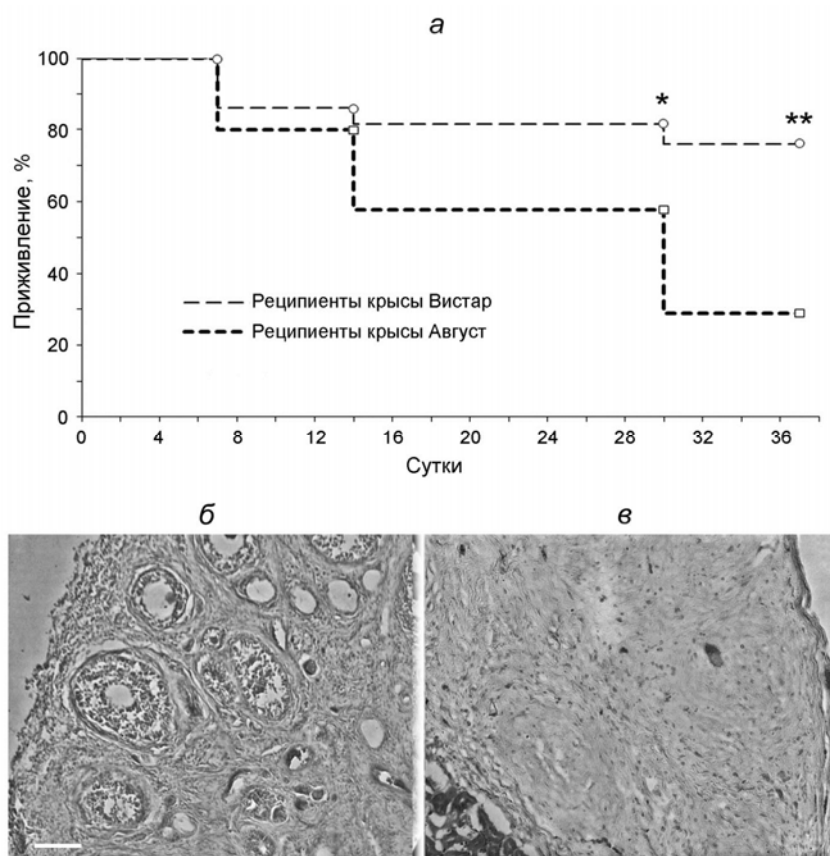


Рисунок 1.1 - Приживление гетеротопических аллотрансплантатов яичников у крыс Вистар и Август после индукции донорспецифической толерантности (*а*). Кривые приживления, представленные для двух комбинаций пар «донор-реципиент». Отличие от приживления трансплантата в тот же период у крыс Август при $*p < 0,05$, $**p < 0,01$. Гистологические препараты аллотрансплантата яичника (*б*) и ткани, замещающей отторгнутый трансплантат (*в*), на 37 сут после трансплантации крысам Вистар. Шкала, 50 мкм.

Прижившиеся трансплантаты на фоне индукции ДСТ у обеих групп реципиентов на 37 сут содержали фолликулы различных стадий зрелости, а также небольшие очаги лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации и незначительные участки формирования соединительной ткани (рисунок 1.1, б). Образцы ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты яичников у животных обеих групп, представляли собой преимущественно рыхлую волокнистую соединительную ткань (рисунок 1.1, в). Фолликулы в этих образцах не обнаруживались, однако выявлялись обширные зоны лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации в толще ткани и на границе с паренхимой почки. В дальнейших экспериментах использовали собранные на 37 сут образцы трансплантатов с целью выявления возможных различий в протеасомных механизмах, обеспечивающих приживание или отторжение ткани яичников у крыс Вистар и Август.

Экспрессия иммунных субъединиц протеасом в трансплантатах. Общий уровень протеасом оценивали Вестерн-блоттингом по экспрессии субъединиц $\alpha 1,2,3,5,6,7$, входящих в состав всех форм протеасом. К 37 сут после трансплантации общий уровень протеасом был одинаков в интактной донорской ткани яичников, прижившихся трансплантатах и ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты, и не зависел от донор-реципиентных различий (рисунок 1.2, а).

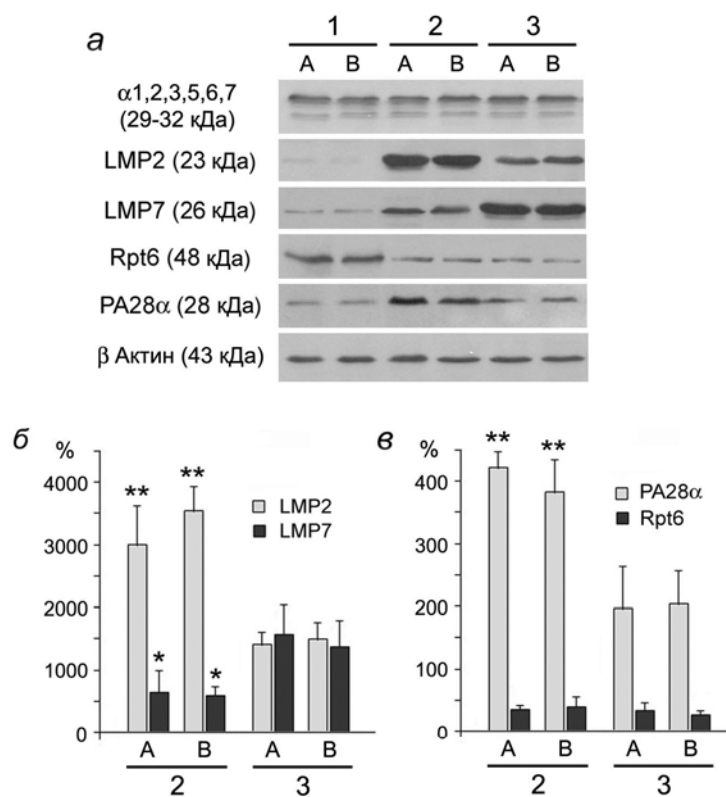


Рисунок 1.2 - Содержание субъединиц протеасом в интактной донорской ткани яичников (1), прижившихся гетеротопических аллотрансплантатах яичников (2) и ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты, на 37-е сут после трансплантации (3). А – крысы Август реципиенты, В – крысы Вистар реципиенты. (а) Вестерн блоты с

использованием соответствующих антител, (б, в) – относительное содержание субъединиц протеасом в прижившихся аллотрансплантатах и замещающей ткани по отношению к интактной донорской ткани яичников. Данные нормализованы на содержание β актина и представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Отличие от соответствующего значения у крыс с отторгнутыми трансплантатами при $*p < 0,01$ и $**p < 0,005$.

Однако картина экспрессии иммунных протеасом в этих тканях была иной. Отметим низкий базовый уровень иммунных протеасом в интактной донорской ткани яичников. Это касается как субтипов, содержащих иммунную субъединицу LMP7, так и субтипов, содержащих иммунную субъединицу LMP2 (рисунок 1.2, а), а, следовательно, и субтипов с иммунной субъединицей LMP10 (MECL-1), встраивающейся во вновь образующиеся протеасомы, главным образом, в связке с субъединицей LMP2 [6]. Низкое содержание иммунных протеасом в железистой ткани объяснимо, так как в норме ее функции не связаны с развитием иммунных реакций. Вместе с тем, в прижившихся трансплантатах и замещающей ткани обнаружена увеличенная экспрессия иммунных протеасом по сравнению с интактной донорской тканью яичников (рисунок 1.2, а, б). При этом прижившиеся трансплантаты были обогащены протеасомами с иммунной субъединицей LMP2, а замещающая ткань – протеасомами с иммунной субъединицей LMP7 в равной степени у крыс Август и Вистар.

С помощью иммунофлуоресцентного анализа в прижившемся трансплантате у крыс Август и Вистар обнаружены протеасомы с иммунной субъединицей LMP2 в фолликулах и клетках стромы ткани яичников, а также в единичных клетках, локализующихся возле сосудов и, возможно, представляющих собой макрофаги (рисунок 1.3, а). При этом протеасомы с субъединицей LMP7 выявлялись по всей площади трансплантата гораздо слабее (рисунок 1.3, б). В замещающей ткани у крыс обеих групп обнаружены обширные очаги лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации, обогащенные иммунными протеасомами с субъединицей LMP7. Менее выраженная экспрессия протеасом с субъединицей LMP2 обнаружена также в очагах инфильтрации в ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты, у крыс Август и Вистар. Данные представлены для реципиентов-крыс Вистар (рисунок 1.3, в, г). В интактной ткани яичников доноров иммунная субъединица LMP2 практически не выявлялась (рисунок 1.3, д). Вместе с тем, в мозговом слое присутствовали единичные клетки, экспрессирующие протеасомы с иммунной субъединицей LMP7 (рисунок 1.3, е). Они расположены, в основном, в строме яичника рядом с кровеносными сосудами. В кортикальном слое яичников LMP7-позитивные клетки практически отсутствовали. Экспрессия протеасом с субъединицей LMP7 в строме интактной ткани яичников, связана, вероятнее всего, с

тканевыми макрофагами, которые осуществляют регуляторную связь между иммунной и репродуктивной системами, а также участвуют в процессах ремоделирования ткани в фазах созревания фолликула, овуляции и образования желтого тела [7]. В целом, результаты, полученные с помощью метода иммуногистохимии, совпадают с результатами Вестерн-блоттинга по интенсивности экспрессии иммунных субъединиц протеасом [8].

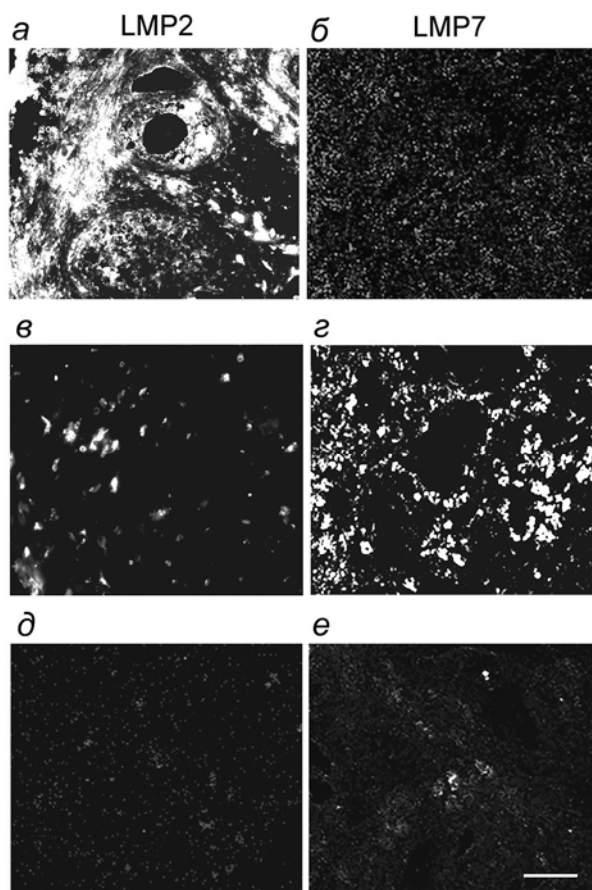


Рисунок 1.3 - Иммунофлуоресцентное мечение клеток на срезах прижившихся гетеротопических аллотрансплантатов яичников (*а, б*), ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты (*в, г*), и интактной донорской ткани яичников (*д, е*) антителами к субъединицам LMP2 (*а, в, д*) и LMP7 (*б, г, е*). Шкала, 50 мкм. Доноры – крысы Август, реципиенты – крысы Вистар.

Инфильтрация клеток иммунной системы, обогащенных иммунными протеасомами, в ткань трансплантата при его отторжении объясняется классическим протеканием иммунных процессов, направленных на уничтожение чужеродных клеток. Ведущая роль в этом процессе, очевидно, принадлежит субтипу протеасом с иммунной субъединицей LMP7, которая важна не только для образования антигенных эпитопов, но и для контролирования пролиферации Т-лимфоцитов [9].

Однако высокая экспрессия протеасом с иммунной субъединицей LMP2, присущая клеткам прижившейся ткани яичников, не может быть связана с образованием антигенных

эпитопов для представления клеток-мишеней цитотоксическим Т-лимфоцитам. В данном случае функции субтипа протеасом с субъединицей LMP2 не соответствуют сложившимся представлениям об иммунных протеасомах как участниках иммунных процессов против чужеродной ткани. Напротив, этот субтип иммунных протеасом, по-видимому, образует пептиды, функции которых направлены на поддержание жизнеспособности фолликулов чужеродных яичников. Активация экспрессии субъединицы LMP2, возможно, осуществляется под действием комплекса сигналов от макрофагов печени, где при индукции ДСТ происходит «первая встреча» чужеродных антигенов донора с организмом реципиента.

Экспрессия активаторов протеасом в трансплантатах. В донорской интактной ткани яичников крыс Август и Вистар выявлены субъединицы Rpt6 и PA28 α , входящие в состав активаторов PA700 и PA28 $\alpha\beta$ протеасом соответственно (рисунок 1.2, а). В прижившихся трансплантатах яичников и ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты, у крыс обеих групп экспрессия субъединицы Rpt6, а, следовательно, активатора PA700 была снижена, в то время как экспрессия субъединицы PA28 α и, следовательно, активатора PA28 $\alpha\beta$ была значительно повышена по сравнению с донорской тканью (рисунок 1.2, а, в). Прижившиеся трансплантаты у крыс Август и Вистар отличались самым высоким содержанием активатора PA28 $\alpha\beta$.

Очевидно, рутинное расщепление убиквитинированных белков комплексом конститутивных протеасом и активатора PA700, свойственное интактной ткани яичников, отступает на второстепенный план в активном процессе ее приживления. Главная роль в этом процессе, по-видимому, принадлежит биологически активным пептидам, образующимся иммунными протеасомами с субъединицей LMP2 в связке с активатором PA28 $\alpha\beta$. В пользу данного предположения служит факт преимущественного «нарезания» пептидов малой длины (менее 8 аминокислотных остатков) под действием активатора PA28 $\alpha\beta$ по сравнению с активатором PA700 [10]. Функция образующихся в трансплантате пептидов может быть связана с их участием в межклеточных взаимодействиях, обеспечивающих приживление.

Экспрессия иммунных субъединиц и активаторов протеасом в печени. В печени крыс с прижившимися трансплантатами содержание субъединицы LMP2 значительно выше, в то время как у крыс с отторгнутыми трансплантатами ниже, чем у контрольных ложно-оперированных животных (рисунок 1.4, таблица 1.1) [11]. Эта разница более выражена у крыс Вистар. Содержание субъединицы LMP7 в печени не различалось между разными группами животных. Уровень активатора PA28 $\alpha\beta$ увеличивался, а уровень

активатора PA700 уменьшался в печени крыс Август и Вистар с прижившимися трансплантатами по сравнению с контролем. Таким образом, протеасомы с субъединицей LMP2 и активатором PA28 α β в печени так же, как и в трансплантате, связаны с развитием ДСТ и приживлением трансплантируемой ткани.

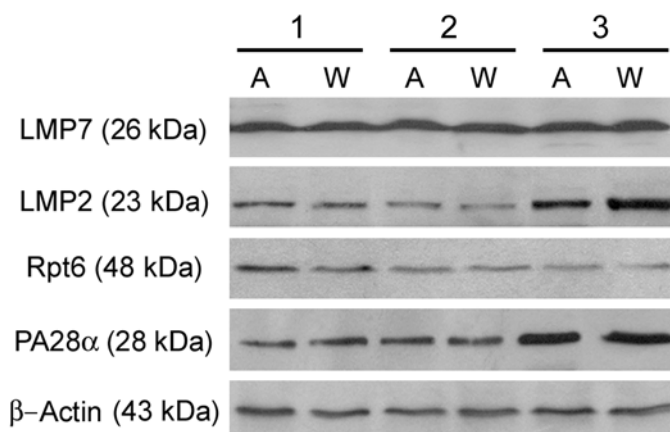


Рисунок 1.4 - Вестерн-блоты субъединиц и активаторов протеасом печени контрольных (ложнооперированных) крыс (1), крыс с отторгнутым (2) и прижившимся аллотрансплантатом ткани яичника (3). А – крысы Август, W – крысы Вистар.

Таблица 1.1 - Содержание субъединиц протеасом и активаторов в печени крыс с отторгнутой или прижившейся тканью яичников на 37 день после трансплантации

Субъединицы	Содержание субъединиц, нормализованное на β -актин, % от контроля			
	Крысы с отторгнутыми трансплантатами		Крысы с прижившимися трансплантатами	
	Крысы Август	Крысы Вистар	Крысы Август	Крысы Вистар
LMP7	96 \pm 15	104 \pm 21	112 \pm 31	102 \pm 25
LMP2	72 \pm 10*	58 \pm 13*	159 \pm 27*	305 \pm 52*
Rpt6	64 \pm 20	70 \pm 19	42 \pm 12*	50 \pm 14*
PA28 α	106 \pm 19	95 \pm 23	235 \pm 34*	259 \pm 41*

Приведено стандартное отклонение; *отличие от контроля при $p < 0.05$.

1.1.4 Заключение

В настоящей работе впервые проанализированы пулы протеасом (включая активаторы протеасом) прижившихся аллотрансплантатов яичников и ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты, а также пулы протеасом печени крыс с прижившимися и отторгнутыми аллотрансплантатами на фоне индукции ДСТ в зависимости от генетически детерминированных различий в организации адаптационных реакций организма крыс-реципиентов [8, 11]. Выявлено, что протеасомы аллотрансплантатов яичников и печени,

содержащие иммунную субъединицу LMP2 и связанные с активатором PA28 $\alpha\beta$, служат одним из ключевых факторов, которые обеспечивают приживление независимо от особенностей реципиентов. Механизм действия данного субтипа протеасом, по-видимому, заключается в образовании особых пептидов в клетках трансплантата и клетках синусоидов печени. Скорее всего, эти пептиды без участия молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) класса I выделяются в межклеточное пространство и при взаимодействии с цитотоксическими лимфоцитами тормозят их активность.

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты вносят вклад в понимание молекулярных механизмов развития толерантности к «чужому» у животных с различной генетической основой и указывают на неизвестную ранее функцию иммунных протеасом с субъединицей LMP2 и активатором PA28 $\alpha\beta$ в этом процессе. Полученные данные важны для разработки новых технологий в трансплантологии, направленных на увеличение экспрессии протеасом «LMP2-PA28 $\alpha\beta$ » для повышения эффективности приживления трансплантата.

1.1.5 Список использованных источников

1 Карпова Я.Д., Божок Г.А., Люпина Ю.В., Легач Е.И., Астахова Т.М., Степанова А.А., Бондаренко Т.П., Шарова Н.П. Изменение функции протеасом после индукции донор-специфической толерантности у крыс при аллотрансплантации ткани яичника//Известия РАН. Серия биологическая. - 2012. - N 3. - С. 296 - 302.

2 Карпова Я.Д., Люпина Ю.В., Алабедаькарим Н.М., Легач Е.И., Божок Г.А., Шарова Н.П. Изменение содержания мононуклеарных клеток печени, экспрессирующих иммунные протеасомы, при трансплантации ткани яичников в зависимости от донор-реципиентных различий у крыс//Бюлл. Эксп. Биол. Мед. - 2018. - N 6. - С. 732 - 736.

3 Erokhov P.A., Lyupina Yu.V., Radchenko A.S., Kolacheva A.A., Nikishina Yu.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. - Vol. 8. - P. 70941–70957.

4 Карпова Я.Д., Божок Г.А., Алабедаькарим 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. Сер. Биол. - 2017. - N 3. - С. 218 - 227.

5 Божок Г.А., Киروشка В.В., Тищенко Ю.О., Легач Е.И. Предтрансплантационное введение донорских лимфоцитов пролонгирует выживаемость аллогенной ткани яичников

у овариэктомированных животных-реципиентов//Проблеми ендокринної патології. - 2009. - N 4. - С. 79 - 84.

6 Groettrup M., Standera S., Stohwasser R., Kloetzel P.-M. The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -1997. - Vol. 94. - P. 8970 - 8975.

7 Wu R., Van der Hoek K.H., Ryan N.K., Norman R.J., Robker R.L. Macrophage contributions to ovarian function//Hum. Reprod. Update. - 2004. - Vol. 10. - N 2. - P. 119 - 133.

8 Астахова Т.М., Божок Г.А., Алабедалькарим Н.М., Карпова Я.Д., Люпина Ю.В., Ушакова Е.М., Легач Е.И., Бондаренко Т.П., Шарова Н.П. Экспрессия протеасом в гетеротопических аллотрансплантатах яичников крыс Вистар и Август при индукции донорспецифической толерантности//Онтогенез. - 2019. - Т. 50. - N 5. - С. 332- 339. DOI: 10.1134/S0475145019050021. Англ.: Astakhova T.M., Bozhok G.A., Alabedal'karim N.M., Karpova Ya.D., Lyupina Yu.V., Ushakova E.M., Legach E.I., Bondarenko T.P., Sharova N.P. Proteasome expression in ovarian heterotopic allografts of Wistar and August rats under induction of donor specific tolerance//Russian Journal of Developmental Biology. - 2019. - Vol. 50. - N. 5. - P. 261 - 267. DOI: 10.1134/S1062360419050023.

9 Caudill C., Jayarapu K., Elenich L., Monaco J., Colbert R., Griffin T. T cells lacking immunoproteasome subunits MECL-1 and LMP7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens//J. Immunol. - 2006. - Vol. 176. - P. 4075 - 4082.

10 Cascio P. PA28 $\alpha\beta$: The Enigmatic Magic Ring of the Proteasome?//Biomolecules. - 2014. - Vol. 4. - P. 566 - 584.

11 Astakhova T.M., Karpova Ya.D., Bozhok G.A., Alabedal'karim N.M., Lyupina Yu.V., Legach E.I., Sharova N.P. Proteasome mechanisms of the development of tolerance to allograft in Wistar and August rats with different content of monoamines in the brain//Medical Academic Journal. Supplement. - 2019. - P. 39 - 43. <https://doi.org/10.17816/MAJ191S139-41>.

Подраздел 1.2 Регуляция развития нейроэндокринной и иммунной систем

1.2.1 Введение

Различные стрессогенные факторы, включая вирусную и бактериальную инфекции, или изменения физиологических концентраций нейрогормонов и цитокинов в раннем онтогенезе, могут оказывать негативное влияние на молекулярные механизмы, контролирующие развитие нейроэндокринной и иммунной систем. Изменения их программирования служат основой возникновения у потомства различных

патологических состояний [12-13]. Под действием иммунологического стресса, индуцированного бактериальным инфицированием или введением основного компонента бактерий липополисахарида (ЛПС) на ранних сроках беременности, активируется иммунная система матери, следствием чего является усиление синтеза и секреции провоспалительных цитокинов у матери и плодов. Их содержание выше физиологической нормы приводит к преждевременным родам, различным костным аномалиям, атрофии тимуса, нарушениям развития мозга [13-14]. Однако исследования о влиянии воспаления на развитие и функционирование репродуктивной системы плода единичны, а данные о возможной коррекции нарушений в репродуктивной системе в раннем онтогенезе отсутствуют.

Иммунная система, в свою очередь, служит мишенью для действия не только цитокинов, но и нейрогормонов. В раннем развитии нейрогормоны начинают синтезироваться в тканях плода задолго до формирования нервной передачи и обнаруживаются в высоких концентрациях в общей циркуляции крови. Это предполагает их участие в регуляции развития различных органов и тканей, в том числе и органов иммунной системы. Важной сигнальной молекулой во взаимодействиях нейроэндокринной и иммунной систем является нейропептид гипоталамуса гонадотропин-рилизинг гормон (ГРГ), основная функция которого связана с регуляцией секреции половых гормонов [15]. Известно также, что в постнатальный период ГРГ участвует в модуляции функций иммунной системы [16]. Однако данные о его роли в процессах развития иммунной системы немногочисленны.

1.2.2 Материалы и методы

Исследования были направлены на выявление механизмов регуляции процессов развития репродуктивной системы у самцов крыс при системном воспалении, вызванном ЛПС (*E.coli*) на ранних сроках беременности, с одной стороны, и влияния ГРГ на формирование центрального органа иммунной системы тимуса у плодов крыс в нормальных физиологических условиях, с другой.

В экспериментах были использованы крысы Wistar с датированной беременностью (4 самки). ЛПС (50 мкг/кг веса) вводили внутрибрюшинно самкам крыс на 12 день эмбрионального развития (ЭД12). Потомству самцов (n=10) в период повышенного содержания эстрадиола с 5 по 14 дни постнатального (ПД) развития [17] вводили подкожно антагонист эстрадиола фульвестрант (1,5 мг/кг) в 0,1 мл кунжутного масла, используемом в качестве растворителя. Контрольным группам в те же сроки вводили кунжутное масло. Дозы препарата были выбраны согласно данным литературы [18].

Эффекты антагониста оценивали у половозрелых животных на ПД80 по содержанию в крови половых гормонов.

Была проведена оценка влияния ГРГ на секрецию цитокинов в развивающемся тимусе в налаженной нами модели органотипической культуры тимуса крыс. Тимусы, выделенные из 17-дневных плодов инкубировали в течение 24 ч в среде RPMI в присутствии ГРГ 10^{-7} М. Концентрацию цитокинов в культуральной среде определяли методом проточной цитометрии с помощью цитометрических бус (Cytometric Bead Array - CBA) и антител к этим цитокинам, согласно рекомендации фирмы производителя (BD Biosciences, США), с использованием программного обеспечения CellQuestPro и CBA. Предел выявления цитокинов составлял 40 пг/мл.

Влияние ГРГ на дифференцировку Т-лимфоцитов в развивающемся тимусе оценивали в органотипической культуре тимусов, выделенных на ЭД18. Тимус культивировали в течение 5 суток с 10^{-7} М ГРГ. Культуральную среду меняли ежедневно. На 5-ый день получали суспензию клеток тимоцитов, которые инкубировали в течение 1 часа с FITC-конъюгированными антителами к поверхностным антигенам CD4 и CD8 субпопуляций Т-лимфоцитов. Процентное содержание различных субпопуляций анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton-Dickinson, USA).

Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с положениями «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых с экспериментальной и иной научной целью» (Страсбург, 1986) и апробированных комиссией по биоэтике института биологии развития. Статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического двустороннего критерия Манна-Уитни (U-тест).

1.2.3 Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что пренатальный иммунологический стресс, индуцированный ЛПС, приводит к повышенному содержанию эстрадиола у потомства самцов крыс на ПД5-ПД14 [17]. В настоящей работе нами было исследовано влияние эстрадиола и его антагониста фульвестранта на развитие репродуктивной системы потомства самцов, матери которых подвергались воздействию ЛПС. Была проведена оценка массы тела и гонад, структура и морфология гонад, а также их функциональная активность [19].

Масса тела у потомства самцов во всех изученных группах увеличивалась с ПД5 до ПД80 (рисунок 1.5). На ПД5 масса тела не изменялась после пренатального воздействия

ЛПС и была снижена на ПД14 и ПД30 по сравнению с контролем. На ПД80 масса тела всех групп составляла 250-300 г. Масса тела увеличилась под действием антагониста эстрадиола фульвестранта с ПД14 до ПД30 по сравнению с животными, получавшими ЛПС. Однако она оставалась статистически более низкой по сравнению с контролем на ПД14 и ПД30.

Согласно данным литературы, снижение массы тела, а также потребление пищи и воды у потомства самцов после пренатального воздействия ЛПС могут регулироваться провоспалительными цитокинами и глюкокортикоидами, уровень которых повышается в период беременности [20]. Кроме того, жировой обмен в жировой ткани и потребление пищи у самцов и самок могут регулироваться половыми стероидами [21]. Мы наблюдали относительный прирост массы тела у самцов, когда повышенное содержание эстрадиола было заблокировано селективным антагонистом (рисунок 1.5).

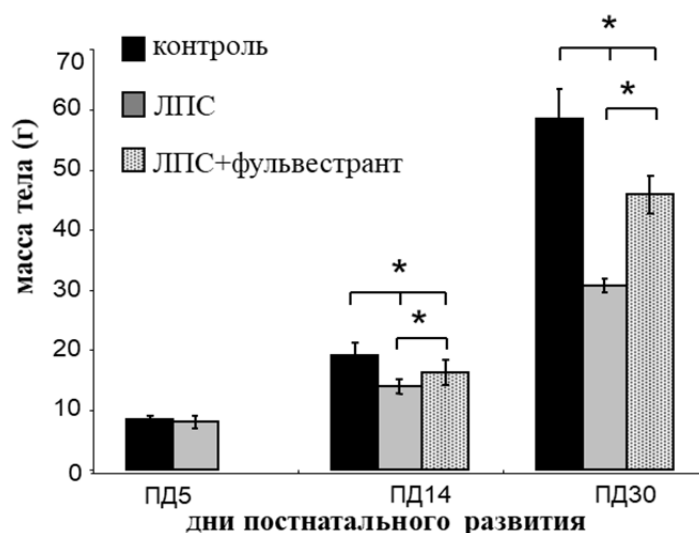


Рисунок 1.5 - Влияние пренатального воздействия ЛПС (50 мкг/кг, в/б на ЭД12) и постнатального воздействия антагониста фульвестранта (1,5 мг/кг в кунжутном масле, ежедневно с ПД5 по ПД14) на массу тела потомства самцов (n = 10 на группу). Данные выражены как $M \pm SEM$; Статистический анализ: односторонний ANOVA: * $p < 0,01$ между группами в одном возрасте.

После пренатального воздействия ЛПС у половозрелых самцов была снижена масса гонад (рисунок 1.6 а) и уменьшен диаметр семенных канальцев (рисунок 1.6 б) по сравнению с контролем. Под действием антагониста масса гонад и диаметр канальцев увеличивались и достигали уровня контроля. При анализе гистологических срезов в контрольной группе животных наблюдалась нормальная форма семенных канальцев на разных стадиях сперматогенеза. Зародышевые клетки были организованы в

концентрических слоях, и тубулярный просвет обычно был пуст (рисунок 1.6 в). Семенные каналцы в семенниках самцов, обработанных ЛПС, не имели просвета, он был полностью заполнен клеточными обрывками. Наблюдались также деградированные семенные каналцы (рисунок 1.6 г). Зародышевые клетки были организованы, но многие семенные каналцы содержали только сперматогонии и сперматоциты и не содержали зрелых сперматозоидов. В некоторых семенных каналцах сперматиды сохранялись в сперматогониальном эпителии. Наблюдались вакуолярные пространства. Зрелые сперматозоиды были дезориентированы в клеточном дебрисе. Количество клеток Сертоли и сперматидов в каналце значительно уменьшалось после обработки ЛПС, а количество сперматогоний и сперматоцитов не изменилось (таблица 1.2).

Таблица 1.2 - Число клеток Сертоли (КС), сперматогоний (СПГ), сперматоцитов (СПЦ) и сперматид (СТ) у потомства самцов крыс после пренатального воздействия ЛПС и постнатального воздействия антагонистом эстрадиола фульвестрантом ($p < 0,05$).

животные	КС/каналец	СПГ/каналец	СПЦ/каналец	СТ/каналец
контроль	11±1,95	64,43±5,46	122,78±24,31	165,12±26,35
ЛПС	7,32±1,71*	60,05±5,95	103,58±35,67	65,18±20,46*
<u>ЛПС+</u> <u>фульвестрант</u>	14,77±2,15*	65,72±5,48	118,9±27,07	154,19±24,26

Антагонист фульвестрант устранял выявленные нарушения (рисунок 1.6 д). Развитию гонад у самцов крыс предшествует развитие урогенитального гребня на ЭД12, которое регулируется различными морфогенетическими факторами. К таким факторам относят цитокины интерлейкин (ИЛ)-6 и лейкоemia ингибирующий фактор (ЛИФ), экспрессия которых выявлена в урогенитальном гребне. Показано участие этих цитокинов и их рецепторов в пренатальной дифференцировке зародышевых клеток у мышей и человека [22, 23]. ЛИФ участвует также в постнатальном развитии гонад. Ранее нами было показано, что содержание ИЛ-6 и ЛИФ значительно увеличивается в крови и спинномозговой жидкости плодов мышей после воздействия ЛПС [24]. Их повышенное содержание в раннем развитии может программировать развитие гонад и приводить к повышенной продукции половых стероидов в препубертатный период [17]. Стероидный баланс в препубертатном периоде важен для дифференцировки клеток Сертоли. Показано, что эстрадиол участвует в регуляции пролиферации и дифференцировке клеток Сертоли в

незрелых семенниках крысы [25], что имеет решающее значение для развития сперматогенеза [26]. Наши результаты подтверждают эти данные.

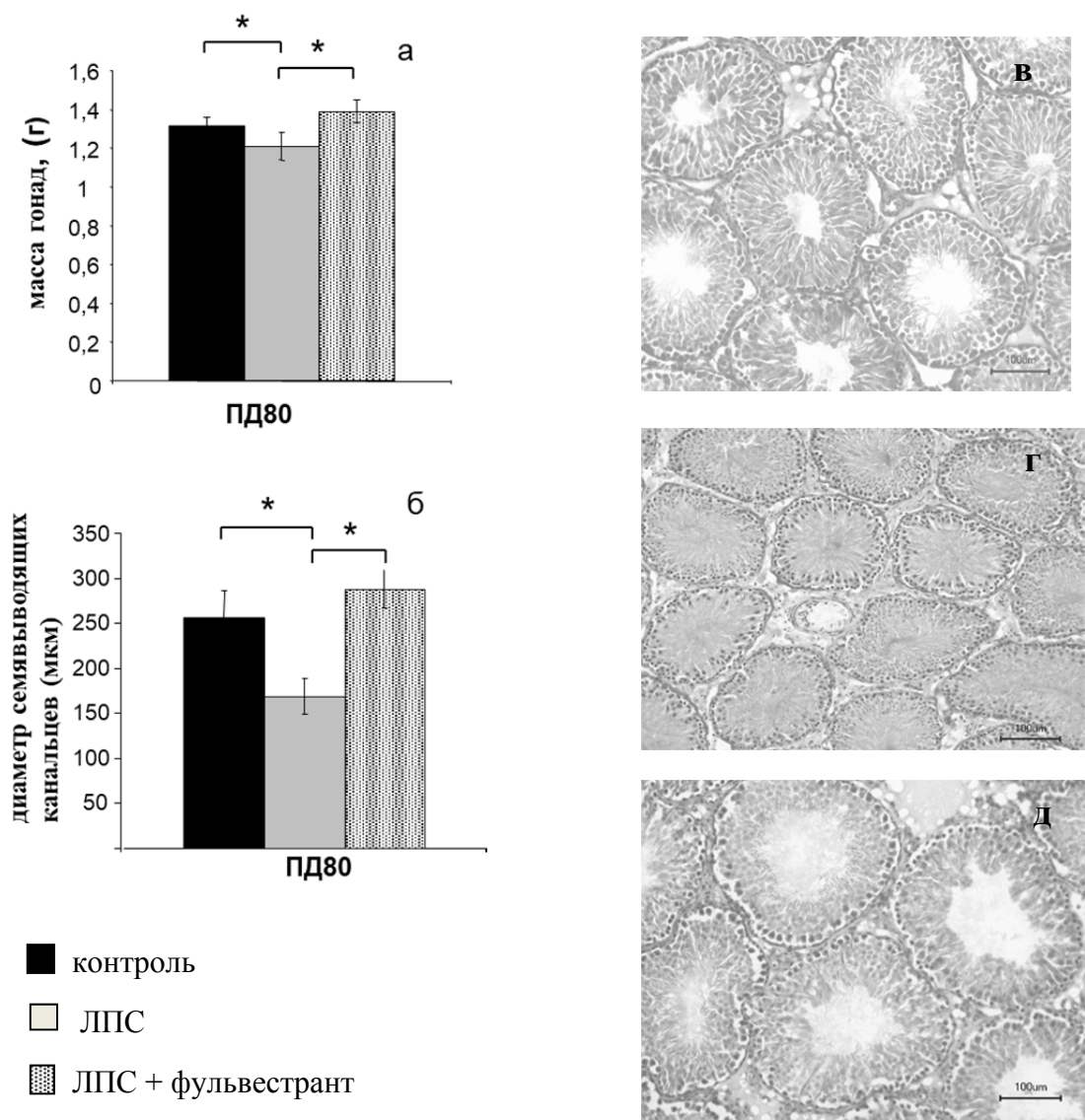


Рисунок 1.6 - Масса гонад (а), диаметр семенных канальцев (б) у потомства самцов крыс на ПД80 после пренатального воздействия ЛПС (50 мкг/кг) и постнатального воздействия фульвестранта (1,5 мг/кг в кунжутном масле на ПД5-ПД14). Данные выражены как среднее \pm SEM; статистический анализ: односторонний ANOVA; * $p < 0,01$ между группами в одном возрасте. Морфология гонад самцов крыс после пренатального введения беременным самкам 0,9% раствора NaCl (в), или ЛПС (г, д) и постнатального введения самцам кунжутного масла (в, г), фульвестранта (д). Шкала бар - 100 мкм.

После введения ЛПС на ЭД12 у потомства половозрелых самцов наблюдалось снижение содержания тестостерона (рисунок 1.7 а) и эстрадиола (рисунок 1.7 б) в сыворотке крови по сравнению с контролем. Под действием антагониста эстрадиола

содержание тестостерона увеличивалось на ПД80 до контрольного уровня, содержание эстрадиола также увеличивалось, однако было ниже, чем в контроле (рисунок 1.7).

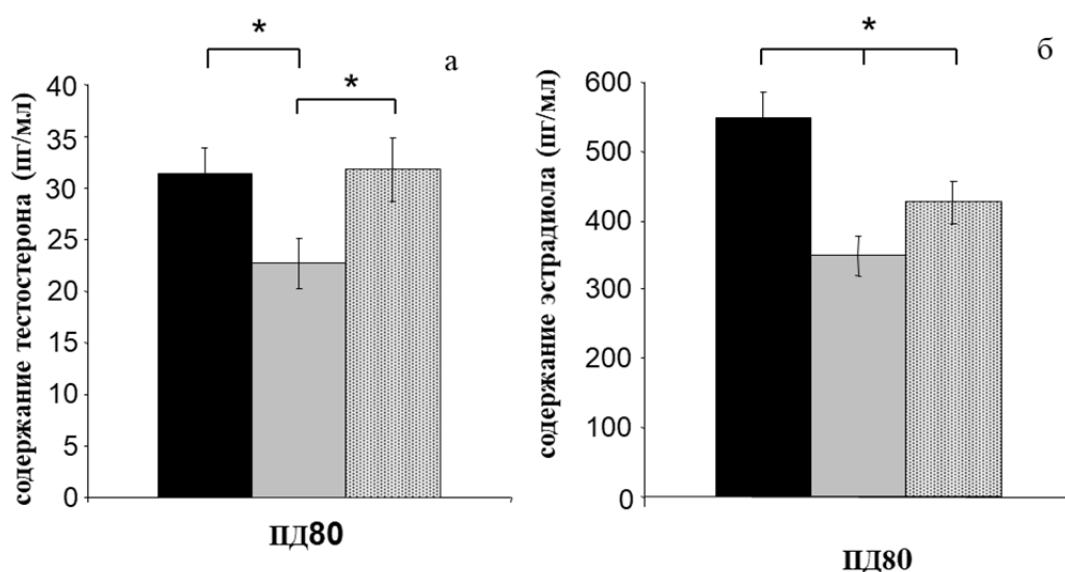


Рисунок 1.7 - Концентрации (а) циркулирующего тестостерона и (б) эстрадиола у потомства самцов крыс на ПД80 после пренатального воздействия ЛПС (50 мкг/кг) на ЭД12 и постнатального воздействия фульвестранта (1,5 мг/кг) с ПД5 по ПД14. Данные выражены как среднее \pm SEM; статистический анализ: односторонний ANOVA; * $p < 0,01$ между группами одного возраста.

Выявленные нарушения в развитии и функционировании репродуктивной системы самцов, индуцированные пренатальным воздействием ЛПС, приводили к нарушениям их репродуктивной способности. В норме они производили осеменение после 1-3 попыток с последующим развитием беременности в 73%, тогда как после пренатальной обработки ЛПС половозрелые самцы были менее активными и производили осеменение после 8 попыток, беременность развивалась только в 50% случаев. После воздействия антагониста фульвестранта самцы могли осеменять самок с 1-й по 4-ю попыток и беременность у здоровых самок развивалась в 71% случаев.

Таким образом, воздействие бактериального ЛПС в раннем онтогенезе вызывает структурно-функциональные нарушения репродуктивной системы у половозрелого потомства самцов крыс, которые потенцируются повышенным содержанием эстрадиола в ранний препубертатный период. Селективный антагонист, введенный в этот период, практически полностью устраняет вызванные ЛПС нарушения [19].

Были продолжены исследования по влиянию нейропептида ГРГ на развитие тимуса у крыс. В предыдущем исследовании нами было показано, что пренатальная блокада рецептора к ГРГ селективным антагонистом приводит к нарушениям в функционировании

Т-лимфоцитов, а также влияние ГРГ на синтез тимических цитокинов. В настоящей работе нами было исследовано влияние ГРГ на дифференцировку Т-лимфоцитов и секрецию цитокинов в органотипической культуре тимусов плодов. Совместное культивирование ГРГ (10^{-7} М) с тимусами 18-ти дневных плодов в течение 5 сут приводило к двукратному увеличению доли Т лимфоцитов-хелперов CD4 фенотипа. Одновременно, наблюдалась тенденция к увеличению доли незрелых двойных позитивных Т лимфоцитов CD4 и CD8 фенотипов (рисунок 1.8).

Согласно данным литературы, после рождения ГРГ и его агонисты регулируют численность лимфоцитов, преимущественно CD4+Т клеток-хелперов, и предотвращают возрастную инволюцию тимуса [27, 28]. В наших исследованиях ГРГ вызывает увеличение числа CD4+Т-лимфоцитов и в пренатальном онтогенезе (рисунок 1.8).

При оценке концентраций цитокинов в инкубационной среде оказалось, что уровень ИЛ-2 и ИЛ-1 α был менее 40 пг/мл, т.е. ниже предела чувствительности метода. Концентрация интерферона гамма в контроле составляла около 40пг/мл, а в присутствии ГРГ возрастала в 2 раза (рисунок 1.9). Исходно высокая концентрация фактора некроза опухоли альфа (ФНО α , около 200 пг/мл) также увеличивалась под действием ГРГ почти в 3 раза. В то же время ГРГ не влиял на секрецию регуляторного цитокина ИЛ-10, исходная концентрация которого составляла около 300 пг/мл.

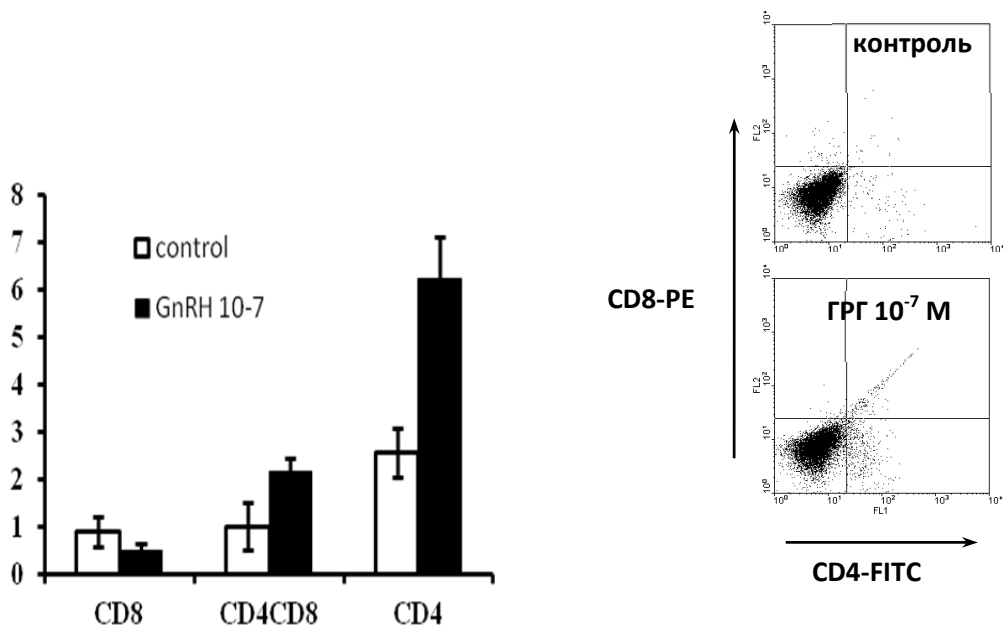


Рисунок 1.8 - Влияние ГРГ (10^{-7} М) на дифференцировку Т-лимфоцитов в органотипической культуре тимусов 18-ти дневных плодов (культивирование 5 сут).

Известно, что эти цитокины участвует в регуляции межклеточных взаимодействий, апоптоза, морфогенеза [29]. В различных экспериментальных моделях на животных, а

также у людей содержание ФНО α в периферической крови не определяется, а его высокий уровень (более 250 пг/мл) выявляют при воспалительных процессах и септическом шоке [30]. В наших исследованиях ГРГ индуцировал как синтез, так и секрецию ФНО α . Его содержание в органотипической культуре тимусов составляла 650 пг/мл, что может быть связано с отсутствием нейроэндокринной регуляции.

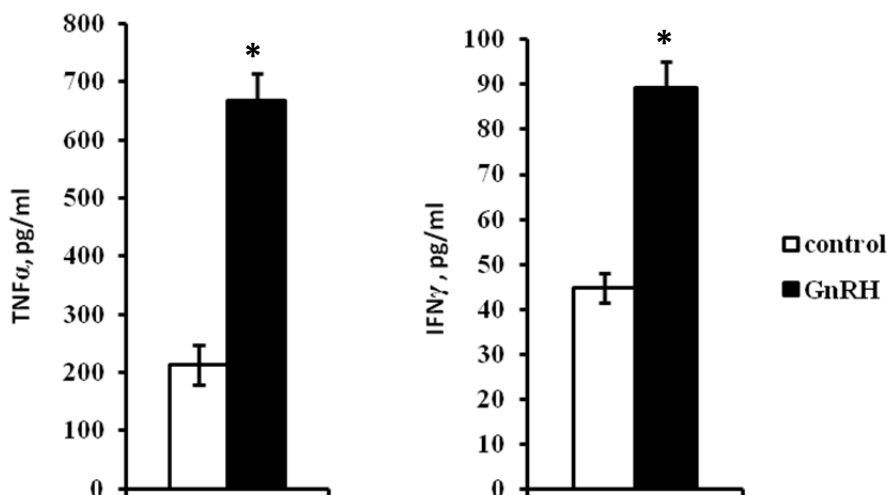


Рисунок 1.9 - Влияние ГРГ (10^{-7} М) на секрецию интерферона гамма (IFN γ) и фактора некроза опухоли альфа (TNF α) клетками тимуса 18-ти дневных плодов после их культивирования *ex vivo* в течение 24 ч.

О возможном влиянии нейроэндокринной системы на развитие тимуса косвенно свидетельствуют полученные нами ранее данные о супрессирующем влиянии селективного антагониста на функциональную активность тимоцитов плодов крыс в модели *in vivo*. В то же время, супрессирующий эффект не развивался при совместном культивировании антагониста с тимоцитами плодов *in vitro*. Двукратное снижение содержания ГРГ, наблюдаемое в тимусе плодов крыс после удаления у них гипоталамуса подтверждает это предположение [30].

Наряду с нейроэндокринной регуляцией, в процессах развития тимуса может участвовать также ГРГ, синтезируемый непосредственно в тимусе плодов уже с ЭД18 [30]. Регуляция развития тимуса может осуществляться, по-видимому, двумя разными формами ГРГ, поскольку в гипоталамусе синтезируется ГРГ1, а вне мозга преимущественно синтезируется ГРГ2. Синтез ГРГ2 обнаружен в яичниках, семенниках, простате и молочной железе, а в процессе беременности в плаценте матери. Таким образом, можно предположить, что циркулирующий ГРГ может реализовывать свои эффекты через эндокринные механизмы, тогда как синтезируемый локально - аутокринно-паракринной регуляцией.

Представленные данные свидетельствуют о важной роли ГРГ в формировании тимуса. Пренатальная блокада ГРГ-рецепторов вызывает нарушения программирования развития тимуса, что приводит в дальнейшем к нарушению в функционировании Т-лимфоцитов. В реализацию ГРГ эффекта на ранних этапах развития вовлекаются цитокины, синтез и секреция которых увеличиваются в тимусе под его воздействием [31].

1.2.4 Заключение

Анализ собственных и литературных данных свидетельствует о взаиморегуляторном влиянии нейроэндокринной и иммунной систем уже в раннем развитии [32]. Влияние ГРГ на иммунную систему на разных этапах онтогенеза, по-видимому, различно. В пренатальном онтогенезе до ЭД20-21, пока не сформировалась гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось, осуществляющая эндокринную регуляцию, ГРГ оказывает влияние на морфогенез тимуса. В перинатальный период, когда гипоталамо-гипофизарно-гонадная система начинает функционировать, ГРГ участвует в программировании функций иммунной системы. Дефицит ГРГ в критические периоды развития тимуса в дальнейшем вызывает в нем необратимые изменения, приводящие к нарушению функций Т-лимфоцитов.

В свою очередь, медиаторы иммунной системы участвуют в регуляции развития гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Активация иммунной системы матери бактериями на ранних сроках беременности вызывает усиление синтеза провоспалительных цитокинов как у матери, так и плодов, что приводит к нарушениям развития репродуктивной системы. Эти нарушения могут усиливаться повышенным содержанием половых стероидов в препубертате. Их антагонисты устраняют наблюдаемые расстройства, что открывает возможности для коррекции процессов развития.

1.2.5 Список использованных источников

12 Zakharova L.A. Plasticity of neuroendocrine-immune interactions during ontogeny: role of perinatal programming in pathogenesis of inflammation and stress-related diseases in adults // *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.* - 2009. - V. 3. - P. 11–27.

13 Izvol'skaia M., Sharova V., Zakharova L. Prenatal Programming of Neuroendocrine System Development by Lipopolysaccharide: Long-Term Effects // *Int. J. Mol. Sci.* - 2018. - V. 19 –No 11. – P. 3695. - doi:10.3390/ijms19113695.

14 Wang S., Yan J.Y., Lo Y.K., Carvey P.M., Ling Z. Dopaminergic and serotonergic deficiencies in young adult rats prenatally exposed to the bacterial lipopolysaccharide // *Brain Res.* - 2009. - V. 1265. - P. 196-204.

- 15 Zakharova L.A., Izvolskaia M.S.: Interactions between the reproductive and immune systems during ontogenesis: the role of GnRH, sex steroids and immunomediators. In: Kahn SM, editor. "Sex steroids" Zagreb:InTech. - 2012 - P. 341–370.
- 16 Quintanar J.L., Guzmán-Soto I. Hypothalamic neurohormones and immune responses // *Front Integr. Neurosci.* - 2013. - V. 7. - P 56. - doi: 10.3389.
- 17 Izvolskaia M.S., Tillet Y., Sharova V.S., Voronova S.N., Zakharova L.A. Disruptions in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in rat offspring following prenatal maternal exposure to lipopolysaccharide // *Stress.* - 2016. - V. 3. - P. 1–8.
- 18 Sibonga J.D., Bell N.H., Turner R.T. Evidence that ibuprofen antagonizes selective actions of estrogen and tamoxifen on rat bone // *J. Bone Mineral Res.* - 1998. - V. 13. - P. 863–870.
- 19 Izvolskaia M.S., Sharova V.S., Ignatiuk V.M., Voronova S.N., Zakharova L.A. Abolition of prenatal lipopolysaccharide-induced reproductive disorders in rat male offspring by fulvestrant // *Andrologia.* - 2019. - V. 51. - e13204. - doi: 10.1111/and.13204.
- 20 Asiaei M., Solati J., Salari A.A. Prenatal exposure to LPS leads to long-lasting physiological consequences in male offspring // *Dev. Psychobiol.* - 2011. - V. 53. - P. 828–838.
- 21 Geary N., Asarian L., Korach K.S., Pfaff D.W., Ogawa S. Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystikinin satiation in ER-alpha null mice // *Endocrinology.* - 2001. - V. 142. - P. 4751–4757.
- 22 Cheng L., Gearing D.P., White L.S., Compton D.L., Schooley K., Donovan P.J. Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth // *Development.* - 1994. - V. 120. - P. 3145–3153.
- 23 Eddie S.L., Childs A.J., Jabbour H.N., Anderson R.A. Developmentally regulated IL6-type cytokines signal to germ cells in the human fetal ovary // *Mol. Hum. Reprod.* - 2012. - V. 18. - P. 88–95.
- 24 Sharova V.S., Izvolskaia M.S., Zakharova L.A. Lipopolysaccharide-induced maternal inflammation affects the GnRH neuron development in fetal mice // *Neuroimmunomodulation.* - 2015. - V. 22. - P. 222–232.
- 25 Lucas T.F., Lazari M.F., Porto C.S. Differential role of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 on the regulation of proteins involved with proliferation and differentiation of Sertoli cells from 15-day-old rats // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2014. - V. 382. - P. 84–96.
- 26 D'Souza R., Pathak S., Upadhyay R., Gaonkar R., D'Souza S., Sonawane S., Gill-Sharma M., Balasiner N. H. Disruption of tubulobulbar complex by high intratesticular estrogens leading to failed spermiation // *Endocrinology.* - 2009. - V. 50. - P. 1861–1869.

27 Jacobson J.D., Ansari M.A., Mansfield M.E., McArthur C.P., Clement L.T. Gonadotropin-releasing hormone increases CD4 T-lymphocyte numbers in an animal model of immunodeficiency // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 1999. - V. 104. - P. 653–658.

28 Ullewar M.P., Umathe S.N. Gonadotropin-releasing hormone agonist selectively augments thymopoiesis and prevents cell apoptosis in LPS induced thymic atrophy model independent of gonadal steroids // *Int. Immunopharmacol.* - 2014. - V. 23. - P. 46–53.

29 Beutler B.A. The role of tumor necrosis factor in health and disease // *J. Rheumatol. Suppl.* - 1999. - V. 57. - P. 16–21.

30 Zakharova L.A., Ermilova I.Y., Melnikova V.I., Malyukova I.V., Adamskaya E.I. Hypothalamic control of the cell-mediated immunity and of the Luteinizing Hormone-Releasing Hormone level in thymus and peripheral blood of rat fetuses // *Neuroimmunomodulation.* - 2005. - V. 12. - P. 85–91.

31 Melnikova V.I., Lifantseva N.V., Voronova S.N., Zakharova L.A. Gonadotropin-Releasing Hormone in Regulation of Thymic Development in Rats: Profile of Thymic Cytokines // *Int. J. Mol. Sci.* - 2019. - V. 20. - No 16. - pii: E4033. doi: 10.3390/ijms20164033

32 Zakharova L.A. Prenatal stress in programming of immune and neuroendocrine system development // *Medical Academic Journal. Suppl.* - 2019. - P. 124–126. <https://doi.org/10.17816/MAJ191S1124-26>.

Подраздел 1.3 Протеасомы в развитии злокачественных опухолей. Поиск приложения к медицинской практике

1.3.1 Введение

Протеасомы являются абсолютно необходимыми для клеток. Они контролируют протеом и регулируют клеточные процессы, образуя биологически активные пептиды и гидролизуя факторы роста и транскрипции, рецепторы, компоненты сигнальных путей и другие белки. Наиболее зависимы от протеасом опухолевые клетки, что показано на многочисленных клеточных линиях. Цель настоящей работы – исследовать изменения в пуле протеасом рака прямой кишки пациентов в сравнении с контрольной тканью на послеоперационном материале и выявить на основании полученных результатов наиболее перспективные мишени для терапии данного онкологического заболевания.

1.3.2 Материалы и методы

Послеоперационные образцы аденокарциномы прямой кишки получали из РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России с письменного согласия пациентов.

Химотрипсинподобную активность общего пула протеасом *in vitro* оценивали по гидролизу флуорогенного субстрата Suc-LLVY-AMC [3].

Для Вестерн-блоттинга использовали моноклональные антитела мыши к субъединицам $\alpha 1,2,3,5,6,7$ протеасом, иммунным субъединицам LMP2 и LMP7 протеасом, субъединице Rpt6 активатора PA700 протеасом, (Enzo Life Sciences, США), моноклональные антитела мыши к β актину (Santa Cruz Biotechnology, США), антитела козы к IgG мыши и кролика, конъюгированные с пероксидазой (Amersham Biosciences, Великобритания). Вестерн-блоттинг осуществляли по стандартному методу, как описано ранее [3].

Действие высокой температуры на злокачественные клетки исследовали по методике, описанной в [33].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 7.0. Значимость различий между выборками оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

1.3.3 Результаты и обсуждение

Выявлено, что химотрипсинподобная (ХТП) активность протеасом в аденокарциноме ($T_2N_0M_0$) прямой кишки человека повышена в 2 раза по сравнению с контрольной прилежащей тканью ($p < 0.01$). В опухоли достоверно ($p < 0.05$) увеличена также экспрессия общего пула протеасом (маркером являются субъединицы $\alpha 1,2,3,5,6,7$) на 23% и активатора PA700 (маркер – субъединица Rpt6) на 75% (рисунок 1.10) [34].

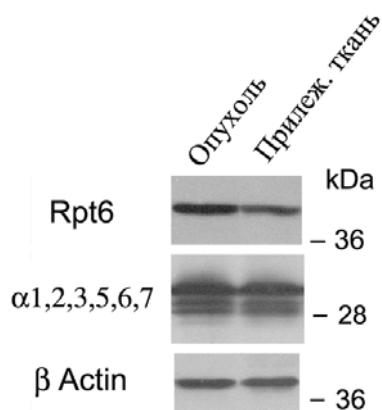


Рисунок 1.10 - Вестерн-блоты субъединиц $\alpha 1,2,3,5,6,7$ протеасом и субъединицы Rpt6 активатора PA700 в аденокарциноме прямой кишки на стадии $T_2N_0M_0$ и в контрольной прилежащей ткани пациентов. Нормализация на содержание β -актина.

Воздействие на злокачественные клетки (лимфома U937 человека) высокой температуры (43°C) приводит к значительному, но временному снижению указанных

параметров протеасом [33]. Через 10 часов начинается их восстановление, которое завершается к 48 часам после начала эксперимента. Полученные результаты указывают на важную роль протеасом не только в развитии опухолей, но и в их адаптации к тепловому шоку, что необходимо учитывать при разработке терапии термальной обработкой опухолей.

Следует подчеркнуть, что результаты по увеличению различных параметров пула протеасом в аденокарциноме прямой кишки пациентов похожи на ранее полученные нами результаты исследования рака щитовидной железы пациентов [35]. Помимо указанных параметров пула протеасом была изучена также экспрессия иммунных протеасом, содержащих субъединицы LMP7 и/или LMP2. Удивительно, что содержание этих протеасом тоже возрастает в аденокарциноме прямой кишки. Иными словами, в раковых клетках присутствуют в значительных количествах иммунные протеасомы, образующие из чужеродных белков, в том числе опухолевых, антигенные эпитопы для молекул ГКГ класса I, что необходимо для распознавания и уничтожения этих клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами. Тогда правомочен вопрос, почему иммунная система не уничтожает в таком случае опухоль? Ответом могут быть полученные нами ранее результаты для рака щитовидной железы пациентов, свидетельствующие о крайне низком уровне в опухоли молекул ГКГ класса I [35]. Справедливо ли это для рака прямой кишки, предстоит выяснить.

1.3.4 Заключение

Полученные результаты, свидетельствующие об увеличенном содержании иммунных субъединиц протеасом в опухоли прямой кишки пациентов, на первый взгляд, указывают на перспективность применения ингибиторов этих субъединиц для терапии данного онкологического заболевания. Вместе с тем, следует учитывать, что подобные ингибиторы могут нарушить не только функции иммунной системы пациентов, но и ряд других процессов, протекающих с участием иммунных субъединиц LMP7 и LMP2, к числу которых относится передача сигналов между нейронами [3]. В целом, полученные результаты указывают на РА700-активатор и ХТП-активность протеасом как на более перспективные мишени для терапии рака прямой кишки.

1.3.5 Список использованных источников

33 Морозов А.В., Буров А.В., Астахова Т.М., Спасская Д.С., Маргулис Б.А., Карпов В.Л. Динамика функциональной активности и экспрессии субъединиц протеасом в

условиях адаптации клетки к тепловому шоку//Молекулярная биология. - 2019. - Т. 53. - N 4. - С. 638 – 647. DOI: 10.1134/S0026898419040086. Англ.: Mогоzov A.V., Burov A.V., Astakhova T.M., Spasskaya D.S., Margulis B.A., Karpov V.L. Dynamics of the Functional Activity and Expression of Proteasome Subunits during Cellular Adaptation to Heat Shock//Molecular Biology. - 2019. - Vol. 53. - Is. 4. - P. 571 - 579. DOI: 10.1134/S0026893319040071.

34 Астахова Т.М., Родоман Г.В., Сумеди И.Р., Плеханова А.С., Свириденко Н.В., Мелоян М.М., Шарова Н.П.. Характеристика протеасом злокачественных опухолей. Перспективы применения в медицинской практике//Acta Naturae. - 2019. - Спецвыпуск. - Т. 2. - С. 226.

35 Sharova N.P., Astakhova T.M., Karpova Ya.D., Lyupina Yu.V., Alekhin A.I., Goncharov N.G., Sumedi I.R., Cherner V.A., Rodoman G.V., Kuznetsov N.A., Erokhov P.A.. Changes in proteasome pool in human papillary thyroid carcinoma development//Cent. Eur. J. Biol. - 2011. -Vol. 6. - N 4. - P. 486 - 496.

РАЗДЕЛ 2 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ С УЧАСТИЕМ ПРОТЕАСОМ И ШАПЕРОНОВ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

Подраздел 2.1 Белки холодноводной беломорской губки *Halisarca dujardini*

2.1.1 Введение

Нейроглобин (Ngb) – железосодержащий белок, относящийся к глобинам и участвующий в транспорте кислорода, впервые был обнаружен в 2000 году в нервной системе позвоночных [1]. Ранее Ngb считался белком позвоночных. В последнее десятилетие он был обнаружен у различных многоклеточных животных вне зависимости от присутствия или отсутствия системы кровообращения, в том числе у Prometazoa - губок (*Amphimedon queenslandica* и *Carterospongia foliascens*) и трихоплакса (*Trichoplax adherens*) [2]. Ngb – древний белок, его примерный возраст оценивается в 550 млн лет [3].

Губки (Porifera) – одни из древнейших многоклеточных организмов и наиболее раннее ответвление клады Metazoa. Исследование белков губок поможет узнать их структуру и функции в клетках первых многоклеточных. Мы исследовали структуру гена нейроглобина холодноводной морской губки *Halisarca dujardini* на основе данных по секвенированию ДНК и РНК.

2.1.2 Материалы и методы

Образцы губок *H. dujardini* были собраны на Беломорской биологической станции МГУ в ноябре 2017г. РНК была выделена TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc.), обработана Dnase I (Ambion) и очищена с помощью Ribo-zero rRNA Removal Kit (Human / Mouse / Rat) (Illumina). кДНК библиотеки были сконструированы с использованием NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs), проверены Agilent 2100 DNA High Sensitivity Kit и секвенированы на Illumina HiSeq2500 с парно-концевыми ридами длиной 125 пар оснований (по). Для одноконцевых прочтений длиной 50 по мРНК была выделена из тотальной с помощью NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs), далее кДНК библиотеки были сконструированы и секвенированы. На основе парноконцевых прочтений осуществлена *de novo* транскриптомная сборка с помощью программы Trinity v.2.8.4 [4]. Одноконцевые прочтения в 2-х повторах для губки и диссоциированных клеток были картированы на транскриптомную сборку. Риды были количественно оценены с помощью RSEM v.1.3.1 [5]. Для анализа дифференциальной экспрессии был использован R package *edgeR* [6].

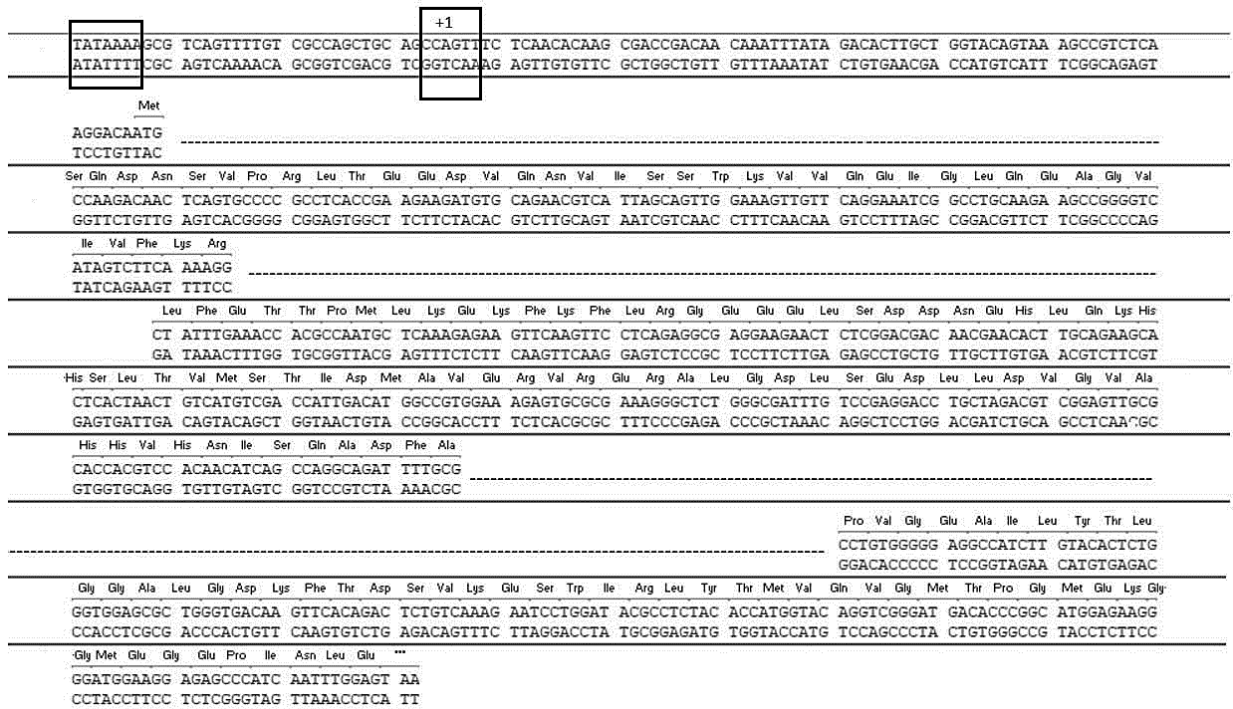
Полноразмерная кДНК нейроглобина *H. dujardini*, фланкированная адаптерными последовательностями, была получена по технологии Mint с использованием набора Mint

RACE cDNA amplification set (Евроген) [7]. Первая цепь кДНК была использована для Step-Out PCR [8] со специфическим праймером и набором Step-Out primer mix (Евроген). Полученный ПЦР-продукт был клонирован в плазмиду pAL2-T (Евроген) и секвенирован. ПЦР фрагмент с кДНК был получен с праймерами из кодирующей последовательности *Ngb* (5' atgtccsaagacaactcagtg 3' и 5'ttactccaaattgatgggctct 3'). ПЦР-фрагмент был клонирован в плазмиду pET32v9, обработанную рестриктазами *Bam*HI и *Xho*I. *E. coli* штамма BL21 были трансформированы полученной плазмидой, *H. dujardini* *Ngb* был экспрессирован, выделен и очищен по стандартным методикам на Ni-NTA агарозе. Регистрацию спектров проводили на спектрофотометре U-2800A Hitachi (Япония). 500 мкл раствора нейроглобина (0,25 мг/мл) в 20мМ Трис-HCl-буфере pH 7.4, содержащем 100 мМ NaCl, 1мМ ДТТ помещали в кварцевую кювету и регистрировали изменение оптической плотности раствора от длины волны в диапазоне от 200 до 500 нм. В качестве раствора сравнения использовали буфер. Спектры белка, обработанного трипсином, были получены с помощью спектрометра matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight mass (TOF) Ultraflextreme BRUKER (Германия). Идентификация белковых последовательностей проводилась с помощью программного обеспечения Mascot (www.matrixscience.com).

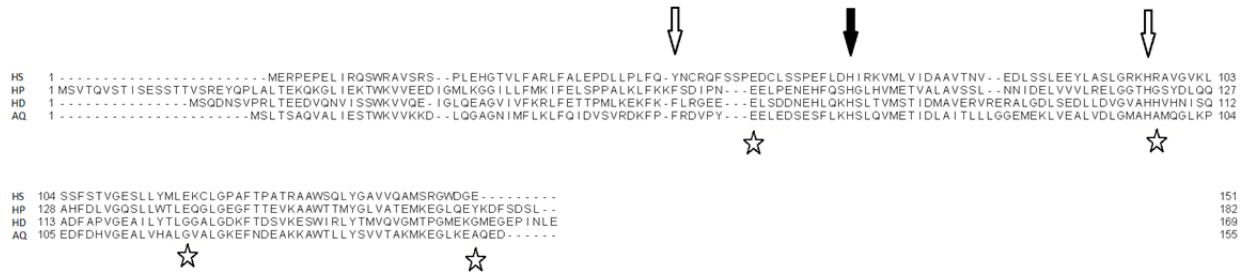
2.1.3 Результаты и обсуждение

Несколько последовательностей *Ngb* мРНК разной длины было определено в транскриптомной сборке для губки *H. dujardini*, 5' область мРНК была секвенирована при помощи RACE анализа. Полученная полная последовательность РНК (MK520984) была выравнена на черновую сборку генома (неопубликованные данные), и определена структура гена (рисунок 2.1 А, Б). В отличие от *Ngb* млекопитающих, содержащего несколько Sp1-сайтов [1], в промоторной области *H. dujardini* присутствовал ТАТА-бокс в положении - 30 от старта транскрипции [9]. В положении - 1 от начала транскрипции находился цитозин, а в положении +1 – аденин, окруженные пиримидиновыми нуклеотидами, что говорит о присутствии мотива инициации транскрипции (Inr) [9]. В промоторной области *Ngb* в положении +1 – аденин, окруженные пиримидиновыми нуклеотидами, что губки *A. queenslandica* (NW_003546451.1) также присутствует АТ-богатая последовательность похожая на ТАТА-бокс, но не обнаруживается Inr мотив. Ген *Ngb* *H. dujardini* содержит 3 интрона, что соответствует структуре других *Ngb* белков [10]. В 3' области гена находится длинный (4330 пар оснований) нетранслируемый регион.

A



B.



B.

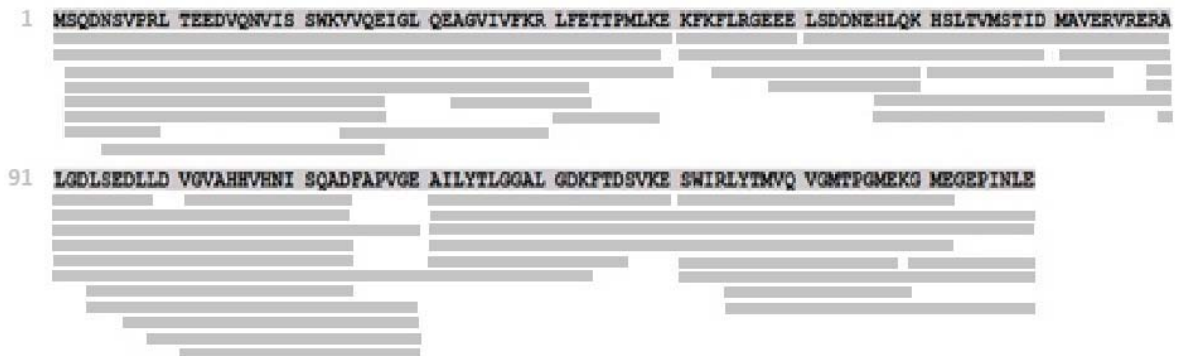


Рисунок 2.1 - А. Структура гена *Ngb H. dujardini*. ТАТА-бокс и Инг обведены рамками. Интроны показаны пунктирной линией. Б. Последовательность белка *Ngb* у человека (HS), *H. panacea* (HD), *H. dujardini* (HD) и *A. queenslandica* (AQ). Белыми стрелками

обозначены консервативные гистидины, черной – фенилаланин между С и D диском, звездочками – аминокислоты, участвующие в защите от клеточной смерти в условиях гипоксии у позвоночных. В. Покрытие спектрами и последовательность белка, определенная с помощью масс спектрометрии.

Белок состоит из 169 ак, в отличие от 151 ак у человека и мыши. Последовательность белка показала низкую идентичность (39%) при сравнении с Ngb губки *A. queenslandica* (XP_003387899.1), а при сравнении с любыми другими беспозвоночными и позвоночными была около 30 %. При этом идентичность между Ngb человека и мыши составляет 94 %, что выше, чем идентичность между ортологами гемоглобина и миоглобина, а также многих других белков у этих видов [1]. Несмотря на низкую аминокислотную консервативность Ngb *H. dujardini*, в нем присутствуют проксимальный и дистальный гистидины (His71 и His105), необходимые для связывания гема (рисунок 1). В Ngb *H. dujardini* нет консервативных глутаминов (Gly) и аргинина (Arg), необходимых для осуществления защиты от клеточной смерти в условиях гипоксии у позвоночных [11]. Аминокислота в спейсере между С и D диском, стабилизирующая гемовый карман путем образования водородной связи, может варьировать у отдаленных видов [12]. У *H. dujardini* нами обнаружен фенилаланин, как у трихоплекса и губки *A. queenslandica*.

Поиск других глобиновых генов в геноме и транскриптомной сборке *H. dujardini* показал наличие андроглобина (ADGB), который присутствует у многих беспозвоночных, в том числе у трихоплекса и *A. queenslandica*. Экспрессия андроглобина в интактной губке и в клеточной суспензии была в 2 раза ниже, чем Ngb (таблица 2.1).

Таблица 2.1 - Уровень экспрессии Ngb и ADGB в интактной губке (иг) и в клеточной суспензии (кс)

	иг	иг	кс	кс
Ngb	48.22	53.74	29.17	31.02
ADGB	26.84	24.57	14.80	15.14

Была идентифицирована мРНК 10 белков, вовлечённых в биосинтез гема у губки *Halisarca dujardini*: hemB, ALAD (BankIt2189715 Seq2 MK520963); hemC, HMBS (BankIt2189715 Seq3 MK520964); hemD, UROS (BankIt2189715 Seq4 MK520965); hemE, UROD (BankIt2189715 Seq5 MK520966); hemF, CPOX (BankIt2189715 Seq6 MK520967); hemH, FECH (BankIt2189715 Seq9 MK520970); hemY, PPOX (BankIt2189715 Seq7 MK520968); ALAS (BankIt2189715 Seq1 MK520962), neuroglobin, NGB (BankIt2189715

Seq23 MK520984); FTH1 (BankIt2189715 Seq22 MK520983).
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

2.1.4 Заключение

Итак, структура гена *Ngb* беломорской губки *H. dujardini* сильно отличается от *Ngb* млекопитающих и даже от *Ngb* губки *A. queenslandica* (ген *Ngb H. dujardini* более чем в 2 раза длиннее гена *Ngb A. queenslandica* в основном за счет более длинных интронов). Промоторная область гена указывает на то, что в его транскрипции должны принимать участие ТАТА-связывающий белок (ТВР) и транскрипционные факторы TFIIA, TFIIID, TFIIIE, TFIIIF и TFIIH. В отличие от губок, промоторная область нейроглобина млекопитающих не содержит ТАТА-бокса. ТАТА-бокс является древним промоторным мотивом эукариот (последовательности, сходные с ТАТА-боксом найдены у протистов), а у позвоночных ТАТА-бокс распространён менее широко. Нельзя исключить, что функция *Ngb* у беспозвоночных и позвоночных различаются. Относительно более высокая, по сравнению с *ADGB*, экспрессия *Ngb* говорит о его более значительном вкладе в газовый обмен, и, возможно, другие метаболические процессы у *H. dujardini*.

Исследование уровня экспрессии нейроглобина у губки при разных физиологических состояниях поможет получить информацию о том, в каких именно биологических процессах участвует этот белок.

2.1.5 Список использованных источников

1 Burmester T., Weich B., Reinhardt S., Hankeln T. A Vertebrate Globin Expressed in the Brain//Nature. - 2000. - Vol. 407. - P. 520 - 523. doi: 10.1038/35035093.

2 Lechauve C., Jager M., Laguerre L. et al. Neuroglobins, pivotal proteins associated with emerging neural systems and precursors of metazoan globin diversity//J Biol Chem. - 2013. - Vol. 8. - P. 6957 - 6967. doi: 10.1074/jbc.M112.407601.

3 Casado B., Pannell L.K., Whalen G. et al. Human neuroglobin protein in cerebrospinal fluid//Proteome Science. - 2005. - Vol. 3. - P. 2. doi: 10.1186/1477-5956-3-2.

4 Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome//Nature Biotechnology. - 2011. - Vol. 29. - P. 644 - 652. doi: 10.1038/nbt.1883.

5 Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome//BMC Bioinformatics. - 2011. - Vol. 12. - P. 323. doi:10.1186/1471-2105-12-323.

6 McCarthy D.J., Chen Y., Smyth G.K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation//Nucleic Acids Res. - 2012. – Vol. 40. - P. 4288 - 4297. doi: 10.1093/nar/gks042.

7 Schmidt W.M., Mueller M.W. CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs//Nucleic Acids Res. - 1999. - Vol. 27. - e31. doi: 10.1093/nar/27.21.e31.

8 Matz M., Shagin D., Bogdanova E. et al. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR//Nucleic Acids Res. - 1999. - Vol. 27. - P. 1558 - 1560. doi: 10.1093/nar/27.6.1558.

9 Smale S. T., Kadonaga J. T. The RNA polymerase II core promoter // Annual review of biochemistry. - 2003. - Vol. 72. - P. 449 - 479. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520

10 Dröge J., Pande A., Englander E.W., Makałowski W. Comparative genomics of neuroglobin reveals its early origins//PLoS One. - 2012. - Vol. 7. - e47972. doi: 10.1371/journal.pone.0047972.

11 Wakasugi K., Takahashi N., Uchida H., Watanabe S. Species-specific functional evolution of neuroglobin//Mar Genomics. - 2011. - Vol. 4. - P. 137 - 142. doi: 10.1016/j.margen.2011.03.001.

12 Burmester T., Gerlach F., Hankeln T. Regulation and role of neuroglobin and cytoglobin under hypoxia//Adv. Exp. Med. Biol. - 2007. - Vol. 618. - N 6803. - P. 169 - 180. doi: 10.1007/978-0-387-75434-5_13.

Подраздел 2.2 Регуляция протеома клеток насекомых при инфекции бакуловirusами

2.2.1 Введение

Протеасомы в клетках эукариот представлены мультисубъединичными комплексами с молекулярной массой до 2,5 мегадальтон, которые осуществляют гидролиз поврежденных и нефункциональных белков и являются основным компонентом системы контроля протеостаза (совокупности клеточных белков). Коровая частица (CP) 20S протеасом содержит 7 субъединиц альфа-типа и 7 субъединиц бета-типа, которые формируют 4 кольцевых структуры (2 внутренних кольца из бета-субъединиц и 2 внешних кольца из альфа-субъединиц). Протеолитическая активность протеасом в клетке регулируется активаторами (RP, PA28, PA200), а в сборке протеасом участвуют шапероны (PAC и др.). Структура протеасом в клетках дрожжей и млекопитающих интенсивно изучается. Однако сведения о протеасомах беспозвоночных весьма ограничены и

относятся преимущественно к дрозофиле [13]. В отчетный период изучали структуру 20S протеасомы в клетках Sf9 чешуекрылого насекомого *Spodoptera frugiperda*, которое является классической моделью для изучения репродукции бакуловирусов. Ранее нами показано, что активность протеасом необходима для инфекционного цикла бакуловирусов [14] и проведен протеомный анализ 26S протеасом клеток Sf9 [15]. Полученные в отчетном году результаты опубликованы в журнале *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and proteomics* (Q1) [16].

2.2.2 Материалы и методы

В работе использовали современные методы молекулярной и клеточной биологии, биохимии, протеомного анализа и биоинформатики. Методы подробно описаны в публикации [16]. Экстракты клеток Sf9 фракционировали методом нативного электрофореза в градиентном полиакриламидном геле, разработанным в лаборатории. Комплексы 20S протеасом идентифицировали с помощью Вестерн-блоттинга и определения протеолитической активности в геле с использованием флуоресцентного субстрата Suc-LLVY-AMC. Состав выделенных из геля комплексов 20S протеасом анализировали методами масс-спектрометрии MALDI-TOF и LC-MS/MS. Пространственную структуру комплексов изучали с помощью электронной микроскопии и моделирования с использованием пакетов EMAN2.12 и RELION-2.1. Первичную структуру субъединиц протеасом определяли с помощью секвенирования, а также использовали биоинформационные базы данных Spodobase, UniProt и др. Полученные последовательности выкладывали в GenBank. Молекулярные массы и изоэлектрические точки белков верифицировали с помощью двумерного электрофореза. Филогенетический анализ проводили, используя сервер Clustal Omega EMBL-EBI и программы PROTDIST, PHYLIP, IQTree, MEGA X и др.

2.2.3 Результаты и обсуждение

Фракционирование экстрактов клеток нативным электрофорезом в полиакриламидном геле показало, что 20S протеасомы в клетках Sf9 представлены множественными формами (рисунок 2.2). Субъединичный состав разных форм 20S протеасом, определенный с помощью масс-спектрометрии LC-MS/MS, показал наличие комплексов коровой частицы (CP) с гетеродимером шаперонов PAC1-PAC2 на одном или обоих концах CP, а также с активаторами PA28 γ и PA200.

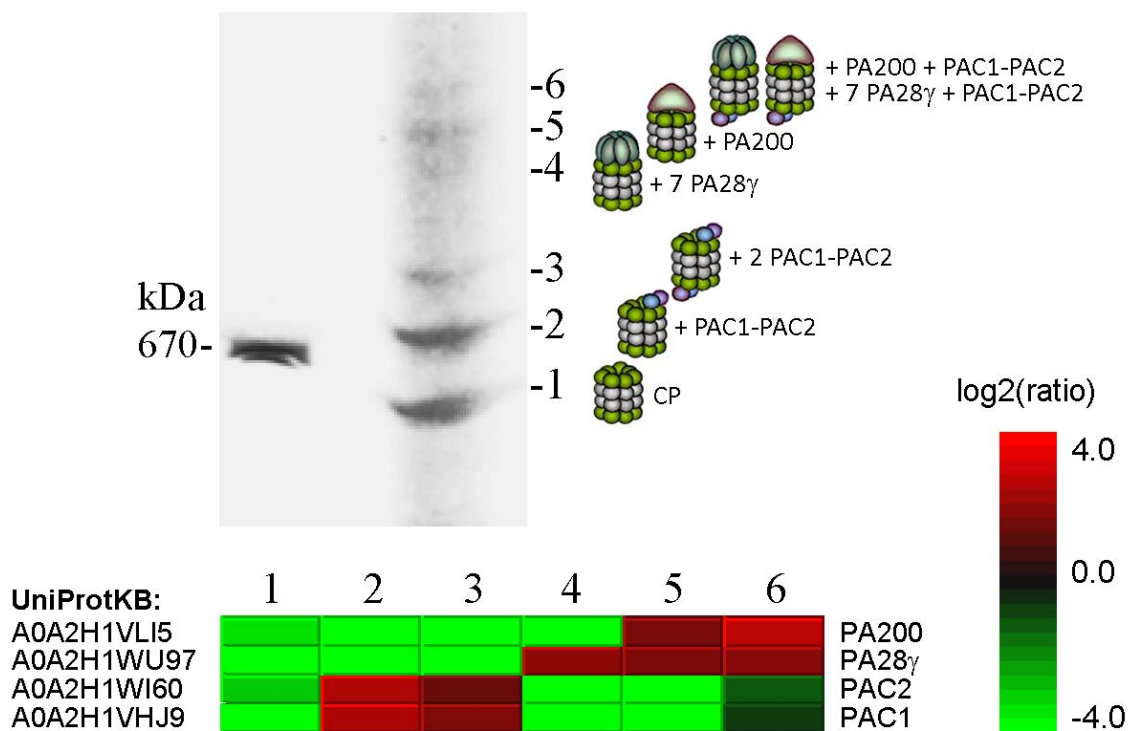


Рисунок 2.2 - Разделение форм 20S протеасом клеток Sf9 нативным электрофорезом в полиакриламидном геле и результаты определения их состава масс-спектрометрией. Цветовая шкала показывает вероятность наличия шаперонов и активаторов в формах 1-6.

Согласно литературным данным активаторы PA28 γ и PA200 регулируют АТФ-независимым образом размер входа в протеолитическую камеру CP. Регуляторная частица RP в 26S протеасомах выполняет ту же функцию, но использует энергию гидролиза АТФ. Коровые частицы CP в препаратах выделенных 26S протеасом после спонтанной диссоциации частиц RP имели разный размер (рисунок 2.3). Это показывает, что в клетках коровые частицы в 26S протеасомах находятся на разных стадиях открытия входа.

Аминокислотные последовательности субъединиц 20S протеасом клеток Sf9 определены нами с помощью секвенирования мРНК, а также путем анализа последовательностей из доступной базы мРНК насекомого *Spodoptera* (<http://bioweb.ensam.inra.fr/spodobase/>). Последовательности были верифицированы масс-спектрометрией и двумерным электрофорезом. Определение первичных структур альфа- и бета-субъединиц 20S протеасомы, активаторов PA28 γ , PA200 и шаперонов PAC1, PAC2 позволило реконструировать филогенетические деревья для этих белков и вычислить относительные скорости дивергенции их аминокислотных последовательностей. Показано, что конститутивные альфа- и бета-субъединицы и активатор PA28 γ наиболее консервативны в эволюции, тогда как активатор PA200, шаперон PAC2, и особенно шаперон PAC1 эволюционируют с большей скоростью.

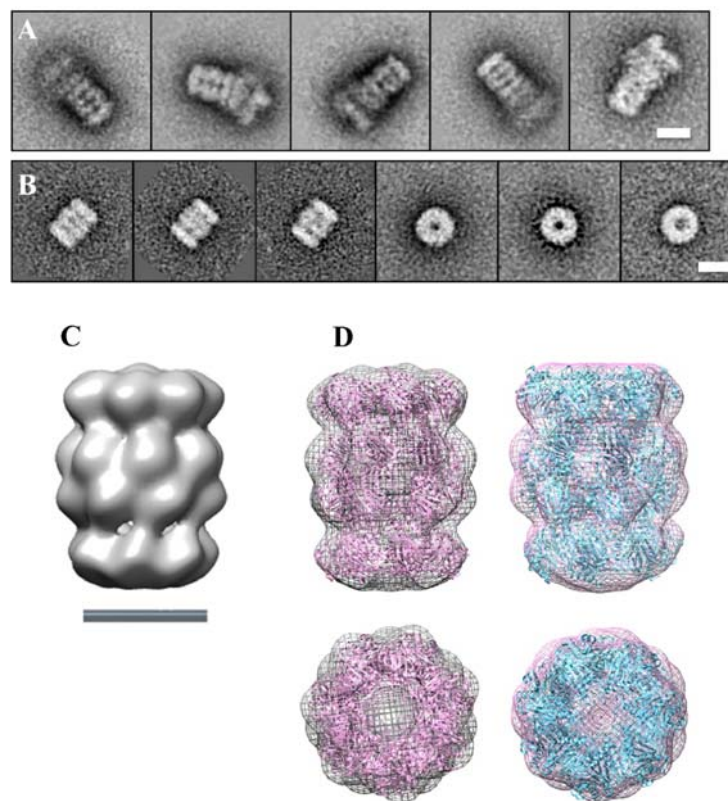


Рисунок 2.3 - Структура протеасом клеток Sf9 по результатам электронной микроскопии. (A) 26S протеасомы с одной RP. (B) 20S протеасомы после отделения RP (3 боковых и 3 торцевых вида). (C) Реконструкция CP. (D) Модели «закрытой» (слева, серая) и «открытой» (справа, розовая) CP. Модели совмещены с атомными структурами соответственно закрытой (розовая) и открытой (голубая) формами 20S протеасомы *T. acidophilum*. Шкала - 10 нм.

2.2.4. Заключение

Впервые из клеток чешуекрылого насекомого выделены и охарактеризованы методами протеомного анализа, электронной микроскопии и биоинформатики множественные формы 20S протеасомы, в том числе комплексы коровой частицы CP с шаперонами PAC1, PAC2 и активаторами PA28 γ , PA200. Наличие в клетках эукариот стабильных функциональных комплексов CP с димерами шаперонов PAC1-PAC2 показано впервые. Обнаружено присутствие в клеточной популяции 26S протеасом коровых частиц на разных стадиях открытия входа в протеолитическую камеру. Определены первичные структуры субъединиц CP клеток Sf9 и проведен филогенетический анализ структурных субъединиц, шаперонов и активаторов 20S протеасомы. Впервые проведено количественное сравнение скоростей дивергенции аминокислотных последовательностей субъединиц, шаперонов и активаторов 20S протеасомы и показана разная скорость эволюции этих функционально важных белков.

2.2.5 Список использованных источников

13 Nickell S., Beck F., Scheres S.H., Korinek A., Förster F., Lasker K., Mihalache O., Sun N., Nagy I., Sali A., Plitzko J.M., Carazo J.M., Mann M., Baumeister W. Insights into the molecular architecture of the 26S proteasome//Proc. Natl. Acad. Sci. U S A - 2009. - Vol. 106(29). - P. 11943-11947. DOI: 10.1073/pnas.0905081106.

14 Lyupina Y.V., Abaturova S.B., Erokhov P.A., Orlova O.V., Beljelarskaya S.N., Mikhailov V.S. Proteotoxic stress induced by *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection of *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells//Virology - 2013. - Vol. 436(1). - P. 49 - 58. DOI: 10.1016/j.virol.2012.10.018.

15 Lyupina Y.V., Zatsepina O.G., Serebryakova M.V., Erokhov P.A., Abaturova S.B., Kravchuk O.I., Orlova O.V., Beljelarskaya S.N., Lavrov A.I., Sokolova O.S., Mikhailov V.S. Proteomics of the 26S proteasome in *Spodoptera frugiperda* cells infected with the nucleopolyhedrovirus, AcMNPV//Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteom. - 2016. - Vol. 864(6). - P. 738 -746. DOI: 10.1016/j.bbapap.2016.02.021.

16 Kravchuk O.I., Lyupina Y.V., Erokhov P.A., Finoshin A.D., Adameyko K.I., Mishyna M.Y., Moiseenko A.V., Sokolova O.S., Orlova O.V., Beljelarskaya S.N., Serebryakova M.V., Indeykina M.I., Bugrova A.E., Kononikhin A.S., Mikhailov V.S. Characterization of the 20S proteasome of the lepidopteran, *Spodoptera frugiperda*//Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteom. - 2019. - Vol. 1867(9). - P. 840-853. DOI: 10.1016/j.bbapap.2019.06.010.

РАЗДЕЛ 3 МЕХАНИЗМЫ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ВЫБОРА И РАЗВИТИЯ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

3.1 Введение

Исследования направлены на решение фундаментальной проблемы клеточных и молекулярных механизмов формирования поведенческих программ в онтогенезе и адаптивной перестройки таких программ у зрелых организмов. В индивидуальном развитии животные проходят фазы, хорошо различимые по характерному для них поведенческому репертуару, обеспечивающему максимальную адаптацию животного к соответствующей среде. Иерархия поведения и особенности реализации поведенческих паттернов на каждой фазе развития соответствуют меняющимся возможностям организации движений и анализа сенсорной информации. В основе, как запуска, так и реализации поведенческих программ лежит активность химически разнородных нейронов [1]. Беспозвоночные животные (моллюски и насекомые), на которых проведены исследования, являются классическими модельными объектом для решения проблем нейробиологии развития и в целом для общей нейробиологии. Моллюски имеют в нервной системе сравнительно небольшое число клеточных элементов, относительно легкодоступных. При этом многие из выявленных к настоящему моменту нейробиологических механизмов являются общими как для высших животных, так и для беспозвоночных.

В настоящее время сформировалось представление, что одной из важнейших основ как для включения отсутствовавших на более ранней стадии развития поведенческих комплексов, так и для адаптации к изменившимся условиям функционирования уже работающих механизмов, является изменение уровня экспрессии нейроспецифических генов в клеточных элементах нервной системы. 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. 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 [1-4].

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. Наши предыдущие исследования поведения комаров показали, что комары способны к тонкому различению 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 задачей серии экспериментов последних лет. При этом исследуется поведение прудовика и возможные нейронные и нейрохимические корреляты при попадании моллюска из воды на сушу. Этот момент является необычной и опасной ситуацией для данного вида пресноводных моллюсков, однако экологически оправдан 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 [5-8]. Сравнительное исследование особенностей

онтогенеза моллюсков, обеспечивающих новые адаптации вида, дает существенную информацию об 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.

3.2 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 аквариума на поверхность, покрытую тонким слоем воды.

Анализ поведения. Применяется стандартное оборудование для видеорегистрации поведения с последующим анализом с использованием программного обеспечения Ethovision XT 13 software (Nodus, the Netherlands). 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 некоторых опытах анализировали влияние предварительной двигательной нагрузки на поведение улитки на сухой стеклянной поверхности в градиенте освещения.

Электрофизиология. Исследование электрической активности редуцированных препаратов – изолированных нейронов, изолированных фрагментов ЦНС, а также полуинтактных препаратов проводилась стандартными методами нейроэтологии с использованием внутриклеточных микроэлектродов [9, 10]. В экспериментах на сенсорной системе комаров применялся разработанный нами уникальный метод акустической стимуляции (рисунок 3.1) с положительной обратной связью, который позволяет зарегистрировать ответы отдельных сенсорных нейронов [11, 12].

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 [9, 10].

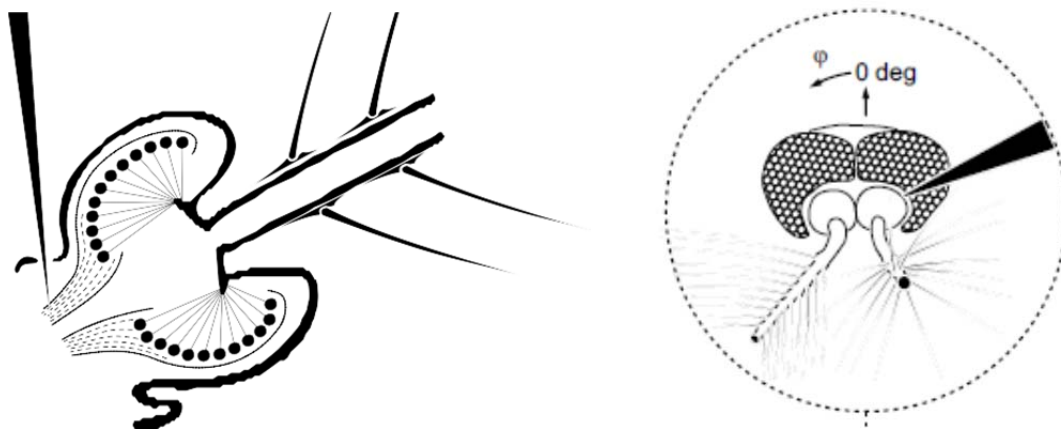


Рисунок 3.1. - Экспериментальная процедура. Голова комара фиксировалась, электрофизиологическая регистрация производилась через отверстие в основании антенны, сигнал от нерва усиливался, оцифровывался и анализировался.

Исследование сократительных реакций амниона. Сократительные реакции доза-ответ изолированной полоски 11-14-суточного амниона регистрировали с помощью изометрических тензодатчиков Ugo Basil 7010-F, системы сбора данных LTR212M-1 (L-CARD) и ПО «PowerGraph 3/3».

Фармакология. Использовались средства коммерческих фирм-производителей нейро- и психофармакологии: серотонин, дофамин, L-DOPA, тапсигаргин, протеаза тип IX - (Sigma-Aldrich®), антитела против ГАМК, серотонина, ГАМК А рецепторов (Abcam).

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 в нейронах.

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

Для изучения экспрессии отдельных генов в нервной системе *Helix lucorum* мы использовали количественную полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и со специфическими праймерами. ОТ-ПЦР является сверхчувствительным методом, с помощью которого может быть обнаружено малое количество молекул РНК,

недоступное для обнаружения другими разновидностями ПЦР. В отличие от ранее используемого нами метода построения библиотеки кДНК с помощью oligo dT или random праймеров ко всем транскриптам, в новом методе выполнялась только амплификация специфического фрагмента мРНК в реакции обратной транскрипции в комплементарную ДНК (кДНК) и далее следовала амплификация уже кДНК, используя традиционный количественный ПЦР. Данный метод показал высокую специфичность к транскриптам, изучаемых нами генов у животных в разных функциональных состояниях.

С помощью программ для дизайна праймеров (Primer Quest, Primer Express, Oligo) были получены последовательности праймеров preHelixSFamid, а также housekeeping гена (домашнего хозяйства) – бета актина (праймеры: forward 5'-AGTGCTTGCCTTGTATGCCT-3' и reverse 5'-AACTTAAGCCCTTCCTGCC-3'). Синтезированные праймеры были проверены с помощью метода полимеразной цепной реакции.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (RT-PCR) была выполнена на гибридаизере StepOne Plus (Applied biosystems, США), который оснащен модифицированным термоблоком VeriFlex, состоящим из шести независимо программируемых модулей, объединенных в стандартном 96-ти луночном формате. Использовали SYBR Green I – интеркалирующий краситель, специфичный к двухцепочечной ДНК (длина волны возбуждения – 497 нм, флуоресценции – 521 нм). Интенсивность флуоресценции SYBR Green I увеличивается на несколько порядков при встраивании в двухцепочечную ДНК. Поэтому в ходе ПЦР при накоплении продукта амплификации сигнал флуоресценции возрастает, образуя кривую сигмоидной формы. Обработку результатов ПЦР выполняли с помощью программы DataAssist V3.01.

В сравнительных исследованиях особенностей онтогенеза моллюсков различных видов мы используем: классические морфологические и гистологические методы, включая сканирующую электронную микроскопию.

Молекулярно-генетические методы - секвенирование отдельных генов и проведение молекулярно-филогенетического анализа. А также исследование онтогенетических циклов моллюсков.

Объекты. Модельный объект – пресноводный легочный моллюск большой прудовик *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 pulmonat – два вида виноградных улиток *Helix lucorum* и *Helix aspersa*. Они также

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

Сверчок *Gryllus bimaculatus* – легко доступен, многие годы поддерживается лабораторная популяция.

Комары *Aedes diaantaeus* N.D.K. (Diptera, Culicidae)- в естественной среде обитания.

Изолированная полоска неиннервированного амниона 11–13-суточного куриного эмбриона.

3.3 Результаты и обсуждение

Медиаторные механизмы в пластичности нейронных ансамблей

Организация поведения предполагает учет текущей ситуации и прошлого опыта [1, 10]. В экспериментах с изоляцией отдельных нейронов локомоторного генератора улитки было показано взаимодействие двух механизмов при формировании текущего паттерна активности: долговременные изменения биофизических свойств клеточной мембраны отражают опыт прежней активности, а межклеточная среда модулирует активность нейронного ансамбля, соответственно текущей ситуации (рисунок 3.2).

Было обнаружено, что активность локомоторных серотониновых нейронов сходна в нервной системе улиток, находившихся все время в аквариуме (С), и у улиток, которые провели в аквариуме два часа после двухчасовой интенсивной локомоции на мелководье (ER). Однако при изоляции нейронов из нервной системы выяснилось, что эндогенная активность и уровень мембранного потенциала выше у нейронов из нервной системы ER животных.

Значимое различие было обнаружено между изолированными контрольными нейронами помещенными между ганглиями и тремя другими группами (Kruskal-Wallis test: $H(3, N = 47) = 28.77$ $p < 0.0015$; $z > 3.6$ для всех трех сравнений) (рисунок 3.3).

Анализ показал, что в нервной системе эти различия компенсируются благодаря экстрасинаптической секреции дофамина, притормаживающей локомоторные нейроны у улиток с опытом наземной локомоции. Различия в активности С и ER изолированных нейронов исчезали, когда клетки помещались в химическое микроокружение своего ганглия. Исследование эффектов микроокружения педального ганглия при помощи подвижных клеток-биосенсоров у С и ER улиток подтвердило различие между ними. Антагонист дофаминовых рецепторов сульпирид повышал электрическую активность локомоторных нейронов в ЦНС ER, но не С улиток. Дофамин снижал частоту электрической активности локомоторных нейронов и у С, и у ER улиток. Полученные

данные показывают участие двух механизмов во взаимодействии прошлого и настоящего опыта на клеточном уровне: внутренние изменения биофизических свойств клеточной мембраны и изменения в межклеточной модулирующей среде [13, 14].

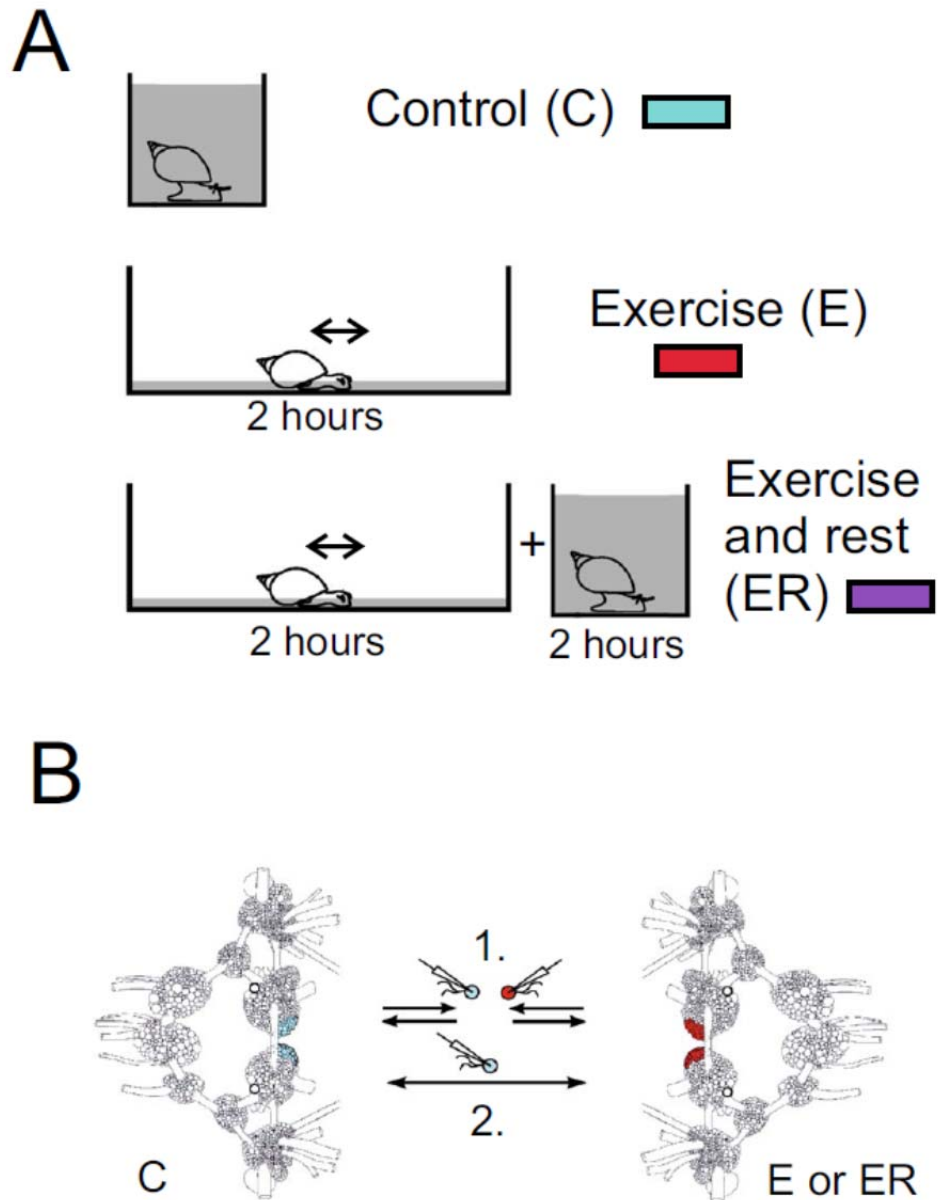


Рисунок 3.2. - Схематическая иллюстрация экспериментальной процедуры. (A) Процедура исследования эффектов усиленной моторной активности (exercise) и отдыха после активности: улитки делились на две группы и помещались по одиночке на два часа в камеру с низкой водой (группа E) или дополнительно отдыхали в нормальной воде (группа ER). Контрольная группа (C) содержалась в цилиндрическом стакане и могла проявлять цилиарную локомоторную активность. (B) Нейроны, закрепившиеся на регистрирующем стеклянном электроде изолировались и отодвигались от ганглия в пространство между ганглиями контрольной и экспериментальной улитки. Изолированные нейроны перемещались, приближаясь к тому или иному ганглию на расстояние (20–25 μm) и удерживались в этой позиции около двух минут. Процедура повторялась несколько раз.

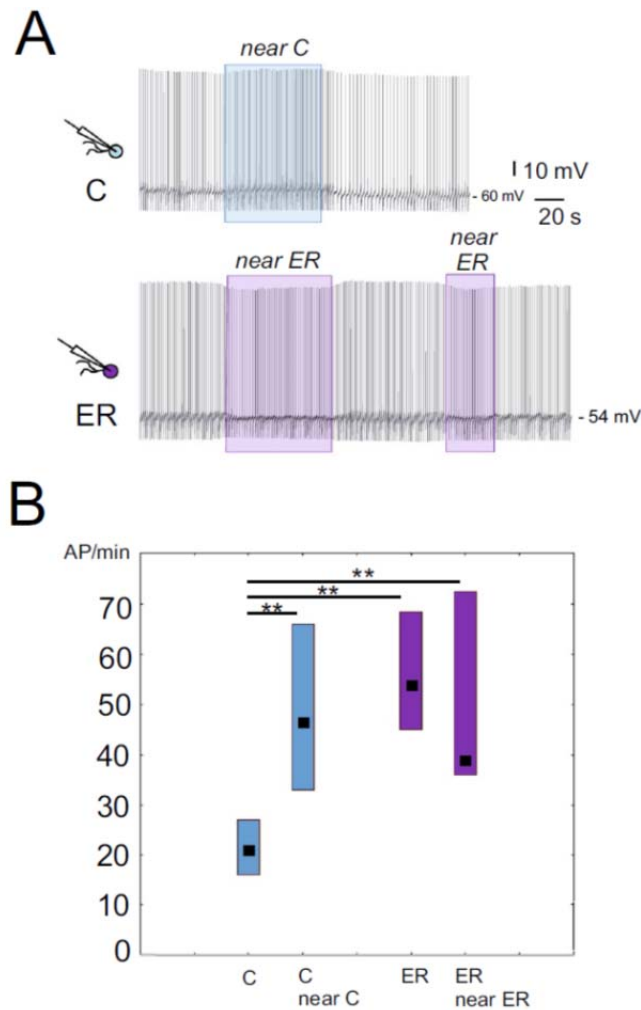


Рисунок 3.3 - Влияние микроокружения педального ганглия на активность изолированного нейрона ReA контрольной и ER улитки. (А) Верхняя кривая - запись активности изолированного нейрона контрольной улитки на расстоянии и при приближении к кластеру ReA клеток своего ганглия. Нижняя кривая – запись активности в том же эксперименте изолированного нейрона из ER улитки при сближении с ReA кластером ганглиев контрольной и своей ER улитки. (В) Медианы частот спайков в минуту (AP/min). Слева направо: изолированный нейрон контрольной улитки на расстоянии (C) и рядом со своим ганглием (n = 14), изолированный нейрон ER улитки на расстоянии и рядом PA кластером своего ганглия (n = 8).

В 2019 году продолжались исследования нейронной организации слуховых органов комаров - Джонстоновых органов (ДО) и роли звуковой сигнализации в организации поведения этих животных [15, 16]. Слуховая система комаров Джонстонов орган представляет собой очень сложно организованную систему, состоящую из сотен сенсорных клеток. Сенсорная система комара имеет две антенны, организованные для анализа скорости колебаний воздуха. Каждый волосок на антенне обслуживается двумя или тремя биполярными клетками, воспринимающими вибрацию и трансформирующую ее в электрический потенциал, который передается в центральную нервную систему. В

этом году микроэлектродная регистрация от эффективно работающих сенсорных клетках комара показала неспайковый механизм распространения и усиления сигнала в отростках клеток, что говорит о распространенности неклассических механизмах работы нервных клеток [15].

Анализ работы сенсорного органа был направлен на подтверждение гипотезы о том, что сенсорные нейроны Джонстонова органа организованы в противофазные пары. Использование метода стимуляции с обратной связью позволило выявлять активность индивидуальных пар нейронов, работающих в противофазе (рисунок 3.4).

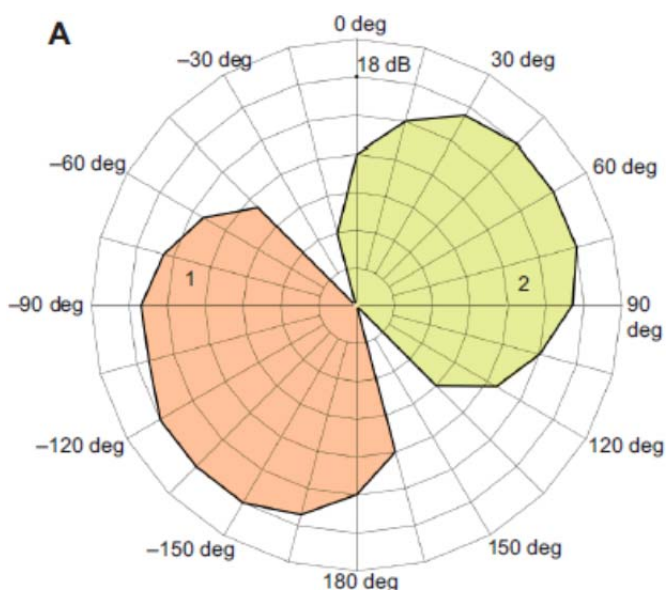


Рисунок 3.4 - Пример полярной организации паттерна активности и дирекциональные характеристики сенсорных клеток Донстонова органа. (А) Полярные паттерны активности пары клеток, работающих в противофазе; наибольшая частота клетки № 1 - 201 Hz а клетки №2 253 Hz. [15, 16].

Ненейрональная холинергическая система в регуляции активности амниона

Потенциалуправляемые кальциевые каналы (VDCCs) T-типа (каналы семейства Cav3: Cav 3.1, 3.2 и 3.3) идентифицированы в нейронах, кардиомиоцитах, гладкомышечных клетках, фибробластах, В-лимфоцитах, представлены в эмбриональных, быстро пролиферирующих и гипертрофированных клетках. Низкопороговые, быстро инактивирующиеся каналы T-типа обеспечивают пейсмекерную активность, участвуют в контроле тонуса сосудов, регуляции клеточного роста, пролиферации и апоптоза. Ткани провизорных органов развиваются из тех же зачатков, что и дефинитивные ткани, но дифференцируются значительно быстрее эмбриональных зачатков зародыша, что обеспечивает их раннюю специализацию. Период от закладки до начала дегенеративных

процессов в амниотической оболочке куриного эмбриона составляет менее двух недель. Гистологически амнион представляет собой двуслойную структуру из двух типов клеток - эпителиальных и гладкомышечных. В амниотической ткани отсутствуют нервные элементы, что показано как для зародышей птиц, так и млекопитающих.

Исследовали механизмы холинергической регуляции в неиннервированном амнионе куриного эмбриона. Ранее была проведена фармакологическая идентификация холинергических рецепторов амниона. Было показано, что сократительные реакции в амнионе куриного эмбриона, вызванные карбахолом, опосредуются М3-холинорецепторами и ионами Ca^{2+} , входящими через потенциалуправляемые каналы L-типа и мобилизуемыми из внутриклеточных запасов через инозитолтрифосфатные и рианодиновые рецепторы. Для специфических М-антагонистов порядок холинолитической активности ($-\log IC_{50}$) в отношении реакции на карбахолин (КБХ) составил: 4-DAMP (М3) – 8.29 > тропикамид (М4) – 6.97 > пирензепин (М1) – 5.85 > метоктрамин (М2) – 5.63.

Кумулятивное введение блокатора L/T-каналов мибефрадила (0,1 мкМ - 10 мкМ) или блокатора T-каналов NNC 55-0396 (0,1 мкМ - 10 мкМ) приводило к дозозависимому торможению сократительной активности амниона, вызванной карбахолом (50 мкМ). При сравнении с действием нифедипина, блокатора кальциевых каналов L-типа, порядок их ингибиторной активности согласно величине IC_{50} составил следующую последовательность: нифедипин ($0,16 \pm 0,8$ мкМ) > мибефрадил ($4,32 \pm 2,0$ мкМ) > NNC 55-0396 ($6,08 \pm 1,27$ мкМ). Величина максимальной реакции составляла $83 \pm 8\%$, $85 \pm 14\%$, $67 \pm 9\%$, соответственно. Нифедипин (0,1 - 1 мкМ) и NCC 55-0396 (0,1 - 5 мкМ) взаимно усиливали реакции друг друга: нифедипин, введенный на фоне действия NCC 55-0396, потенцировал вызванное NCC 55-0396 торможение и наоборот. Введение мибефрадила 5 мкМ на фоне NCC 5 мкМ приводило к усилению ингибирования до полного прекращения сократительной тонической реакции.

Полученные данные позволяют предполагать наличие как L-типа, так и T-типа потенциалзависимых кальциевых каналов в гладких мышцах амниона куриного эмбриона и подтверждают функциональную роль T-каналов в вызванной карбахолом сократительной активности амниона и поддержании его тонуса [17].

Функциональное значение изменения уровня экспрессии нейронспецифических генов моллюсков

Продолжено исследование ранее найденного нами гена, кодирующего предшественник (preHelixSFamid) - одного из представителей большого семейства

педальные пептиды/оркокинины. Ранее мы показали, что этот ген экспрессируется в группе серотонинергических клеток педального ганглия *Helix lucorum*, вовлеченных в модуляцию работы нейросети. Последовательность *preHelixSFamid* гомологична последовательности таких пептидов, как *LymnaeDFamide* и педального пептида тритонии. Препротейн *preHelixSFamid* состоит из гидрофобного лидера в N-концевой части и десяти предположительно амидируемых пептидов (рисунок 3.5).

Leu Leu Val Lys Glu Thr Met Glu Lys **Arg Arg** Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Pro Phe Gly Ser Phe Gly **Lys Arg Arg** Glu Asp Glu Glu Lys **Arg Arg** Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly **Lys Arg** Lys Glu Glu Lys **Arg Arg** Phe Asp Ser Ile Ser Gly Leu Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly **Lys Arg** Glu Asp Gly Glu Lys **Arg Arg** Phe Asp Ala Ile Ser Gly Leu Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly **Lys Arg** Asp Asp Gly Glu Lys **Arg Arg** Phe Asp Ser Ile Ser Gly Leu Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly **Lys Arg** Arg Gly Glu Lys **Arg Arg** Phe Asp Ser Ile Ser Gly Leu Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly **Lys Arg** Asp Asp Gly Glu Lys **Arg Arg** Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Pro Phe Gly Ser Phe Gly **Lys Arg** Asn Asp Glu Glu Lys **Arg Arg** Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Ser Phe Gly Ser Tyr Gly **Lys Arg** Glu Asp Glu Glu Lys **Arg Arg** Phe Asp Ser Ile Ser Gly Leu Ser Ser Phe Gly Ser Phe Gly **Lys Arg** Glu Asp Gly Glu Lys **Arg Arg** Phe Asp Ser Ile Ser Gly His Ser Ser Phe Gly Ser Tyr Gly **Lys Arg** Lys Lys Lys Arg Asp Asp Leu Ile Leu Phe Leu Ala

Рисунок 3.5 - Первичная структура белка, кодируемого геном *preHelixSFamid*. Курсивом выделены пептиды, жирным шрифтом – места протеолиза, подчеркнут гидрофобный лидер в N-концевой части белковой молекулы.

Картировали транскрипции изучаемого гена у взрослых животных указывало на возможное участие пептиды *preHelixSFamid* в организации пищевого поведения виноградной улитки. Проведенные на прошлом этапе исследование показало, что на препаратах ЦНС голодных улиток после проведения гибридизации *in situ* выявляется на 20-40% больше *preHelixSFamid*-экспрессирующих нейронов в плевральных ганглиях и в процеребруме.

Результаты ПЦР в реальном времени подтверждают ранее полученные данные методами *in situ* гибридизации и иммуногистохимии. Увеличение экспрессии *preHelixSFamida* происходит во всех представленных ганглиях, но наиболее резко в процеребруме, метацеребруме и в буккальном ганглиях. Наивысший уровень экспрессии наблюдается в педальном ганглии.

Мы изучали закономерность изменений в паттерне распределения в нервной системе экспрессии изучаемого гена *preHelixSFamid*, сопоставляя результаты с использованием более точного ОТ ПЦР. Экспрессию *preHelixSFamid* исследовали в пяти

ганглиях – в буккальном, плевральном, педальном, висцеральном и в процеребруме. Экспрессия была нормализована по экспрессии гена бета актина. Были поставлены эксперименты по исследованию зависимости уровня экспрессии гена *preHelixSFamid* от состояния насыщения животного. Для этого четыре группы животных (по 6 улиток) содержали в течение 14 дней в активном состоянии. При этом первая группа пищи не получала, а вторая получала *ad libitum* (контроль). Третья и четвертая группы были аналогичны первой и второй, но в конце эксперимента улиткам наносили надрез на задний участок ноги (хвоста) чтобы оценить влияние стрессорного воздействия, вызывающего у улитки долго длящееся состояние активации оборонительной реакции. Как показали результаты ОТ-ПЦР, данная процедура не влияла на экспрессию изучаемого гена. Экспрессия *preHelixSFamid* полностью зависела от доступности пищи для экспериментальных животных. Концентрация мРНК *preHelixSFamid* в ЦНС голодных улиток значительно превышает концентрацию мРНК данного гена у сытых животных, особенно в плевральных, буккальных ганглиях и в процеребруме (рисунок 3.6).

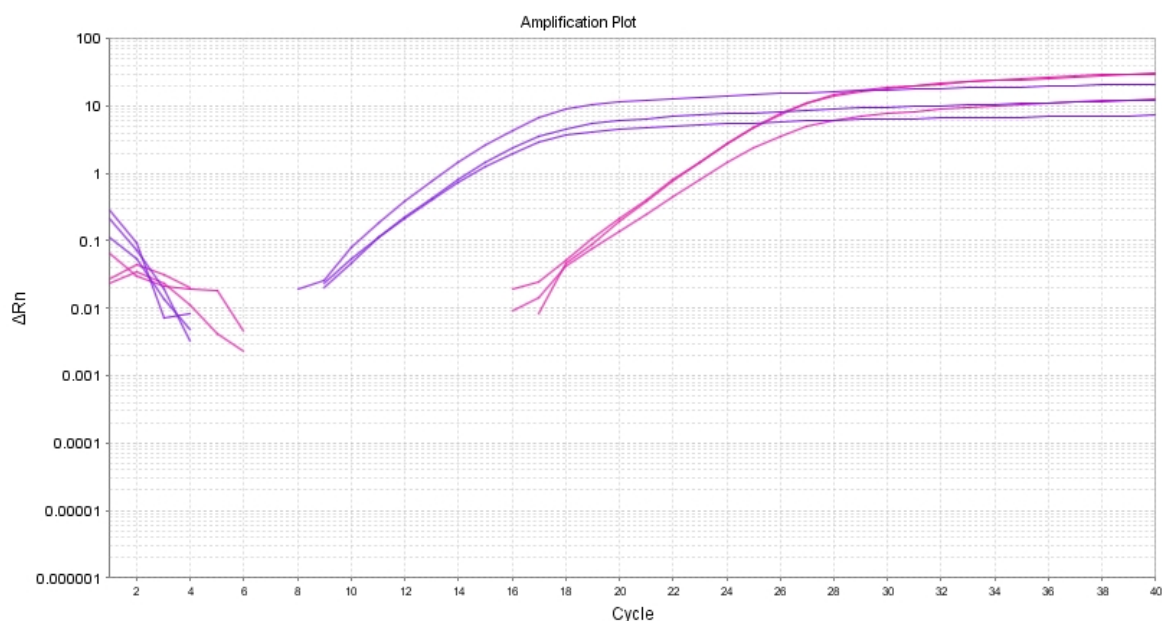


Рисунок 3.6 - ОТ-ПЦР *preHelixSFamid* у голодных ($St=12,99\pm 0,3$ синие кривые) и сытых ($St=21,66\pm 0,32$ красные кривые) улиток. Концентрация мРНК *preHelixSFamid* у голодных почти в 1000 раз выше концентрации мРНК сытых улиток. График кривой амплификации представлен в виде логарифмической функции $\text{Log}(\Delta R_n)$ от номера цикла. St – пороговый цикл (значение количества циклов реакции, при котором кривая амплификации и прямая порога чувствительности прибора пересекаются).

Была продолжена начатая ранее серия экспериментов, направленных на выявление генов, которые могут участвовать в формировании стабильных состояний генератора локомоции. Подтверждены полученные ранее предварительные данные о пространственном распределении изменений экспрессии и особенностях этой динамики

при разных по продолжительности локомоторных нагрузках.

Были продолжены исследования, посвящены отбору модельных объектов, удобных для экспериментального анализа клеточных механизмов перестроек поведения и сравнительных онтогенетических исследований [18]. Получены важные результаты по эволюционной истории морских беспозвоночных животных. Выявлены общие закономерности, объединяющие онтогенетическое развитие и биологическое разнообразие организмов [19-24].

3.4 Заключение

Подводя итог исследованиям отчетного периода, можно заключить, что полученные данные подтверждают развиваемую коллективом оригинальную гипотезу о координирующей роли нейроактивного состава межклеточной среды, который социализирует индивидуальные нейроны и удерживает их в актуальном поведенческом контексте. В целом проблематика исследований, вполне актуальна, соответствует мировым тенденциям в нейронауке. Исследования проводились преимущественно на модельных объектах – на нескольких видах беспозвоночных животных. Однако полученные данные могут быть существенны для понимания пластичности и у высших животных, учитывая, что принципы функционирования нервной системы сформировались на очень ранних этапах эволюции нервной системы.

Представляется перспективным развитие направлений, связанных с поиском молекулярно-генетических механизмов адаптивной пластичности: поиском генов, изменение экспрессии которых коррелирует с изменением мотивационного состояния животного и пластическими модификациями поведения. Следует двигаться в направлении описания механизмов таких эпигенетических регуляций и сигнальных каскадов, регулирующих такие адаптивные эпигенетические регуляции. В ближайшей перспективе следует расширить список маркеров, которые могли бы более полно показать гены, вовлеченные в мотивационные переключения.

Очень перспективным представляется аспект проводимых исследований, связанный с развитием ранее сформулированного положения о близости механизмов онтогенетической пластичности поведения и адаптивной пластичности. Речь идет о включении и выключении на определенных этапах эмбрио- и постэмбриогенеза поведенческих программ, их адаптации к реальным условиям реализации [18] – с одной стороны, и той формой пластичности, которая относится к многочисленным формам обучения и переключения поведения – с другой стороны.

3.5 Список использованных источников

- 1 Дьяконова В.Е., Сахаров Д.А. Пострефлекторная нейробиология поведения. Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. – М.: Издательский дом ЯСК, 2019, – 589 с. – (Разумное поведение и язык). Послесловие проф. А.Г. Асмолова. – ISBN 978-5-907117-52-5.
- 2 Zhong, G., Shevtsova, N.A., Rybak I.A. and Harris-Warrick R. M.. Neuronal activity in the isolated mouse spinal cord during spontaneous deletions in fictive locomotion: Insights into locomotor CPG organization // *J. Physiol.* - 2012. - Vol. 590. - P. 4735-4759.
- 3 Gadboisa S., Sieverta O., Reevea C., Harrington F.H. Fentress J.C Revisiting the concept of behavior patterns in animal behavior with an example from food-caching sequences in Wolves (*Canis lupus*), Coyotes (*Canis latrans*), and Red Foxes (*Vulpes vulpes*) // *Behavioural Processes.* - 2015. - Vol. 110. - P. 3–14.
- 4 Zengin-Toktas Y1, Woolley SC1. Singing modulates parvalbumin interneurons throughout songbird forebrain vocal control circuitry // *PLoS One.* -2017 Feb 24; -Vol 12(2): e0172944. doi: 10.1371/journal.pone.0172944.
- 5 Anreiter I., Biergans S. D. and Sokolowski M. B. Epigenetic regulation of behavior in *Drosophila melanogaster*//*Current Opinion in Behavioral Sciences.* - 2019, - Vol. 25:44–50.
- 6 Norouzitallab P., Baruahb K., Vanrompay D., Bossier P. Can epigenetics translate environmental cues into phenotypes? //*Science of the Total Environment.* - 2019. -Vol. 647. - P. 1281–1293
- 7 Sweatt J. D. The epigenetic basis of individuality// *Current Opinion in Behavioral Sciences.* -2019. -Vol. 25. - P. 51–57
- 8 Korneev, S. A. et al. Axonal trafficking of an antisense RNA transcribed from a pseudogene is regulated by classical conditioning // *Sci Rep,* -2013. 3, e1027.
- 9 Chistopolsky I.A., Sakharov D.A. Biosensors detect patterned chemical signals generated by network of neurons// *Simpler Nervous Systems (VII East European conference of ISIN),* -2006 - P. 122.
- 10 Dyakonova V.E., Hernádi L., Ito E., Dyakonova T.L., Chistopolsky I.A., Zakharov I.S., Sakharov D.A. The activity of isolated neurons and the modulatory state of an isolated nervous system represent a recent behavioural state // *J. Exp. Biol.* -2015. -Vol. 218 (Pt 8). P.1151-1158.
- 11 Lapshin D.N., Vorontsov D.D. Frequency tuning of individual auditory receptors in female mosquitoes (Diptera, Culicidae) // *J. Insect Physiol.,* -2013. -Vol. 59. Is. 8. P. 828-839.
- 12 Lapshin D.N., Vorontsov D.D. Frequency organization of the Johnston’s organ in male mosquitoes (Diptera, Culicidae) // *Journal of Experimental Biology,* -2017. -Vol. 220. P.

3927-3938; doi: 10.1242/jeb.152017

11 Dyakonova T.L., Sultanakhmetov G.S., Mezheritskiy M.I., Sakharov D.A., Dyakonova V.E. Storage and erasure of behavioural experiences at the single neuron level // *Scientific reports*. - 2019. - Vol. 9(1). - P. 14733. DOI: 10.1038/s41598-019-51331-5.

12 Dyakonova T., Dyakonova V., Mezheritskiy M. Past and present at the level of a single motor neuron. Abstracts of EMBO|EMBL Symposium: Probing Neural Dynamics with Behavioural Genetics EMBL Heidelberg, Germany, 10 - 13 April 2019. MERA Print & Design, Sandhausen, Germany. p. 66.

15 Vorontsov D.D., Lapshin D.N. Non-spiking signal transmission in the mosquito auditory neurons. Abstracts of 1st Symposium on Invertebrate Neuroscience. 13-17 August 2019. Tihany, Hungary. Balaton limnological institute. MTA Center for ecological research. p.46.

16 Lapshin D.N., Vorontsov D.D. Directional and frequency characteristics of auditory neurons in *Culex* male mosquitoes // *Journal of Experimental Biology*. - 2019. - Vol. 222. - P. 21. DOI: 10.1242/jeb.208785.

17 Бойко О. В. Функциональная роль кальциевых каналов Т-типа в сократительных реакциях амниона куриного эмбриона на карбахол. Материалы XVIII Конференции-школы с международным участием с темой «Актуальные проблемы биологии развития» 14-19 октября 2019г. М. Издательство Перо, 2019. стр. 30-31

18 Katz P. S. Neural mechanisms underlying the evolvability of behavior// *Phil. Trans. R. Soc. B* -2011. - Vol. 366, 2086-2099. doi: 10.1098/rstb.2010.033618

19 Korshunova T., Nakano R., Fletcher K., Sanamyan N., Martynov A. First molecular confirmation of the presence of *Dendronotus primorjensis* Martynov, Sanamyan & Korshunova, 2015 in Japan and new distributional records of *Dendronotus* species in the North Pacific (Nudibranchia: Dendronotidae) // *Venus. Journal of the Malacological Society of Japan*. - 2019. - Vol. 77. № 1-4. - P. 1-14).

20 Korshunova T. The extraordinary genus *Myja* is not a tergipedid, but related to the Facelinidae s. str. with the addition of two new species from Japan (Mollusca, Nudibranchia) // *ZooKeys*. - 2019. - Vol. 818. - P. 89-116. DOI: 10.3897/zookeys.818.30477.

21 Korshunova T., Mehrotra R., Arnold S., Lundin K., Picton B., Martynov A. The formerly enigmatic Unidentiidae in the limelight again: a new species of the genus *Unidentia* from Thailand (Gastropoda: Nudibranchia) // *Zootaxa*. - 2019. - Vol. 4551. - N. 5. - P. 556-570. DOI: 10.11646/zootaxa.4551.5.4.

22 Korshunova T., Picton B., Furfaro G., (...), Lundin K., Martynov A. Multilevel fine-scale diversity challenges the ‘cryptic species’ concept // *Scientific Reports*. - 2019. - Vol. 9(1). -

P. 6732. DOI: 10.1038/s41598-019-42297-5.

23 Sanamyan K., Sanamyan N., Martynov A., Korshunova T. A new species of *Ernstia* (Porifera: Calcarea) described from marine aquarium // *Zootaxa*. - 2019. – Vol. 4603(1). - P. 192-200. DOI: 10.11646/zootaxa.4603.1.11.

24 Sanamyan N.P., Sanamyan K.E., McDaniel N., (...), Korshunova T.A., Bocharova E.S. A revision of sea anemones of the genus *Cribrinopsis* Carlgren, 1921 (Actiniaria: Actiniidae) from British Columbia with the description of a new species // *Marine Biodiversity*. - 2019. - Vol. 49. Is. 4. - P. 1951-1969. DOI: 10.1007/s12526-019-00956-w.

РАЗДЕЛ 4 НЕЙРОГУМОРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ И ФОРМИРОВАНИЯ АДАПТИВНЫХ ПРОГРАММ НА ПРИМЕРЕ ЛИЧИНОК ВОДНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И НИЗШИХ

4.1 Введение

В последнее время всё более актуальными становятся исследования роли серотонина (5-НТ) как регулятора раннего развития и поиск механизмов, лежащих в основе его эпигенетического действия. Одним из возможных механизмов таких долговременных эффектов серотонина может являться серотонилирование – трансклутаминаз-опосредованная посттрансляционная модификация белков, приводящая к изменению их активности. Регуляции, осуществляемые через вновь открытый механизм серотонина, затрагивают циклические процессы, многие из которых проявляются отложено и сохраняются на длительное время. Хотя давно известно, что серотонин и другие моноамины обнаруживаются в зародышах с самых ранних стадий развития и участвуют во множестве физиологических процессов, роль трансклутаминаз-зависимого моноамилирования (серотонилирования) на клеточную дифференцировку в раннем развитии не исследовалась. Ранее сотрудниками ИБР РАН было установлено, что все компоненты синтеза и захвата 5-НТ экспрессируются в локальных нейронных сетях репродуктивной системы материнского организма, оказывая влияние на эмбриональное развитие и формирование поведения потомков. Продолжение этой работы посвящено обнаружению внутриклеточных механизмов, обеспечивающих передачу серотонин-опосредованного эпигенетического сигнала на стадиях раннего развития.

4.2 Материалы и методы

Работы проводили на развивающихся зародышах, личинках и мальках: пресноводного брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis*, морского двустворчатого моллюска *Mytilus trossulus*, морского ежа *Mesocentrotus nudus*, костистой рыбы *Danio rerio*. Взрослые особи и личинки морской губки *Haliclona aqueductus* и *Halichondria panicea* были собраны в природе. Для изучения распределения серотонина в раннем развитии использовался метод фармакологического модулирования уровня синтеза серотонина (инкубация в предшественнике серотонина, 5-НТР) и активности трансклутаминазы (инкубация в блокаторе трансклутаминазы цистамине). Вызванные изменения в уровне серотонина внутри бластомеров выявлялись методом иммунохимического маркирования. Для подтверждения достоверности выявляемых изменений в уровне серотонина использовались антитела, производимые четырьмя разными фирмами, выработанные в разных животных. В качестве контроля

использовалось предварительное осаждение специфических антител коммерческим комплексом, к которому были произведены антитела. Препараты после иммунохимического маркирования изучались с использованием конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica, Wetzlar, Germany). Контрольные и экспериментальные образцы сканировались при одних и тех же параметрах настройки. Измерение яркости флуоресценции проводилось с использованием коммерческих программ.

Подтверждение наличия и изменение содержания серотонилированных белков оценивали с помощью Вестер-блоттинга и дот-блоттинга. Выявляли во всех случаях серотонин-иммуноположительные полосы или круги. Содержание белков оценивали полуколичественным методом путем измерения яркости соответствующих полос или кругов с помощью программы ImageJ.

Выявление внутриклеточных структур жгутиковых клеток губок проводили с использованием сканирующей и электронной микроскопии. Препараты готовили по стандартной методике. Анализ препаратов проводили на 60 нанометровых срезах, приготовленных с помощью ультрамикротомы Leica EM UC6 с использованием электронных микроскопов JEM 1400 и Morgagni 268 D. Для сканирующей электронной микроскопии использовали микроскопы Quanta 250 и Hitachi S-465A.

4.3 Результаты и обсуждение

Для подавляющего большинства водных беспозвоночных и низших позвоночных характерно наружное оплодотворение с развитием зародыша вне материнского организма. Такая стратегия развития делает их удобными модельными объектами для исследования изменений, вызванных изменением уровня серотонина в среде, а затем и внутри blastomeres на ранних стадиях развития. В процессе выполнения задач, стоящих в рамках реализации госзадания, были получены нижеописанные результаты, лежащие в рамках заявленных планов.

Детально изучены ранние стадии дробления модельных первичноротых (морские и пресноводные моллюски) и вторичноротых (морские ежи, костистая рыба) животных в условиях повышенного уровня серотонина в среде. Впервые показано, что антитела к серотонину выявляют модифицированные белки в ядрах зародышей всех исследованных видов: пресноводного брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis*, морского двустворчатого моллюска *Mytilus trossulus*, морского ежа *Mesocentrotus nudus*, костистой рыбы *Danio rerio*. Выявлено распределение серотонилированных белков в blastomeres или blastodermis, которое варьирует в зависимости от стадии клеточного деления. Прослежено изменение определенных пулов серотонилированных белков с ответ на увеличение

серотонина в среде и блокаду серотонилирования [1].

Предложен механизм трансглутаминаз-опосредованной посттрансляционной модификации ядерных белков на стадиях раннего дробления зародышей (рисунок 4.1).

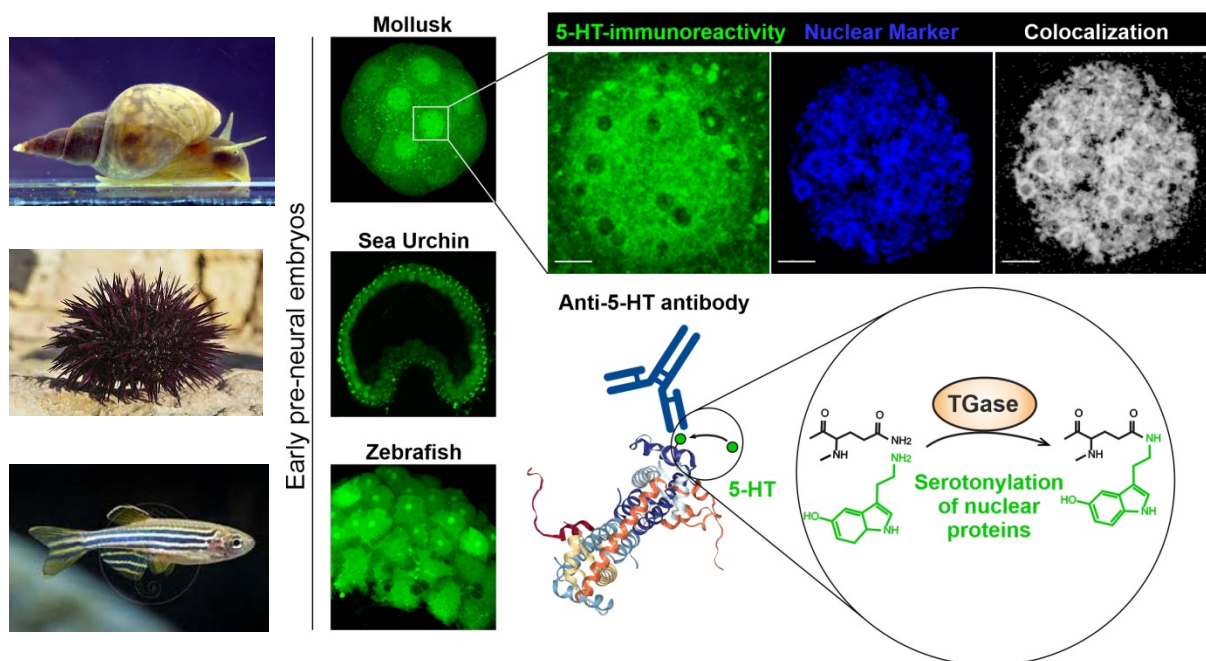


Рисунок 4.1 - Антитела к серотонину выявляют специфические белки в ядрах дробящихся клеток зародышей моллюска, морского ежа и данио. Уровень иммунореактивности зависит как от концентрации серотонина, так и от активности трансглутаминазы в клетках.

Губки считаются самыми древними из существующих многоклеточных организмов. Они состоят из нескольких типов клеток, среди которых клетки со жгутиками играют важную роль в улавливании и захвате пищи (у взрослых организмов) и при расселении (свободноплавающие личиночные стадии). Было детально изучено строение кинетиды жгутиков у личинок и кинетиды жгутиковых клеток хоаноцитных камер у взрослых губок [2]. Показано, что строение кинетиды у личинки гораздо сложнее кинетиды жгутиковой клетки хоаноцита, и включает специфические продольные и поперечные элементы, усиливающие жгутик. Впервые обнаружены тубулин-содержащие корешки, связывающие кинетосому с митохондрией. Кроме этого, только у личинок отмечено перманентное возникновение добавочной центриоли в жгутиковой клетке. Метод иммунохимического маркирования оказался продуктивным для исследования патологий [3]. Возможно, всё возрастающее внедрение в клиническую диагностику самых современных достижений и технологий позволит в ближайшем будущем широко использовать эту методику для диагностических целей.

4.4 Заключение

Сравнение строения кинетиды жгутиковых клеток выявило более сложное строение у личинок, чем у взрослых особей, у одних из самых древних многоклеточных животных – губок.

В ходе анализа полученных результатов показана возможность серотонилирования ядерных белков в клетках дробящегося зародыша, каждая из которых дает начало множеству тканей формирующегося организма. Обнаруженный факт посттрансляционной модификации на таком уровне позволяет говорить о существенной роли серотонина в адаптивных реакции организма, начиная с самых ранних стадий развития.

4.5 Список использованных источников

1 Ivashkin E., Melnikova V., Kurtova A., Brun N.R., Obukhova A., Khabarova M.Y., Yakusheff A., Adameyko I., Gribble K.E., Voronezhskaya E.E. Transglutaminase Activity Determines Nuclear Localization of Serotonin Immunoreactivity in the Early Embryos of Invertebrates and Vertebrates // *ACS Chemical Neuroscience*. - 2019. - Vol. 10(8). - P. 3888-3899. DOI: 10.1021/acscemneuro.9b00346.

2 Sokolova A.M., Pozdnyakov I.R., Ereskovsky A.V., Karpov S.A. Kinetid structure in larval and adult stages of the demosponges *Haliclona aqueductus* (Haplosclerida) and *Halichondria panicea* (Suberitida) // *Zoomorphology*. - 2019. - Vol. 138(3). - P. 171-184. DOI: 10.1007/s00435-019-00437-5.

3 Erokhina M.V., Lepkha L.N., Voronezhskaya E.E., Nezlin L.P., Avdienko V.G., Ergeshov A.E. Application of Laser Scanning Confocal Microscopy for the Visualization of *M. tuberculosis* in Lung Tissue Samples with Weak Ziehl-Neelsen Staining // *Journal of Clinical Medicine*. - 2019. - Vol. 8. - Is. 8. DOI: 10.3390/jcm8081185.

РАЗДЕЛ 5 СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОГЕННЫХ АМИНОВ В КЛЕТКАХ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

5.1 Введение

В эндотелиальных (ЭК) и гладкомышечных клетках (ГМК) кровеносных сосудов экспрессируются многочисленные рецепторы биогенных аминов – катехоламинов, гистамина и серотонина. Несмотря на многолетние работы по изучению их физиологических функций и молекулярно-клеточных механизмов действия, по-прежнему остаются невыясненными отдельные аспекты их работы. В реализации действия этих агонистов на клетки участвуют вторичные мессенджеры Ca^{2+} и цАМФ. В последние годы появились данные о том, что функцию вторичного мессенджера выполняет перекись водорода. Одним из основных источников образования H_2O_2 в клетках являются ферменты НАДФН-оксидазы. В ряде случаев показано, что активность этих ферментов увеличивается под действием нейроэндокринных факторов. При этом H_2O_2 и другие активные формы кислорода (АФК) регулируют нормальные физиологические процессы, а при избыточном производстве начинают оказывать патогенные эффекты. Роль активных форм кислорода в реализации физиологического действия биогенных аминов в кровеносных сосудах до конца не изучена, и это было одним из предметов исследований в 2019 г. Данная работа проводилась на культуре ЭК. Второй вопрос касался механизмов регуляции обмена ионов кальция в ГМК сосудов и роли в этом процессе кальциевых каналов, локализованных в лизосомах и близких к ним по свойствам эндолизосомальных везикулах. Эти каналы активируются вторичным мессенджером NAADP (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate), имеют особый тип строения и носят название двупоровые каналы (two-pore channels – ТРС).

5.2 Методы исследования

1.ЭК выделяли из пупочной вены (HUVES) и культивировали в среде M199 с 20% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота и эндотелиальной ростовой добавки, полученной из мозга кролика [1]. Клетки идентифицировали по морфологическим критериям и по наличию фактора Виллебранда, ангиотензинпревращающего фермента, поверхностных белков CD31, CD54.

2.Первичную культуру ГМК получали из аорты молодых крыс (вес до 150 г). Культивирование ГМК проводили в среде DMEM, содержащей 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота [2].

3. Определение концентрации ионов кальция в цитоплазме ЭК и ГМК проводили с помощью флуоресцентных зондов CalciumGreen и Fura2 [1,2].

4. Силу сокращения изолированных колцевых фрагментов аорты крысы проводили в изометрическом режиме [2].

5. Определение количества секретируемого эндотелиальными клетками фактора Виллебранда определяли методом иммуноферментного анализа [3].

6. Образование активных форм кислорода определяли с помощью флуоресцентного зонда дигидроэтидиума [3].

5.3 Результаты и обсуждение

В реализации физиологического действия гормонов и нейротрансмиттеров ключевую роль играют ионы кальция. Было исследовано, какое влияние перекись водорода оказывает на регуляцию обмена ионов кальция эндотелиальных клетках кровеносных сосудов [1]. Как показано на рисунке 5.1, перекись водорода избирательно усиливает кальциевый сигнал в ответ на серотонин (5-НТ). Эффекты агониста тромбиновых рецепторов 1-го типа SFLLRN, брадикинина, гистамина и АДР не изменяются. Показано, что эффекты серотонина в ЭК опосредованы рецепторами 5HT1B и 5HT2B-типов. Установлено, что перекись водорода в концентрациях, при которых она образуется в кровеносных сосудах, переводит 5HT1B- и 5HT2B-рецепторы из латентного состояния в активное состояние, в котором данные рецепторы приобретают способность вызывать подъём концентрации ионов кальция в эндотелиальных клетках.

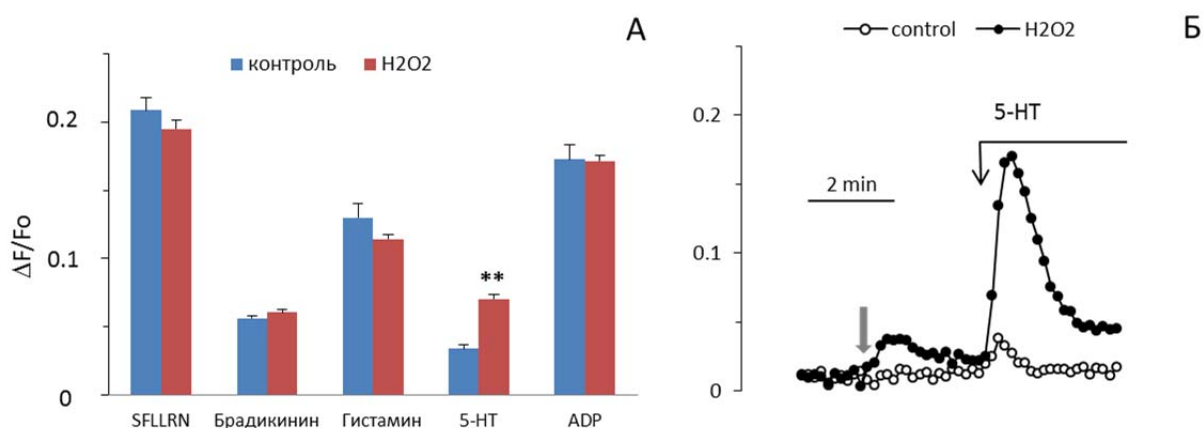


Рисунок 5.1 - (А) Влияние агонистов на $[Ca^{2+}]_{цит}$ в клетках HUVEC в отсутствие и в присутствии H_2O_2 . (В) Кинетика изменений $[Ca^{2+}]_{цит}$ на в ответ добавление 5-НТ в отсутствие и в присутствии H_2O_2 . Концентрация H_2O_2 составила 100 мкМ. Серая стрелка указывает на добавление H_2O_2 или буфера. Концентрации агонистов были 5 мкг / мл для SFLLRN, 10^{-7} М для брадикинина и 10^{-5} М для гистамина, 5-НТ или АДФ. Каждое значение представляет собой среднее от 6 до 9 измерений + SEM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Гистамин высвобождается тучными клетками и является одним из наиболее мощных провоспалительных факторов. Помимо провоспалительного действия гистамин стимулирует секрецию фактора Виллебранда, индуцируя, таким образом, образование тромбов в микрососудах. Поиски эффективных антигистаминных препаратов является актуальной задачей. Мы обнаружили принципиально новый способ подавления эффекта гистамина [3]. Оказалось, что блокирование активности НАДФН-оксидаз, ферментов, осуществляющих синтез супероксиданиона и перекиси водорода, соединением VAS2870 приводит к полному подавлению действия гистамина на $[Ca^{2+}]_{цит}$, опосредованного рецепторами H1-типа (рисунок 5.2). Одновременно с этим происходит блокирование вызванной гистамином секреции фактора Виллебранда (рисунок 5.3).

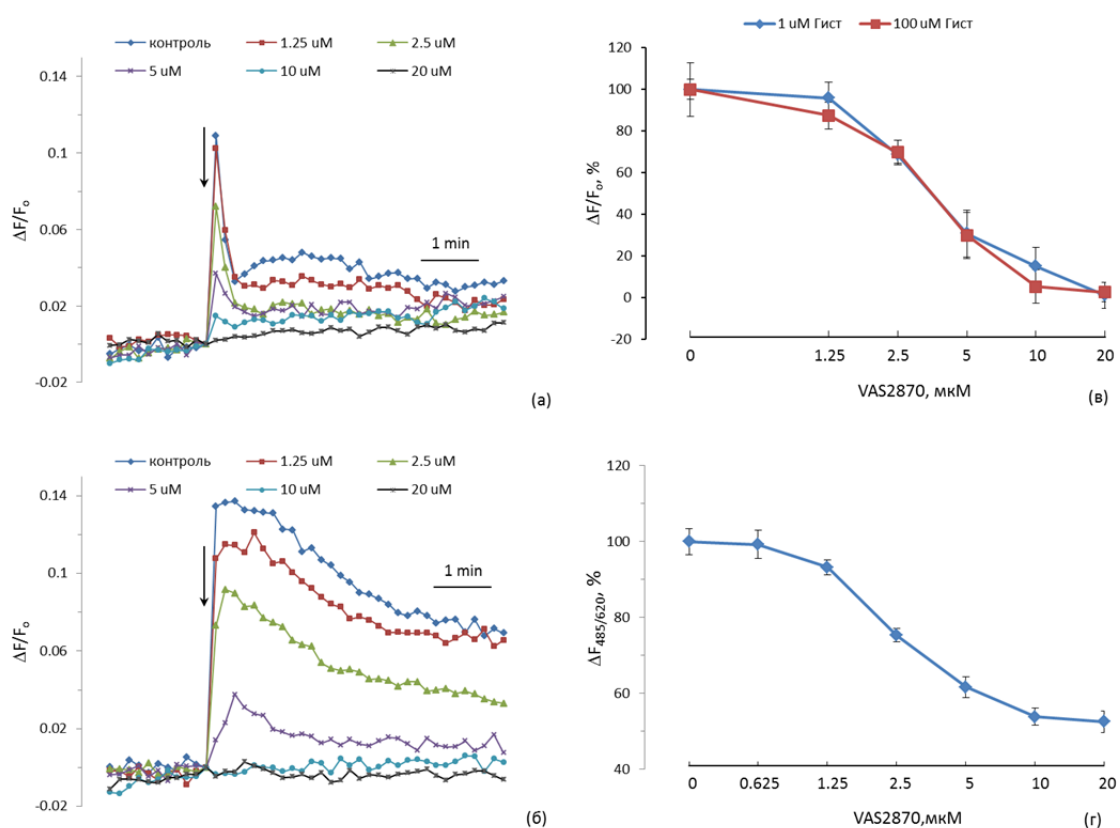


Рисунок 5.2 - Влияние различных концентраций VAS2870 на гистамин-индуцированный подъём $[Ca^{2+}]_{цит}$ и на образование активных форм кислорода (АФК) в клетках HUVES. Кинетика повышения $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на 1 мкМ (а) и 100 мкМ (б) гистамина при разных концентрациях S2870. Кривые зависимостей от концентрации VAS2870 подъёма $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на 1 и 100 мкМ гистамина (в) и образования АФК в ответ на 100 мкМ гистамина (г).

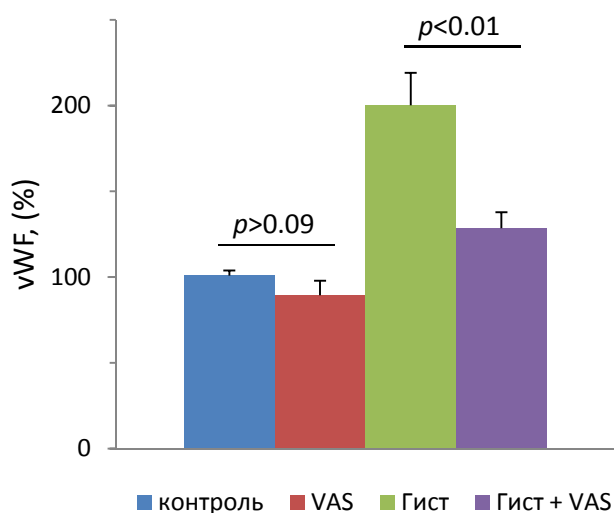


Рисунок 5.3 - Влияние гистамина (100 мкМ) на секрецию фактора Виллебранда (vWF) в отсутствие или в присутствии 10 мкМ VAS2870.

Была исследована роль кальциевых каналов TPC в регуляции сосудистой сократимости. Установлено, что в гладкомышечных клетках (ГМК) аорты крысы экспрессируются два вида этих каналов – TPC1 и TPC2, локализованные в лизосомах и эндолизосомальных везикулах (рисунок 5.4).

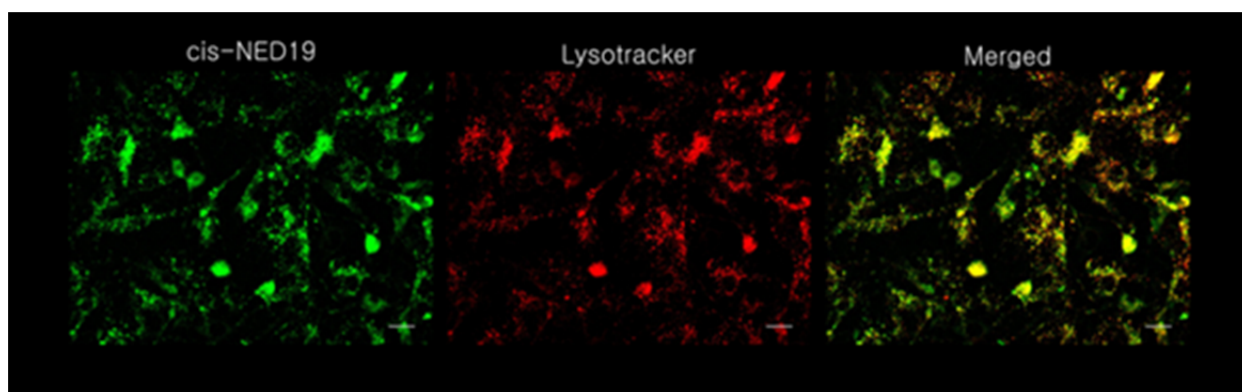


Рисунок 5.4 - Колокализация маркера каналов TPC (cis-NED19) с лизосомальным зондом (Lysotracker) в ГМК.

Впервые показано [2], что каналы TPC в гладкомышечных клетках кровеносных сосудов участвуют в вызываемом норадреналином подъеме уровня кальция в этих клетках и в альфа1-адренергической регуляции сосудистого тонуса. Блокаторы каналов TPC избирательно подавляют кальциевый сигнал в ГМК и сократительную реакцию сосудов в ответ на норадреналин. Установлено, что альфа1-АР активируют в ГМК сосудов изоформу TPC1. Таким образом, кальциевые каналы TPC представляют собой новую перспективную мишень для фармакологической коррекции нарушений нейроэндокринной регуляции тонуса кровеносных сосудов.

5.4 Заключение

В результате проведенных в 2019 г. исследований установлены новые механизмы регуляции обмена ионов кальция в эндотелиальных и гладкомышечных клетках кровеносных сосудов. Показано, что активные формы кислорода участвуют в регуляции действия серотонина и гистамина на обмен ионов кальция в клетках эндотелия. Блокада активности НАДФН-оксидаз веществом VAS287 полностью устраняет активацию гистамином секреции фактора Виллебранда. Таким образом, обнаружен принципиально новый способ подавления эффекта гистамина тромбогенного и провоспалительного действия гистамина. В исследованиях 2019 г. впервые показано, что двупоровые кальциевые каналы участвуют в вызываемой норадреналином активации обмена кальция в гладкомышечных клетках и сокращении кровеносных сосудов. Кальциевые каналы TRP представляют собой новую перспективную мишень для фармакологической коррекции нарушений нейроэндокринной регуляции тонуса кровеносных сосудов.

5.5 Список использованных источников

1. Avdonin P.V., Nadeev A.D., Mironova G.Yu., Zharkikh I.L., Avdonin P.P., Goncharov N.V. Enhancement by hydrogen peroxide of calcium signals in endothelial cells induced by 5-HT_{1B} and 5-HT_{2B} receptor agonists // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. -2019. Article ID 1701478, 8 pages. DOI: 10.1155/2019/1701478
2. Trufanov S.K., Rybakova E.Y., Avdonin P.P., Tsitrina A.A., Zharkikh I.L., Goncharov N.V., Jenkins R.O., Avdonin P.V. The role of two-pore channels in norepinephrine-induced [Ca²⁺]_i rise in rat aortic smooth muscle cells and aorta contraction // *Cells*. - 2019. – Vol.8. - №10. - P. 1144. DOI: 10.3390/cells8101144.
3. Avdonin P.V., Rybakova E.Yu., Avdonin P.P., Trufanov S.K., Mironova G.Yu., Tsitrina A.A., Goncharov N.V. VAS2870 inhibits histamine-induced calcium signaling and vWF secretion in human umbilical vein endothelial cells // *Cells* - 2019. –Vol. 8. - №2. - P. 196. DOI:10.3390/cells8020196.

РАЗДЕЛ 6 МЕХАНИЗМЫ ХИМИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СТАБИЛИЗАЦИИ И ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ СТРУКТУР

6.1 Введение

Изучение биологической активности природных и синтетических химических соединений имеет важное значение для медицины, экотоксикологии, парфюмерной и пищевой промышленности. Для испытания веществ используются разнообразные модельные объекты, в том числе зародыши морского ежа, которые благодаря своим уникальным характеристикам широко применяются в медико-биологических и экотоксикологических исследованиях [1]. Зародышей морских ежей легко получать и инкубировать, они просто устроены, прозрачны и хорошо проницаемы для разнообразных химических соединений. Развитие зародышей морских ежей хорошо изучено, что позволяет интерпретировать фенотипические вариации и делать предположение о механизме действия исследуемых химических агентов. В нашей лаборатории был разработан фенотипический метод скрининга химических соединений на зародышах морского ежа, подробно описанный в предыдущей работе [2]. Метод позволяет выявлять вещества с антимиотическим действием, обусловленным дестабилизацией микротрубочек, и дает высокопроизводительные результаты, сопоставимые с данными по цитотоксичности на культурах опухолевых клеток.

6.2 Материалы и методы

Опыты проводили в биологической лаборатории ИБР им. Н.К.Кольцова РАН на Кипре. Взрослых морских ежей *Paracentrotus lividus* L. (Echinidae, Echinodermata) собирали в прибрежной зоне и содержали в аквариуме с аэрируемой морской водой. Нерест стимулировали инъекцией в полость тела животных 1–2 мл 0.5 М КСl. Полученные яйцеклетки отмывали профильтрованной через нейлоновый фильтр морской водой и оплодотворяли добавлением нескольких капель разбавленной спермы. Зародышей (400–2000/мл) инкубировали в профильтрованной морской воде при комнатной температуре (18–23°C) до стадии перехода к активному питанию (36–40 ч, средний плутеус 2). В течение всего периода инкубации суспензию зародышей перемешивали с помощью лопасти из оргстекла со скоростью вращения 60 об/мин, приводимой в движение электромотором. Исходные растворы гидрофобных химических соединений готовили в ДМСО, после чего разводили в 10 раз 96% этанолом. Такая процедура способствует увеличению растворимости веществ в солесодержащих средах, в том числе морской воде. Растворимость исследуемых соединений контролировали с помощью стереомикроскопа МБС-10. Обработку веществами проводили в 6-луночных

культуральных платах. В каждую лунку помещали 5 мл суспензии яйцеклеток или зародышей и добавляли соответствующий объем раствора исследуемого вещества для достижения требуемой конечной концентрации. При этом максимальная концентрация растворителя не превышала предельно допустимую (1% для этанола и 0.1% для ДМСО). Для оценки антимиотической активности яйцеклетки обрабатывали веществами через 8–15 мин после оплодотворения, и через 2.5 и 5.5 ч регистрировали нарушение и/или остановку дробления. О способности веществ воздействовать на тубулин и дестабилизировать микротрубочки судили по характерному изменению плавательного поведения бластул, обработанных веществами сразу после вылупления в возрасте 8.5–10 ч. Прекращение прямолинейного плавания зародышей у поверхности воды, оседание на дно сосуда и быстрое вращение (спиннинг) вокруг анимально-вегетативной оси является свидетельством антитубулинового механизма действия исследуемых химических соединений. В тестах использовали последовательно понижающиеся в два раза концентрации веществ до исчезновения эффекта. Активность оценивали по наименьшей (пороговой) концентрации ЕС, вызывающей соответствующий биологический эффект. Наблюдения проводили с помощью оптического микроскопа Биолам ЛОМО (г. Санкт-Петербург, Россия) до перехода к активному питанию (средний плутеус 2). Микрофосъемку осуществляли с помощью микроскопа AmScope с цифровой фотокамерой MU500 (United Scopes LLC, Irvine, CA, USA). Использование зародышей морского ежа в качестве объекта удовлетворяет требованиям лабораторной этики. Зародыши развиваются вне материнского организма, отнерестившиеся особи сохраняют жизнеспособность и возвращаются в естественную среду обитания.

6.3 Результаты и обсуждение

На модели зародышей морского ежа *P. lividus* испытаны вещества из библиотеки химических соединений Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН: пиразолопиридиноны, стильбены - N-гетероциклические аналоги природного антимиотика комбретастина, аллилполиметоксибензолы - компоненты эфирных масел семян петрушки и укропа (рисунок 6.1). Также были исследованы синтезированные сотрудниками Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова производные природного терпена элеутеробина, содержащегося в кораллах и обладающего противоопухолевой активностью [3]. Исследование зависимости антимиотической антитубулиновой активности изоксазолов от их химической структуры показало, что наиболее активными являются вещества с незамещенным изоксазольным фрагментом (рисунок 6.1) [4].

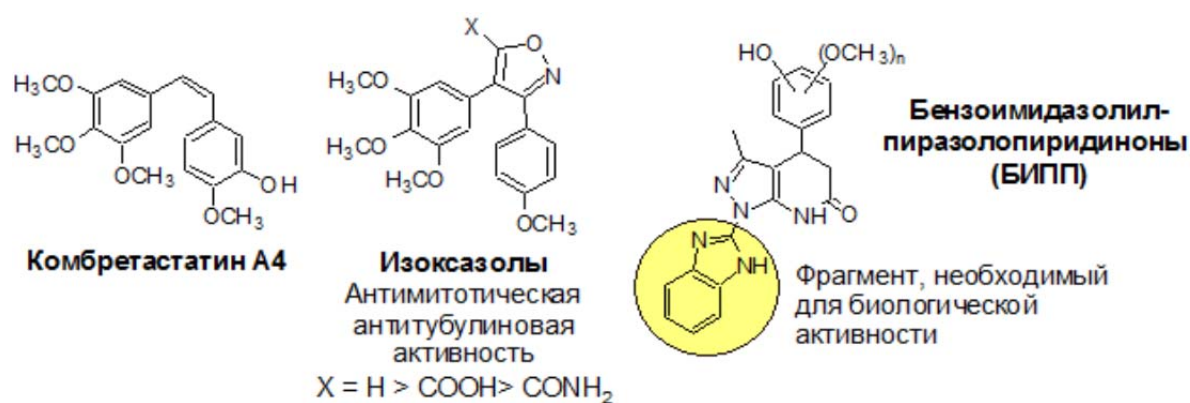


Рисунок 6.1 - Структура химических соединений, испытанных на биологическую активность.

Наряду с выявлением веществ с антимитотическим действием, обусловленным дестабилизацией микротрубочек, зародыши морского ежа могут быть использованы для характеристики биологической активности новых химических соединений и определения их клеточной мишени. Синтезированные в ИОХ РАН бензоимидазолилпиразолопиридины (БИПП) в тестах на панели опухолевых клеток человека по программе DTP NCI NIH (NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen) показали селективное действие по отношению к Т-клеточной лимфобластоме Molt-4 (рисунок 6.2) [5]. На модели зародышей морского ежа эти соединения не оказывали антипролиферативного действия, но селективно нарушали вылупление зародышей и последующее развитие спикул личиночного скелета (рисунок 3 б, д, е). Интересно, что для проявления эффектов как на культуре клеток Molt-4, так и на зародышах морского ежа, необходимым являлся бензоимидазольный фрагмент (выделен желтым на рисунке 1) [5]. Отсюда было сделано предположение о сходстве механизма действия БИПП на обоих тест-объектах. Поскольку в вылуплении зародышей морского ежа на стадии бластулы важнейшую роль играет матриксная металлопротеиназа (ММП) энвелизин, разрушающая оболочку оплодотворения, был проведен скрининг на панели матриксных металлопротеиназ (совместно с Novartis Institutes for BioMedical Research, Basel, Switzerland). И действительно, БИПП ингибировал ММП9 [5], что соответственно лежит в основе нарушения вылупления зародышей морского ежа. Однако, стандартные ингибиторы ММП не проявляли избирательной токсичности по отношению к клеткам Molt-4. Поэтому на следующем этапе выяснения механизма действия БИПП мы подробно исследовали эффекты специфических ингибиторов различных сигнальных систем, регулирующих спикулогенез у зародышей морского ежа, и сравнивали их действие с

действием БИПП (рисунок 6.3). Ссылки на литературные источники приведены в нашей работе [5].

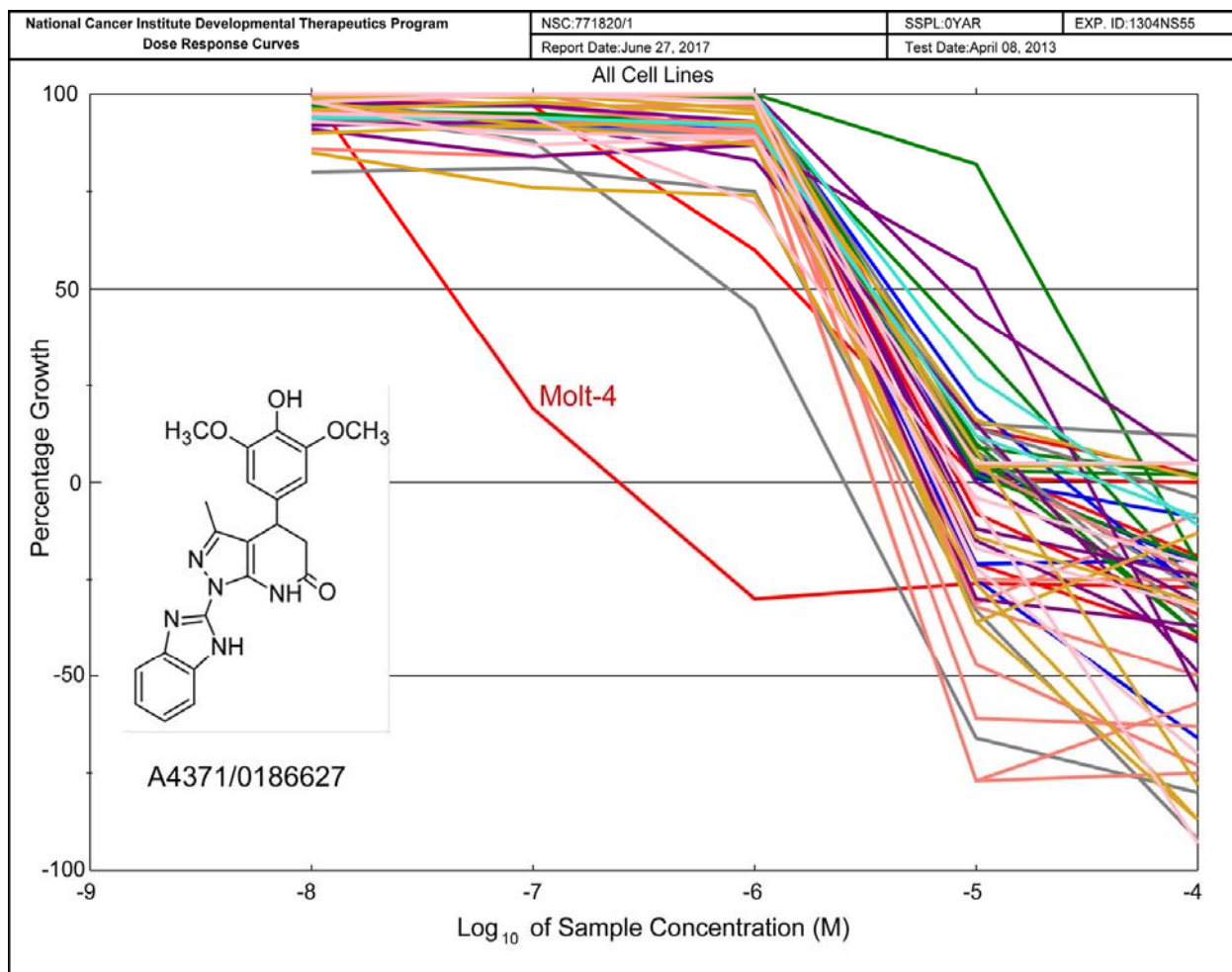


Рисунок 6.2 - Кривые доза-эффект для представителя класса БИПП на 60-клеточной панели опухолевых клеток человека. Данные NCI60 screen.

Было обнаружено, что эффект БИПП на зародышах морского ежа не похож на действие исследованных стандартных ингибиторов сигнальных систем, хотя все эти ингибиторы тем или иным образом подавляют спиккулогенез. Более того, ряд ингибиторов был изучен в NCI по программе DTP, и результаты из базы данных NCI свидетельствуют о том, что эти вещества не обладают избирательной цитотоксичностью по отношению к клеткам Molt-4. Таким образом, исследования на молекулярном уровне — панели ММР, клеточном уровне - клетках лейкемии Molt-4 и на уровне организма - зародышах морского ежа показали следующее: (1) для проявления биологической активности БИПП необходимо наличие в молекуле бензоимидазольного фрагмента; (2) избирательное угнетение роста клеток лейкемии человека Molt-4 при обработке БИПП не связано с антимитотическим действием и с дестабилизацией микротрубочек;

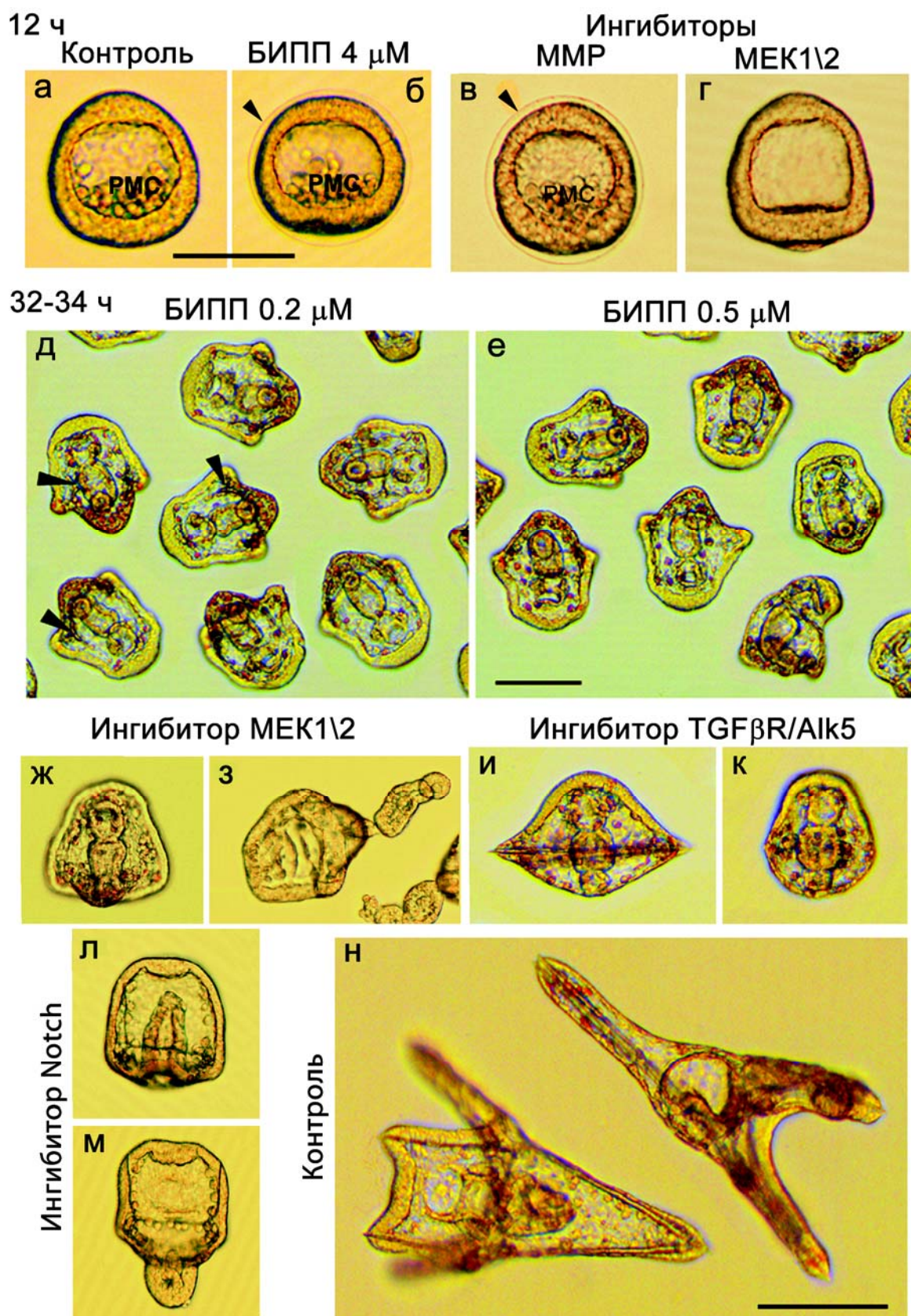


Рисунок 6.3 - Влияние БИПП и некоторых стандартных ингибиторов сигнальных систем, регулирующих спиккулогенез, на зародышей морского ежа. Верхний ряд: Стадия мезенхимной бластулы, 12 ч после оплодотворения. (а) Интактная бластула. (б,в) Неспособная вылупиться бластула после обработки БИПП (4 μM) (б) и ингибитором матриксной металлопротеиназы маримастатом (2 μM) (в). (г) Отсутствие клеток первичной мезенхимы у бластулы, обработанной ингибитором МЕК1/2 траметинибом (20

нМ). РМС: клетки первичной мезенхимы (primary mesenchyme cells). Стрелка: оболочка оплодотворения. Следующие 3 ряда: 32-34 ч развития, когда интактные зародыши находятся на стадии плутеуса (п). (д,е) БИПП в концентрации 0.2 и 0.5 μM селективно подавляет развитие спикул (личиночного скелета). У части зародышей на фото (д) видны рудименты спикул (стрелки). (ж) Ингибитор MEK1/2 биниметиниб (500 нМ) полностью угнетает развитие спикул и у части зародышей вызывает экзогастроляцию с дифференцировкой архентерона (первичной кишки) (з). Ингибитор TGF β R/Alk5 RepSox при 0.2 μM (и) и 1 μM (к) также подавляет спикулогенез, но при этом вызывает радиализацию зародышей (нарушение симметрии). (л,м) Ингибитор Notch LY3039478 (1 μM) угнетает развитие спикул, подавляет формирование архентерона и клеток вторичной мезенхимы, а у части зародышей вызывает экзогастроляцию (м). На фото отрезок прямой — 100 микрон. Температура инкубации 24 °С.

(3) одной из клеточных мишеней БИПП являются ферменты класса MMP, но избирательная цитотоксичность по отношению к клеткам Molt-4 обусловлена другим пока не известным механизмом действия. Опыты на зародышах морского ежа позволили исключить из возможных клеточных мишеней БИПП следующие регуляторные сигнальные системы: Notch, Wnt/ β -catenin, MAPK (Raf-MEK-ERK), рецепторные тирозинкиназы (VEGF/VEGFR, FGF/FGFR, TGF β /TGF β R), и PI3K.

6.4. Заключение

Фенотипический скрининг на модели зародышей морского ежа позволяет быстро, легко и с минимальными материальными затратами выявлять вещества, угнетающие деление клеток за счет воздействия на тубулин и дестабилизации микротрубочек, изучать зависимость активности веществ от их химической структуры. Обнаруженные антими́тотики могут найти применение при разработке новых противоопухолевых лекарственных средств. Используемая нами экспериментальная модельная система позволяет получать информацию о механизме действия и клеточной мишени природных и синтетических химических соединений.

6.5 Список использованных источников

1 Sea Urchin - From Environment to Aquaculture and Biomedicine, Agnello, M., Ed. InTech: Rijeka, Croatia, 2017.

2 Semenova M. N., Demchuk D. V., Tsyganov D. V., Chernysheva N. B., Samet A. V., Silyanova E. A., Kislyi V. P., Maksimenko A. S., Varakutin A. E., Konyushkin L. D., Raihstat M. M., Kiselyov A. S., Semenov V. V. Sea urchin embryo model as a reliable in vivo phenotypic screen to characterize selective antimetabolic molecules. Comparative evaluation of combretapyrazoles, -isoxazoles, -1,2,3-triazoles, and -pyrroles as tubulin binding agents//ACS Comb. Sci. - 2018. - Vol. 20. - P. 700 - 721.

3 Sosonyuk S. E., Peshich, A., Tutushkina A. V., Khlevin D. A., Lozinskaya N. A., Gracheva Yu. A., Kolotova E. S., Glazunovac V. A., Osolodkin D. I., Semenova M. N., Semenov V. V., Proskurnina M. V., Shtil A. A., Zefirov N. S. Synthesis and cytotoxicity of novel simplified eleutherobin analogs as potential antitumor agents//Org. Biomol. Chem. - 2019. - Vol. 17. - P. 2792 - 2797.

4 Maksimenko A. S., Kislyi V. P., Chernysheva N. B., Strelenko Yu. A., Zubavichus Y. V., Khrustalev V. N., Semenova M. N., Semenov V. V. Effective synthesis of 3,4-diaryl-isoxazole-5-carboxamides and their antiproliferative properties//Eur. J. Org. Chem. - 2019. - Vol. 26. - P. 4260 – 4270.

5 Lichitsky B. V., Komogortsev A. N., Dudinov A. A., Krayushkin M. M., Khodot E. N., Samet A. V., Silyanova E. A., Konyushkin L. D., Karpov A. S., Gorses D., Radimerski T., Semenova M. N., Kiselyov A. S., Semenov V. V. Benzimidazolyl-pyrazolo[3,4-b]pyridinones - selective inhibitors of MOLT-4 leukemia cell growth and sea urchin embryo spiculogenesis: Target quest//ACS Comb. Sci.- 2019. - DOI: 10.1021/acscombsci.9b00135.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За отчетный период проведена работа по исследованию роли гормонов, отдельных форм протеасом, биогенных аминов, и других регуляторных факторов в раннем онтогенезе и развитии различных адаптивных и паталогических процессов у беспозвоночных и позвоночных (млекопитающих). Получен ряд важнейших результатов в соответствии с запланированными задачами.

1) Выявлено, что протеасомы аллотрансплантатов и печени, содержащие иммунную субъединицу LMP2 и связанные с активатором PA28 $\alpha\beta$, служат одним из ключевых факторов, которые обеспечивают приживание независимо от особенностей реципиентов (Подраздел 1.1). Механизм действия данного субтипа протеасом, по-видимому, заключается в образовании особых пептидов в клетках трансплантата и клетках синусоидов печени. Скорее всего, эти пептиды без участия молекул главного комплекса гистосовместимости класса I выделяются в межклеточное пространство и при взаимодействии с цитотоксическими лимфоцитами тормозят их активность. Полученные данные важны для разработки новых технологий в трансплантологии, направленных на увеличение экспрессии протеасом «LMP2-PA28 $\alpha\beta$ » для повышения эффективности приживания трансплантата.

2) Анализ полученных данных свидетельствует о взаиморегуляторном влиянии нейроэндокринной и иммунной систем уже в раннем развитии. Влияние ГРГ на иммунную систему на разных этапах онтогенеза, по-видимому, различно. В пренатальном онтогенезе до эмбрионального 20-21 дня, пока не сформировалась гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось, осуществляющая эндокринную регуляцию, ГРГ оказывает влияние на морфогенез тимуса (Подраздел 1.2). В перинатальный период, когда гипоталамо-гипофизарно-гонадная система начинает функционировать, ГРГ участвует в программировании функций иммунной системы. Дефицит ГРГ в критические периоды развития тимуса в дальнейшем вызывает в нем необратимые изменения, приводящие к нарушению функций Т-лимфоцитов. В свою очередь, медиаторы иммунной системы участвуют в регуляции развития гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Активация иммунной системы матери бактериями на ранних сроках беременности вызывает усиление синтеза провоспалительных цитокинов как у матери, так и плодов, что приводит к нарушениям развития репродуктивной системы. Эти нарушения могут усиливаться повышенным содержанием половых стероидов в препубертате. Их антагонисты устраняют наблюдаемые расстройства, что открывает возможности для коррекции процессов развития.

3) Полученные результаты, свидетельствующие об увеличенном содержании иммунных субъединиц протеасом в опухоли прямой кишки пациентов, на первый взгляд, указывают на перспективность применения ингибиторов этих субъединиц для терапии данного онкологического заболевания (Подраздел 1.3). Вместе с тем, следует учитывать, что подобные ингибиторы могут нарушить не только функции иммунной системы пациентов, но и ряд других процессов, протекающих с участием иммунных субъединиц LMP7 и LMP2, к числу которых относится передача сигналов между нейронами. В целом, полученные результаты указывают на PA700-активатор и ХТП-активность протеасом как на более перспективные мишени для терапии рака прямой кишки.

4) Выявлено, что структура гена *Ngb* беломорской губки *H. dujardini* сильно отличается от *Ngb* млекопитающих и даже от *Ngb* губки *A. queenslandica* (ген *Ngb H. dujardini* более чем в 2 раза длиннее гена *Ngb A. queenslandica* в основном за счет более длинных интронов) (Подраздел 2.1). Промоторная область гена указывает на то, что в его транскрипции должны принимать участие ТАТА-связывающий белок (ТВР) и транскрипционные факторы TFIIA, TFIIID, TFIIIE, TFIIIF и TFIIH. В отличие от губок, промоторная область нейроглобина млекопитающих не содержит ТАТА-бокса. ТАТА-бокс является древним промоторным мотивом эукариот (последовательности, сходные с ТАТА-боксом найдены у протистов), а у позвоночных ТАТА-бокс распространён менее широко. Нельзя исключить, что функция *Ngb* у беспозвоночных и позвоночных различаются. Относительно более высокая, по сравнению с *ADGB*, экспрессия *Ngb* говорит о его более значительном вкладе в газовый обмен, и, возможно, другие метаболические процессы у *H. dujardini*.

Исследование уровня экспрессии нейроглобина у губки при разных физиологических состояниях поможет получить информацию о том, в каких именно биологических процессах участвует этот белок.

5) Впервые из клеток чешуекрылого насекомого выделены и охарактеризованы методами протеомного анализа, электронной микроскопии и биоинформатики множественные формы 20S протеасомы, в том числе комплексы коровой частицы CP с шаперонами PAC1, PAC2 и активаторами PA28 γ , PA200 (Подраздел 2.2). Наличие в клетках эукариот стабильных функциональных комплексов CP с димерами шаперонов PAC1-PAC2 показано впервые. Обнаружено присутствие в клеточной популяции 26S протеасом коровых частиц на разных стадиях открытия входа в протеолитическую камеру. Определены первичные структуры субъединиц CP клеток Sf9 и проведен филогенетический анализ структурных субъединиц, шаперонов и активаторов 20S протеасомы. Впервые проведено количественное сравнение скоростей дивергенции

аминокислотных последовательностей субъединиц, шаперонов и активаторов 20S протеасомы и показана разная скорость эволюции этих функционально важных белков.

6) 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 (Раздел 3). В целом проблематика исследований, вполне актуальна, соответствует мировым тенденциям в нейронауке. Исследования проводились преимущественно на модельных объектах – на нескольких видах беспозвоночных животных. Однако полученные данные могут быть существенны для понимания пластичности и у высших животных, учитывая, что принципы функционирования нервной системы сформировались на очень ранних этапах эволюции нервной системы.

7) Сравнение строения кинетиды жгутиковых клеток выявило более сложное строение у личинок, чем у взрослых особей, у одних из самых древних многоклеточных животных – губок (Раздел 4). В ходе анализа полученных результатов показана возможность серотонилирования ядерных белков в клетках дробящегося зародыша, каждая из которых дает начало множеству тканей формирующегося организма. Обнаруженный факт посттрансляционной модификации на таком уровне позволяет говорить о существенной роли серотонина в адаптивные реакции организма, начиная с самых ранних стадий развития.

8) Установлены новые механизмы регуляции обмена ионов кальция в эндотелиальных и гладкомышечных клетках кровеносных сосудов (Раздел 5). Показано, что активные формы кислорода участвуют в регуляции действия серотонина и гистамина на обмен ионов кальция в клетках эндотелия. Блокада активности НАДФН-оксидаз веществом VAS287 полностью устраняет активацию гистамином секреции фактора Виллебранда. Таким образом, обнаружен принципиально новый способ подавления эффекта гистамина тромбогенного и провоспалительного действия гистамина. Впервые показано, что двупоровые кальциевые каналы участвуют в вызываемой норадреналином активации обмена кальция в гладкомышечных клетках и сокращении кровеносных сосудов. Кальциевые каналы TRP представляют собой новую перспективную мишень для фармакологической коррекции нарушений нейроэндокринной регуляции тонуса кровеносных сосудов.

9) Проведен фенотипический скрининг на модели зародышей морского ежа, который позволяет быстро, легко и с минимальными материальными затратами выявлять вещества, угнетающие деление клеток за счет воздействия на тубулин и дестабилизации микротрубочек, изучать зависимость активности веществ от их химической структуры

(Раздел 6). Обнаруженные антими́тотики могут найти применение при разработке новых противоопухолевых лекарственных средств. Используемая нами экспериментальная модельная система позволяет получать информацию о механизме действия и клеточной мишени природных и синтетических химических соединений.

Таким образом, за отчетный период в ИБР РАН были получены важнейшие результаты по теме 2, которые вносят существенный вклад в фундаментальную науку и имеют большое значение для практического применения в медицине.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ

*отчетные публикации

Раздел 1 Подраздел 1.1

1 ***Астахова Т.М.**, Божок Г.А., Алабедалькарим Н.М., **Карпова Я.Д.**, **Люпина Ю.В.**, **Ушакова Е.М.**, Легач Е.И., Бондаренко Т.П., **Шарова Н.П.** Экспрессия протеасом в гетеротопических аллотрансплантатах яичников крыс Вистар и Август при индукции донорспецифической толерантности//Онтогенез. - 2019. - Т. 50. - N 5. - С. 332 - 339. DOI: 10.1134/S0475145019050021.

Английская версия: **Astakhova T.M.**, Bozhok G.A., Alabedal'karim N.M., **Karpova Ya.D.**, **Lyupina Yu.V.**, **Ushakova E.M.**, Legach E.I., Bondarenko T.P., **Sharova N.P.** Proteasome expression in ovarian heterotopic allografts of Wistar and August rats under induction of donor specific tolerance//Russian Journal of Developmental Biology. - 2019. - Vol. 50. - N. 5. - P. 261 - 267. DOI: 10.1134/S1062360419050023; - Q4.

2 **Astakhova T.M.**, **Karpova Ya.D.**, Bozhok G.A., Alabedal'karim N.M., **Lyupina Yu.V.**, Legach E.I., **Sharova N.P.** Proteasome mechanisms of the development of tolerance to allograft in Wistar and August rats with different content of monoamines in the brain//Medical Academic Journal. Supplement. - 2019. - P. 39 - 43. <https://doi.org/10.17816/MAJ191S139-41>.

Раздел 1 Подраздел 1.2

3 ***Izvol'skaia M.S.**, **Sharova V.S.**, **Ignatiuk V.M.**, **Voronova S.N.**, **Zakharova L.A.** Abolition of prenatal lipopolysaccharide-induced reproductive disorders in rat male offspring by fulvestrant // Andrologia. - 2019. - V. 51. - e13204. - doi: 10.1111/and.13204.

4 ***Melnikova V.I.**, **Lifantseva N.V.**, **Voronova S.N.**, **Zakharova L.A.** Gonadotropin-Releasing Hormone in Regulation of Thymic Development in Rats: Profile of Thymic Cytokines // Int. J. Mol. Sci. - 2019. - V. 20. - No 16. - pii: E4033. doi: 10.3390/ijms20164033

5 **Zakharova L.A.** Prenatal stress in programming of immune and neuroendocrine system development // Medical Academic Journal. Suppl. - 2019. - P. 124–126. <https://doi.org/10.17816/MAJ191S1124-26>.

Раздел 1 Подраздел 1.3

6 *Морозов А.В., Буров А.В., **Астахова Т.М.**, Спасская Д.С., Маргулис Б.А., Карпов В.Л. Динамика функциональной активности и экспрессии субъединиц протеасом в условиях адаптации клетки к тепловому шоку//Молекулярная биология. - 2019. - Т. 53. - N 4. - С. 638 – 647. DOI: 10.1134/S0026898419040086.

Английская версия: Morozov A.V., Burov A.V., **Astakhova T.M.**, Spasskaya D.S., Margulis B.A., Karpov V.L. Dynamics of the Functional Activity and Expression of Proteasome

Subunits during Cellular Adaptation to Heat Shock//Molecular Biology. - 2019. - Vol. 53. - Is. 4. - P. 571 - 579. DOI: 10.1134/S0026893319040071; - Q4.

7 **Астахова Т.М.**, Родоман Г.В., Сумеди И.Р., Плеханова А.С., Свириденко Н.В., Мелоян М.М., **Шарова Н.П.** Характеристика протеасом злокачественных опухолей. Перспективы применения в медицинской практике//Acta Naturae. - 2019. - Спецвыпуск. - Т. 2. - С. 226.

Раздел 2

8 ***Kravchuk O.I., Lyupina Y.V., Erokhov P.A., Finoshin A.D., Adameyko K.I., Mishyna M.Y., Moiseenko A.V., Sokolova O.S., Orlova O.V., Beljelarskaya S.N., Serebryakova M.V., Indeykina M.I., Bugrova A.E., Kononikhin A.S., Mikhailov V.S.** Characterization of the 20S proteasome of the lepidopteran, *Spodoptera frugiperda*//Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteom. - 2019. - Vol. 1867(9). - P. 840-853. DOI: 10.1016/j.bbapap.2019.06.010.

Раздел 3

9 Дьяконова В.Е., Сахаров Д.А. Пострефлекторная нейробиология поведения. Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. – М.: Издательский дом ЯСК, 2019, – 589 с. – (Разумное поведение и язык). Послесловие проф. А.Г. Асмолова. – ISBN 978-5 907117-52-5.

10 ***Dyakonova T.L., Sultanakhmetov G.S., Mezheritskiy M.I., Sakharov D.A., Dyakonova V.E.** Storage and erasure of behavioural experiences at the single neuron level // Scientific reports. - 2019. - Vol. 9(1). - P. 14733. DOI: 10.1038/s41598-019-51331-5.

11 **Dyakonova T., Dyakonova V., Mezheritskiy M.** Past and present at the level of a single motor neuron. Abstracts of EMBO|EMBL Symposium: Probing Neural Dynamics with Behavioural Genetics EMBL Heidelberg, Germany, 10 - 13 April 2019. MERA Print & Design, Sandhausen, Germany. p. 66.

12 **Vorontsov D.D., Lapshin D.N.** Non-spiking signal transmission in the mosquito auditory neurons. Abstracts of 1st Symposium on Invertebrate Neuroscience. 13-17 August 2019. Tihany, Hungary. Balaton limnological institute. MTA Center for ecological research. p.46.

13 ***Lapshin D.N., Vorontsov D.D.** Directional and frequency characteristics of auditory neurons in *Culex* male mosquitoes // Journal of Experimental Biology. - 2019. - Vol. 222. - P. 21. DOI: 10.1242/jeb.208785.

14 **Бойко О. В.** Функциональная роль кальциевых каналов Т-типа в сократительных реакциях амниона куриного эмбриона на карбахол. Материалы XVIII Конференции-школы с международным участием с темой «Актуальные проблемы биологии развития» 14-19 октября 2019г. М. Издательство Перо, 2019. стр. 30-31

15 **Korshunova T.**, Nakano R., Fletcher K., Sanamyan N., Martynov A. First molecular confirmation of the presence of *Dendronotus primorjensis* Martynov, Sanamyan & Korshunova, 2015 in Japan and new distributional records of *Dendronotus* species in the North Pacific (Nudibranchia: Dendronotidae) // *Venus. Journal of the Malacological Society of Japan.* - 2019. - Vol. 77. № 1-4. - P. 1-14).

16 ***Korshunova T.** The extraordinary genus *Myja* is not a tergipedid, but related to the Facelinidae s. str. with the addition of two new species from Japan (Mollusca, Nudibranchia) // *ZooKeys.* - 2019. - Vol. 818. - P. 89-116. DOI: 10.3897/zookeys.818.30477.

17 ***Korshunova T.**, Mehrotra R., Arnold S., Lundin K., Picton B., Martynov A. The formerly enigmatic Unidentiidae in the limelight again: a new species of the genus *Unidentia* from Thailand (Gastropoda: Nudibranchia) // *Zootaxa.* - 2019. - Vol. 4551. - N. 5. - P. 556-570. DOI: 10.11646/zootaxa.4551.5.4.

18 ***Korshunova T.**, Picton B., Furfaro G., (...), Lundin K., Martynov A. Multilevel fine-scale diversity challenges the 'cryptic species' concept // *Scientific Reports.* - 2019. - Vol. 9(1). - P. 6732. DOI: 10.1038/s41598-019-42297-5.

19 *Sanamyan K., Sanamyan N., Martynov A., **Korshunova T.** A new species of *Ernstia* (Porifera: Calcarea) described from marine aquarium // *Zootaxa.* - 2019. - Vol. 4603(1). - P. 192-200. DOI: 10.11646/zootaxa.4603.1.11.

20 *Sanamyan N.P., Sanamyan K.E., McDaniel N., (...), **Korshunova T.A.**, Bocharova E.S. A revision of sea anemones of the genus *Cribrinopsis* Carlgren, 1921 (Actiniaria: Actiniidae) from British Columbia with the description of a new species // *Marine Biodiversity.* - 2019. - Vol. 49. Is. 4. - P. 1951-1969. DOI: 10.1007/s12526-019-00956-w.

Раздел 4

21 *Ivashkin E., **Melnikova V.**, **Kurtova A.**, Brun N.R., **Obukhova A.**, **Khabarova M.Y.**, Yakusheff A., **Adameyko I.**, Gribble K.E., **Voronezhskaya E.E.** Transglutaminase Activity Determines Nuclear Localization of Serotonin Immunoreactivity in the Early Embryos of Invertebrates and Vertebrates // *ACS Chemical Neuroscience.* - 2019. - Vol. 10(8). - P. 3888-3899. DOI: 10.1021/acscemneuro.9b00346.

22 ***Sokolova A.M.**, Pozdnyakov I.R., **Ereskovsky A.V.**, Karpov S.A. Kinetid structure in larval and adult stages of the demosponges *Haliclona aquaeductus* (Haplosclerida) and *Halichondria panicea* (Suberitida) // *Zoomorphology.* - 2019. - Vol. 138(3). - P. 171-184. DOI: 10.1007/s00435-019-00437-5.

23 *Erokhina M.V., Lepekha L.N., **Voronezhskaya E.E.**, **Nezlin L.P.**, Avdienko V.G., Ergeshov A.E. Application of Laser Scanning Confocal Microscopy for the Visualization of M.

tuberculosis in Lung Tissue Samples with Weak Ziehl-Neelsen Staining // Journal of Clinical Medicine. - 2019. - Vol. 8. - Is. 8. DOI: 10.3390/jcm8081185.

Раздел 5

24 ***Avdonin P.V.**, Nadeev A.D., **Mironova G.Yu.**, Zharkikh I.L., **Avdonin P.P.**, Goncharov N.V. Enhancement by hydrogen peroxide of calcium signals in endothelial cells induced by 5-HT1B and 5-HT2B receptor agonists // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. -2019. Article ID 1701478, 8 pages. DOI: 10.1155/2019/1701478

25 ***Trufanov S.K.**, **Rybakova E.Y.**, **Avdonin P.P.**, **Tsitrina A.A.**, Zharkikh I.L., Goncharov N.V., Jenkins R.O., **Avdonin P.V.** The role of two-pore channels in norepinephrine-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise in rat aortic smooth muscle cells and aorta contraction. Cells. - 2019. – Vol.8. - №10. - P. 1144. DOI: 10.3390/cells8101144.

26 ***Avdonin P.V.**, **Rybakova E.Yu.**, **Avdonin P.P.**, **Trufanov S.K.**, **Mironova G.Yu.**, **Tsitrina A.A.**, Goncharov N.V. VAS2870 inhibits histamine-induced calcium signaling and vWF secretion in human umbilical vein endothelial cells. Cells -2019. –Vol. 8. - №2. - P. 196. DOI:10.3390/cells8020196.

Раздел 6

27 *Sosonyuk S.E., Peshich A., Tutushkina A.V., Khlevin D.A., Lozinskaya N.A., Gracheva Yu.A., Kolotova E.S., Glazunovac V.A., Osolodkin D.I., **Semenova M.N.**, Semenov V.V., Proskurnina M.V., Shtil A.A., Zefirov N.S. Synthesis and cytotoxicity of novel simplified eleutherobin analogs as potential antitumor agents//Org. Biomol. Chem. - 2019. - Vol. 17. - P. 2792 - 2797.

28 *Maksimenko A. S., Kislyi V. P., Chernysheva N. B., Strelenko Yu. A., Zubavichus Y. V., Khrustalev V. N., **Semenova M. N.**, Semenov V. V. Effective synthesis of 3,4-diaryl- isoxazole-5-carboxamides and their antiproliferative properties//Eur. J. Org. Chem. - 2019. - Vol. 26. - P. 4260 – 4270.

29 *Lichitsky B.V., Komogortsev A.N., Dudinov A.A., Krayushkin M.M., Khodot E.N., Samet A.V., Silyanova E.A., Konyushkin L.D., Karpov A.S., Gorses D., Radimerski T., **Semenova M.N.**, Kiselyov A.S., Semenov V.V. Benzimidazolyl-pyrazolo[3,4-b]pyridinones - selective inhibitors of MOLT-4 leukemia cell growth and sea urchin embryo spiculogenesis: Target quest//ACS Comb. Sci.- 2019. - DOI: 10.1021/acscmbosci.9b00135.

Отчет утвержден на заседании Ученого совета, протокол № 14 от 27 декабря 2019 г.