

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

УДК 577.25

Рег. № ГЗ 0108-2018-0002

Рег. № НИОКТР АААА-А18-118041690133-3

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
д-р биол. наук, чл.-корр. РАН
А.В. Васильев
«27» декабря 2018 г.



ОТЧЕТ

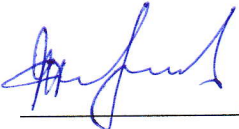
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

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


Н.П. Шарова
24.12.2018

подпись, дата

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

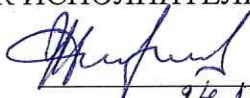

И.С. Захаров
24.12.2018

подпись, дата

Москва 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

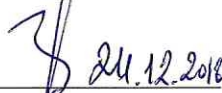
Руководитель, заведующий
лабораторией, доктор биологических
наук



Н.П. Шарова (раздел 1)

24.12.18
подпись, дата

Руководитель, главный научный
сотрудник, доктор биологических наук



И.С. Захаров (раздел 3)

24.12.2018
подпись, дата

Исполнители:

Главный научный сотрудник, доктор
биологических наук, профессор



Л.А. Захарова (раздел 1)

24.12.18
подпись, дата

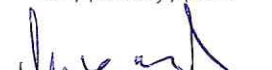
Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук



Т.М. Астахова (раздел 1)

24.12.18
подпись, дата

Главный научный сотрудник, доктор
биологических наук, профессор



В.С. Михайлов (раздел 2)

24.12.2018
подпись, дата

Ведущий научный сотрудник, доктор
биологических наук



Ю.В. Люпина (раздел 2)

24.12.2018
подпись, дата

Ведущий научный сотрудник, доктор
биологических наук, профессор РАН



В.Е. Дьяконова (раздел 3)

24.12.2018
подпись, дата

Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук



О.В. Бойко (раздел 3)

27.12.2018
подпись, дата

Главный научный сотрудник, доктор
биологических наук



Е.Е. Воронежская (раздел 4)

24.12.2018
подпись, дата

Ведущий научный сотрудник доктор
биологических наук



Л.П. Незлин (раздел 4)

24.12.2018
подпись, дата

Главный научный сотрудник, доктор
биологических наук, профессор



П.В. Авдонин (раздел 5)

24.12.2018
подпись, дата

Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук



М.Н. Семенова (раздел 6)

24.12.2018
подпись, дата

Нормоконтроль, ведущий научный
сотрудник, кандидат биологических наук



Е.Б. Абрамова

24.12.18
подпись, дата

РЕФЕРАТ

Отчет 75 с., 1 кн., 6 разделов, 19 рис., 109 источников, 28 публикаций по теме ГЗ.

РАННИЙ ОНТОГЕНЕЗ, ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ ВЫБОР, КОЛЬЧАТЫЕ ЧЕРВИ, МОРСКИЕ ГУБКИ, МОЛЛЮСКИ, МОРСКОЙ ЕЖ, ЧЕШУЕКРЫЛЫЕ НАСЕКОМЫЕ, ГОРМОНЫ, ЦИТОКИНЫ, ПРОТЕАСОМЫ, ДОНОРСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ, ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-РЕПРОДУКТИВНАЯ СИСТЕМА, ТРОМБОТИЧЕСКАЯ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКАЯ ПУРПУРА. РАЗВИТИЕ ОПУХОЛЕЙ, ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ КОМПОЗИЦИИ.

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

Впервые показано, что АТФаза VCP/p97 в клетках чешуекрылых насекомых выполняет важную функцию в инфекционном цикле бакуловирусов, связанную с процессингом убиквитинированных белков и поддержанием протеомного гомеостаза в инфицированных клетках. Воспалительный процесс у кольчатых червей сопряжен с модификацией 20S-протеасом за счет изменений структуры субъединицы бета⁷.

Выявлено, что гетерохрония в дифференцировке серотонин- и дофамин-содержащих нейронов обеспечивает адаптивные миграционные движения в толще воды у личинок морских ежей и в локомоции аннелид. На модели навязанной локомоции показано, что серотонин влияет на скоростные характеристики принятия решения моллюском, но не на структуру поведения.

Обнаружено, что одним из ключевых факторов, определяющих эффективность приживления аллотрансплантатов у крыс независимо от донор-реципиентных различий, являются иммунные протеасомы с субъединицей LMP2 моноклеарных клеток печени. Обнаружено влияние репродуктивного нейропептида гонадотропин-рилизинг гормона на развитие тимуса у плодов крыс и влияние медиаторов иммунной системы на развитие гипоталамо-гипофизарно-репродуктивной системы.

Разработан метод дифференциальной диагностики тромботической тромбоцитопенической пурпуры на ранней стадии. На модели развития зародышей морского ежа отобраны 22 потенциальных противоопухолевых соединения. Изучены механизмы действия разработанных в ИБР РАН противоопухолевых композиций бортезомиба и менадиона натрия бисульфита: комбинированное влияние на протеасомы приводит к синергетическому цитотоксическому эффекту против опухолевых клеток и лежит в основе их высокой противоопухолевой эффективности и низкой токсичности у грызунов *in vivo*.

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.....	13
Подраздел 1.3 Протеасомы в развитии злокачественных опухолей. Поиск приложения к медицинской практике.....	21
РАЗДЕЛ 2 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ С УЧАСТИЕМ ПРОТЕАСОМ И ШАПЕРОНОВ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ.....	28
Подраздел 2.1 Регуляция клеточных процессов с участием протеасом в воспалительном процессе у кольчатых червей.....	28
Подраздел 2.2 Регуляция протеома клеток насекомых при инфекции бакуловирусами.....	31
РАЗДЕЛ 3 МЕХАНИЗМЫ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ВЫБОРА И РАЗВИТИЯ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ.....	34
РАЗДЕЛ 4 НЕЙРОГУМОРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ И ФОРМИРОВАНИЯ АДАПТИВНЫХ ПРОГРАММ НА ПРИМЕРЕ ЛИЧИНОК ВОДНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И НИЗШИХ	48
РАЗДЕЛ 5 ИССЛЕДОВАНИЕ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА У БОЛЬНЫХ С ПРИОБРЕТЕННЫМИ И ВРОЖДЕННЫМИ ФОРМАМИ ТРОМБОТИЧЕСКИХ МИКРОАНГИОПАТИЙ.....	56
РАЗДЕЛ 6 МЕХАНИЗМЫ ХИМИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СТАБИЛИЗАЦИИ И ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ СТРУКТУР.....	63
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	68
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ.....	71

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГГР – гипоталамо-гипофизарно-репродуктивная ось или система;
ГРГ – гонадотропин-рилизинг гормон;
ДО – Джонстоновы органы - слуховые органы комаров;
ДСТ – донорспецифическая толерантность;
ИЛ-2, 6, 10 – интерлейкины 2, 6, 10 и т.д.;
ЛПС – липополисахарид;
микРНК – короткие цепочки РНК длиной в 20-23 нуклеотида;
П5, П14, П20 – 5, 14, 20 и др. дни постнатального развития;
Сут – сутки;
ТТП – тромботическая тромбоцитопеническая пурпура;
Э12, Э20 – 12, 20 и др. дни эмбрионального развития;
Ach – холинергический;
CS – условный стимул;
FMRFамид – пептидергический;
HSP70 – белок теплового шока;
5-НТ – моноаминергический;
LMP7, LMP2 – протеолитически активные иммунные субъединицы протеасом;
MSB – менадиона натрия бисульфит (menadione sodium bisulfite);
US – безусловный стимул;
VAChT – везикулярный транспортер ацетилхолина;
VCP – валозин-содержащий белок (valosin-containing protein)

ВВЕДЕНИЕ

Значительный научный интерес представляет исследование роли гормонов, транскрипторов, 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) – изучение молекулярных механизмов развития донорспецифической толерантности (ДСТ). Ранее мы показали, что экспрессия протеасом с иммунной субъединицей LMP2 в печени важна для развития ДСТ у крыс инбредной линии Август при аллотрансплантации ткани яичников и щитовидной железы крыс Вистар. Настоящая работа посвящена выяснению ответа на вопрос, зависит ли данный факт от донор-реципиентных различий?

Еще одна задача (Подраздел 1.2) связана с исследованием участия гонадотропин-рилизинг гормона (ГРГ) в регуляции развития центрального органа иммунной системы тимуса и роли провоспалительных цитокинов в регуляции интраназальной миграции ГРГ-нейронов в мозг и становлении репродуктивной системы у потомства.

При нарушениях процессов онтогенеза млекопитающих и человека, связанных с несвойственным для нормальных клеток увеличением активности и экспрессии протеасом, зачастую развиваются злокачественные опухоли. Это указывает на протеасомы как на перспективные мишени для противоопухолевого воздействия. Применяемые в настоящее время ингибиторы протеасом (бортезомиб и др.) для лечения онкологических заболеваний вызывают серьезные побочные эффекты. Для уменьшения токсичности бортезомиба ранее мы создали композиции, содержащие низкие дозы этого ингибитора и менадиона натрия бисульфит (MSB). Цель настоящей работы – исследовать механизмы действия созданных композиций на злокачественные клетки и их протеасомы *in cellulo* и *in vitro* (Подраздел 1.3).

Важным является изучение регуляторных факторов, контролирующих качество протеома и обеспечивающих устойчивость клеток животных к неблагоприятным воздействиям внешней среды. Эти проблемы изучаются на модели морских беспозвоночных (губки) в условиях стресса вызванного липополисахаридом (ЛПС) (Подраздел 2.1) и в клетках чешуекрылых насекомых, инфицированных вирусом ядерного полиэдроза (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 роли материнского гена *Nanog* для становления нормальной архитектуры зародыша и клеточной спецификации во время гаструляции – с использованием мутантной линии данио. Раздел включает в себя также исследование содержащих серотонин и пептид FMRFамид ранних нейронов, их участия в регуляции адаптивной реакции личинки на изменение солености и влияния на её приспособительный диапазон. Фундаментальные знания о генезе нервной системы личинок позволят разработать новые экологические стратегии для остановки распространения опасных инвазивных видов-обрастателей.

Разделы 5 и 6 касаются фундаментальных исследований, важных для практического применения в будущем. Так, использован фенотипический метод скрининга на модели зародышей морского ежа для поиска новых веществ – ингибиторов клеточного деления, механизм действия которых обусловлен дестабилизацией микротрубочек (Раздел 6). Этот метод позволяет быстро идентифицировать вещества-антимитотики, дает представление об их механизме действия, не требует сложного дорогостоящего оборудования и дает хорошо воспроизводимые результаты. Раздел 5 посвящен разработке метода дифференциальной диагностики тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП) на ранней стадии, на которой ещё отсутствуют клинические признаки, но уже есть неспецифические проявления этой болезни (тромбоцитопения и петехии).

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

Увеличение продолжительности жизни трансплантата до сих пор остается важной проблемой биологии и медицины. Один из подходов к решению данной проблемы связан с уникальными свойствами печени поддерживать толерантность к пищевым и другим антигенам. Индукция донорспецифической толерантности (ДСТ) посредством введения клеток донора (спленоцитов, лимфоцитов, клеток костного мозга) в печень реципиента через портальную вену на стадии перед трансплантацией значительно увеличивает выживаемость аллографтов сердца, почек, кишечника, кожи, фрагментов щитовидной железы и яичников, островков поджелудочной железы [1].

Молекулярные механизмы развития ДСТ изучены мало. Ранее мы обнаружили, что после индукции ДСТ у крыс инбредной линии Август приживление ткани щитовидной железы или яичников, пересаженной от крыс аутбредной линии Вистар, сопровождалось значительным увеличением уровня иммунных протеасом с протеолитической субъединицей LMP2 в печени к 30 суткам после трансплантации [2, 3]. Важно отметить, что иммунные протеасомы существуют в клетках как множественные субтипы, отличающиеся набором протеолитически активных субъединиц. Иммунные субъединицы LMP7 и LMP2 могут встраиваться во вновь образующиеся протеасомы вместо конститутивных субъединиц как совместно, так и независимо друг от друга, образуя субтипы, содержащие субъединицы LMP7 и LMP2, и субтипы, содержащие либо субъединицу LMP7, либо субъединицу LMP2 [4–6]. Эти субтипы продуцируют разные олигопептиды из одних и тех же белков, что в свою очередь определяет информацию, передающуюся Т-лимфоцитам и, по-видимому, влияет на развитие иммунологической толерантности или отторжения [1].

В настоящее время отсутствуют сведения о влиянии индивидуальных особенностей донора и реципиента на данный процесс. Вместе с тем, понимание физиологических особенностей донора и реципиента важно для поиска подходов к стимуляции развития ДСТ. Целью настоящей работы явилось исследование экспрессии иммунных субъединиц

LMP2 и LMP7 протеасом в печени крыс после трансплантации ткани яичников на фоне индукции ДСТ в зависимости от донор-реципиентных различий. Использование крыс Август и Вистар в качестве пар донор-реципиент и реципиент-донор представляет особый интерес ввиду разного содержания моноаминов в головном мозге этих крыс [7] и вследствие этого разной регуляции физиологических процессов.

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). Индукцию ДСТ проводили, как описано ранее [8]. Трансплантацию яичников неонатальных крыс (1-5 сутки после рождения) под капсулу почки осуществляли в соответствии с опубликованным протоколом [2], за исключением того, что у крыс-реципиентов не удаляли яичники с целью гормонального воздействия на трансплантат.

В течение 37 сут после трансплантации исследовали две группы животных: 1 группа – крысы линии Вистар с индукцией ДСТ и трансплантацией ткани яичников (27 крыс), 2 группа – крысы линии Август с индукцией ДСТ и трансплантацией ткани яичников (27 крыс). Животные 3 и 4 групп – крысы с индукцией ДСТ без трансплантации (по 5 крыс линий Вистар и Август соответственно) – были использованы для определения начального уровня изучаемых показателей (7 сут после начала индукции ДСТ, 0 сут трансплантации).

Выделение и цитофлуориметрический анализ мононуклеарных клеток печени проводили, как описано ранее [8], с использованием поликлональных антител кролика к субъединице LMP7, моноклональных антител мыши к субъединице LMP2 (Biomol International, Великобритания), антител к IgG кролика, меченных Alexa 488 (Invitrogen, США), антител к IgG мыши, конъюгированных с фикоэритрином (eBioscience, США). 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.

1.1.3 Результаты и обсуждение

Визуальный осмотр ткани яичников под капсулой почки в разные периоды после трансплантации у крыс Вистар и Август не выявил достоверной разницы в размерах трансплантатов в течение первых 30 сут у животных обеих линий. Однако на 37 сут картина изменилась: у 6 из 9 крыс Вистар и у 4 из 9 крыс Август обнаружены увеличившиеся в размерах васкуляризованные трансплантаты (рисунок 1). Это свидетельствует о фолликулогенезе трансплантированной незрелой ткани яичников под действием гормональной стимуляции в организме самок репродуктивного возраста [9]. У остальных крыс на 37 сут выявлены остатки отторгнутых трансплантатов (рисунок 1.1).

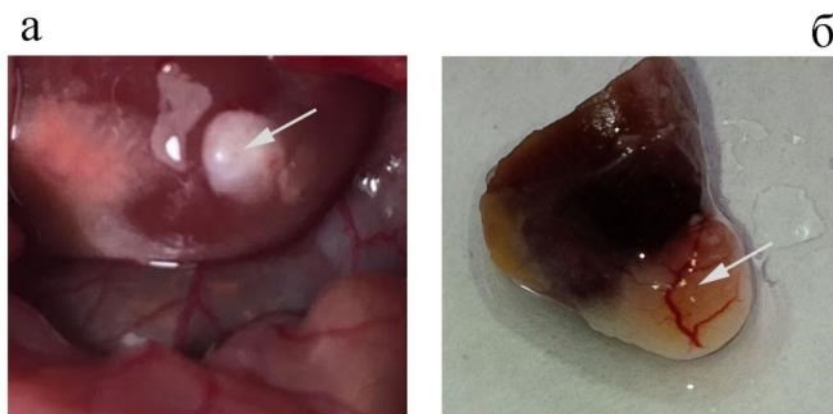


Рисунок 1.1 Фотографии отторгнутого (а) и прижившегося трансплантатов (б) ткани яичников под капсулой почки у самок крыс на 37 сут после трансплантации. Стрелками указаны трансплантаты.

Данный результат позволил провести сравнительный анализ содержания $LMP2^{+}$ - и $LMP7^{+}$ -клеток во фракции мононуклеарных клеток печени у животных с прижившимся и отторгнутым трансплантатом [10]. Оказалось, что у крыс обеих линий с прижившейся тканью яичников количество $LMP2^{+}$ -клеток в печени на 37 сут повышено, а у крыс с отторгнутым трансплантатом – снижено по сравнению с 0 сут (рисунок 1.2). Вместе с тем, разница в содержании $LMP2^{+}$ -клеток была более выражена у реципиентов линии Вистар с прижившимися аллографтами. Количество $LMP7^{+}$ -клеток в печени всех групп животных на 37 сут не отличалось от группы сравнения на 0 сут.

Таким образом, уровень иммунных протеасом с субъединицей $LMP2$ в мононуклеарных клетках печени связан с тонкими механизмами регуляции иммунных реакций и смещения их в сторону приживания или отторжения трансплантата.

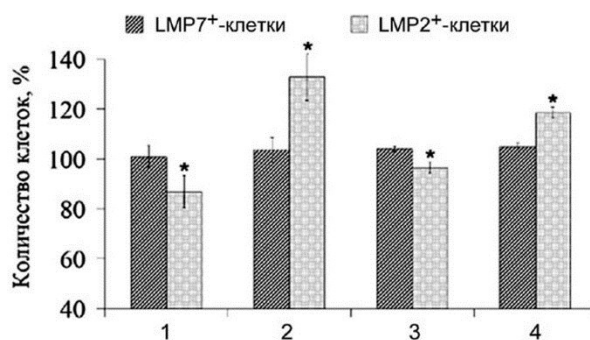


Рисунок 1.2 Количество LMP2⁺- и LMP7⁺-клеток во фракции моноклеарных клеток печени крыс линий Вистар и Август с прижившейся и отторгнутой тканью яичников на 37 сут после трансплантации. 1, 2 – крысы Август-доноры, крысы Вистар-реципиенты; 3, 4 – крысы Вистар-доноры, крысы Август-реципиенты. 1, 3 – крысы с отторгнутым трансплантатом; 2, 4 – крысы с прижившимся трансплантатом. * $p < 0,05$ по сравнению со значением на 0 сут.

Кроме того, обнаружено, что на более ранних сроках (на 7 сут) после индукции ДСТ у крыс Август и Вистар иммунные субъединицы выявляются в клетках, выстилающих стенки синусоидов печени, и в клетках, локализованных в просветах синусоидов [11]. По-видимому, иммунные протеасомы этих клеток, образуя антигенные пептиды для презентации иммунокомпетентным клеткам, участвуют в подавлении их активности и формируют молекулярную основу развития ДСТ уже на начальном этапе этого процесса.

1.1.4 Заключение

Уровень иммунных протеасом с субъединицей LMP2 в моноклеарных клетках печени является одним из ключевых факторов, определяющих эффективность приживления аллотрансплантатов у крыс независимо от донор-реципиентных различий. Клетки синусоидов печени, обогащенные иммунными протеасомами, по-видимому, формируют молекулярную основу развития ДСТ уже на начальном этапе этого процесса.

1.1.5 Список использованных источников

1 Карпова Я.Д., Божок Г.А., Алабедалякарим Н.М., Люпина Ю.В., Астахова Т.М., Легач Е.И., Шарова Н.П. Протеасомы и трансплантология: современное состояние проблемы и поиск перспективных направлений // Известия РАН. Серия биологическая. - 2017. № 3, С. 218–227.

2 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. № 3, С. 296–302.

3 Степанова А.А., Карпова Я.Д., Божок Г.А., Устиченко В.Д., Люпина Ю.В., Легач Е.И., Вагида М.С., Казанский Д.Б., Бондаренко Т.П., Шарова Н.П. Протеасомы при аллотрансплантации ткани щитовидной железы в условиях индукции донор-специфической толерантности у крыс // Биоорганическая химия. -2014. -Т. 40. № 1, С. 42–54.

4 Griffin T.A., Nandi D., Cruz M., Fehling H.J., van Kaer L., Monaco J.J., Colbert R.A. Immunoproteasome assembly. Cooperative incorporation of interferon γ (IFN γ)-inducible subunits // J. Exp. Med. -1998. -Vol. 187, P. 97–104.

5 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.

6 Guillaume B., Chapiro J., Stroobant V., Colau D., Van Holle B., Parvizi G., Bousquet-Dubouch M.P., Théate I., Parmentier N., Van den Eynde B.J. Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -2010. -Vol. 107, P. 18599–18604.

7 Доведова Е.Л., Хрусталева Д.А. Сравнительная характеристика ферментных систем обмена биогенных аминов в мозге крыс Вистар и Август при различных сроках воздействия амфетамина *in vivo* // Нейрохимия. -2007. -Т. 24. №2, С. 150–155.

8 Карпова Я.Д., Устиченко В.Д., Алабедалькарим Н.М., Степанова А.А., Люпина Ю.В., Богуславский К.И., Божок Г.А., Шарова Н.П. Изменение содержания иммунопротеасом и макрофагов в печени крыс при индукции донорспецифической толерантности // Acta Naturae. -2017. -Т. 9, № 3 (34). С. 35–44.

9 Kiroshka V.V., Tishchenko Yu.O. Dynamics of folliculogenesis of sexually mature and neonatal ovarian tissue under conditions of long-term heterotopical transplantation // J. Evolut. Biochem. Physiol. -2012. -Vol. 48, N 2. P. 189–198.

10 Карпова Я.Д., Люпина Ю.В., Алабедалькарим 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. № 6. С. 732–736.

11 Bozhok G.A., Alabedal'karim N.M., Legach E.I., Lyupina Y.V., Sharova N.P., Karpova Y.D. Changes in the Expression of Immune Proteasomes in the Liver after the Induction of Portal Tolerance Depending on Donor-Recipient Differences in Rats // Bull. Exp. Biol. Med. - 2018. -Vol. 164. No. 5. P. 541-644. doi: 10.1007/s10517-018-4049-2; Q 4.

Подраздел 1.2 Регуляция развития нейроэндокринной и иммунной систем

1.2.1 Введение

Согласно современным представлениям, взаимная регуляция нейроэндокринной и иммунной систем закладывается уже на начальных этапах их развития и осуществляется на протяжении всего онтогенеза. Ключевая роль в их взаимодействии принадлежит нейромедиаторам и гормонам гипоталамо-гипофизарно-адреналовой и гипоталамо-гипофизарно-репродуктивной (ГПР) систем. Среди них выделяют гонадотропин-рилизинг гормон (ГРГ), основная роль которого в гипоталамусе связана с регуляцией репродуктивной функции организма [1-3]. К настоящему времени показано влияние ГРГ на функционирование иммунной системы в постнатальном периоде онтогенеза. У половозрелых животных помимо мозга и гонад, ГРГ и его рецепторы выявлены в иммунной системе, что предполагает участие этого гормона в паракринной и аутокринной регуляции [1, 4-6]. В то же время данные о влиянии ГРГ на развитие иммунной системы немногочисленны. Ранее нами было показано, что ГРГ и его антагонист способны влиять на функциональную активность тимоцитов в пренатальном периоде развития [7, 8]. В раннем онтогенезе, в отличие от постнатального периода, нейроэндокринная система осуществляет не только регуляторную функцию, но и контролирует развитие периферических органов. В период онтогенеза, предшествующий формированию гемато-энцефалического барьера, синтезируемый в мозге ГРГ может поступать в общую циркуляцию [9]. Концентрация этого гормона в периферической крови плодов на порядок выше, чем у взрослых животных, что предполагает его участие в регуляции развития периферических органов-мишеней [8]. В связи с этим целью настоящей работы было исследовать механизмы регуляции развития центрального органа иммунной системы тимуса ГРГ до формирования ГПР оси. Нами были поставлены следующие задачи: 1. проанализировать паттерн экспрессии ГРГ-рецепторов в эмбриональном тимусе; 2. исследовать влияние ГРГ на синтез регуляторных цитокинов в органотипической культуре эмбриональных тимусов; 3. определить отдаленные последствия пренатального воздействия антагониста ГРГ на формирование и функционирование Т-системы иммунитета.

Иммунная система, в свою очередь, влияет на развитие нейроэндокринной системы, в частности, на развитие нейронов, синтезирующих ГРГ, контролирующего секрецию гонадотропинов и половых стероидов [10]. Накапливается все большее количество данных о негативном влиянии воспаления, вызванного вирусной или бактериальной инфекцией, на развитие физиологических систем плода [11]. Одним из

наиболее мощных естественных индукторов воспаления является ЛПС, основной компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий. ЛПС вызывает усиление синтеза цитокинов, ферментов, эйкозаноидов, адгезивных молекул. Повышенное содержания про- и противовоспалительных цитокинов у плодов может вызывать у них нарушения развития мозга, и как следствие, длительно текущие изменения поведения и нейроэндокринных функций [12, 13].

Согласно нашим данным, повышенное содержание интерлейкина (ИЛ) 6, лейкоemia ингибирующего фактора и белка хемотаксиса моноцитов у матери и плодов крыс, индуцированное ЛПС на ранних сроках беременности, вызывает нарушения развития и функционирования ГРГ-продуцирующей и репродуктивной систем [14, 15]. Нарушение баланса этих цитокинов приводит в ювенильном периоде к увеличению содержания в крови половых стероидов, а в половозрелом возрасте к снижению содержанию ГРГ в гипоталамусе и половых гормонов в крови.

Однако исследования о влиянии цитокинов на развитие ГРГ-продуцирующей системы плода единичны, а данные о возможной коррекции нарушений в репродуктивной системе в раннем онтогенезе отсутствуют.

Нейроны, синтезирующие ГРГ, характеризуются небольшой численностью, внемозговым происхождением и их миграцией в мозг. Предполагается, что провоспалительные цитокины могут являться связующим звеном между бактериальным инфицированием матери и последующими нарушениями развития ГРГ-продуцирующей и, соответственно, репродуктивной систем. Однако вопрос об участии цитокинов в развитии этих систем остается открытым. На основании наблюдаемого нами значительного увеличения содержания провоспалительных цитокинов в амниотической жидкости и крови плодов [14] мы предположили, что провоспалительные цитокины участвуют в регуляции интраназальной миграции ГРГ-нейронов в мозг и становления репродуктивной системы у потомства. Исследованию данного вопроса посвящена настоящая работа.

1.2.2 Материалы и методы

Исследования были направлены на выявление механизмов регуляции процессов становления тимуса, в котором Т-лимфоциты проходят основные стадии развития, с одной стороны, и выявлению роли цитокинов в процессах становления ГРГ системы, с другой, у плодов крыс и мышей в нормальных условиях и при системном воспалении, вызванном ЛПС (*E.coli*). Выявление сигнальных молекул, включающихся в регуляцию нейроэндокринных и иммунных процессов в раннем онтогенезе, а также механизмов их

действия на клетки-мишени, остается ключевой проблемой и приобретает особое значение при патологических состояниях. ГРГ и цитокины играют в этих процессах немаловажную роль. Однако вопрос о механизмах действия этих сигнальных молекул на иммунную и ГРГ системы остается открытым. Неизвестно, оказывают они прямой эффект на клетки-мишени через взаимодействие со специфическими рецепторами или опосредованно?

Методами Вестерн-блоттинга и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) на первом этапе наших исследований была проведена оценка экспрессии ГРГ-рецепторов в тимусе крыс Вистар (Питомник “Столбовая”, РАН) с 16 дня эмбрионального развития (Э16) до 3 дня постнатального развития (ПЗ).

Известно, что практически все клетки тимуса синтезируют цитокины, которые функционируют в виде так называемой “малой цитокиновой сети” и представляют собой близкодействующие факторы, осуществляющие обмен сигналами между клетками тимуса [16]. В связи с этим, нами была проведена оценка влияния ГРГ и его рецепторов на синтез и 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, а затем оценивали мРНК цитокинов ИЛ-1 α и β , ИЛ-2, ИЛ-10, гамма-интерферона (ИФН γ) и фактора некроза опухоли (ФНО α) методом ОТ-ПЦР. Концентрацию цитокинов в культуральной среде определяли методом проточной цитометрии с помощью цитометрических бус и антител к этим цитокинам, согласно рекомендации фирмы- производителя (Cytometric Bead Array, “BD Biosciences”, США), с использованием программного обеспечения CellQuestPro и CBA. Предел выявления цитокинов составлял 40 пг/мл.

Для выявления влияния пренатальной блокады ГРГ-рецепторов на развитие тимуса беременные крысы были анестезированы фентобарбиталом (50 мг/кг веса) на 17 день беременности. Плодам *in utero* вводили внутрибрюшинно 2 мкг в 20 мкл 0.9% NaCl антагонист ГРГ (анта-ГРГ, Sigma). Плодам контрольной группы животных вводили равный объем 0.9%-ного раствора NaCl. У родившегося потомства на П20 и П40 оценивали функциональную активность Т-лимфоцитов тимуса по пролиферативному ответу, индуцированному митогеном Конканавалином А ранее описанным методом [7].

Влияние ГРГ на дифференцировку Т-лимфоцитов в развивающемся тимусе оценивали в органотипической культуре тимусов, выделенных на Э18. 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).

Для выявления роли цитокинов в становлении ГПР системы нами была налажена модель органотипической культуры обонятельных плакод, выделенных из назальной области головы плодов мышей линии Balb/c (Питомник “Столбовая”, РАН) на Э12.

Миграционную способность ГРГ нейронов в культуре *ex vivo* оценивали иммуногистохимически с использованием антител к ГРГ. Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33342.

Начаты эксперименты по коррекции нарушений в репродуктивной системе крыс, вызванные введением ЛПС (*E.coli*) на Э12, в начальный период интраназальной миграции ГРГ нейронов. В период повышенного содержания тестостерона у потомства самок с П5 по П14 вводили подкожно антагонист тестостерона (флютамид, 20 мг/кг). Потомству самцов в период повышенного содержания эстрадиола с П14 по П30 вводили антагонист эстрадиола (фульвестрант, 1,5 мг/кг). Эффекты антагонистов оценивали у половозрелых животных на П80 по содержанию в крови половых гормонов.

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

Анализ паттерна экспрессии ГРГ-рецепторов в развивающемся тимусе плодов крыс показал их наличие с Э16. Максимальная экспрессия рецепторов была выявлена на Э17-18 преимущественно на тимоцитах (рисунок 1.3 А). Блокада ГРГ-рецепторов *in utero* анта-ГРГ на пике их экспрессии (Э17) приводила к подавлению Т-клеточного иммунного ответа у половозрелого потомства (рисунок 1Б). Подобный эффект не наблюдался после блокады рецепторов на третий день после рождения. Известно, что в раннем онтогенезе нейрогормоны контролируют рост и дифференцировку тканей и органов различных систем организма, в том числе и иммунной. Изменения баланса цитокинов вызывают нарушения программирования этих систем, что может приводить к нарушениям их функций в отдаленные периоды [3, 15, 17].

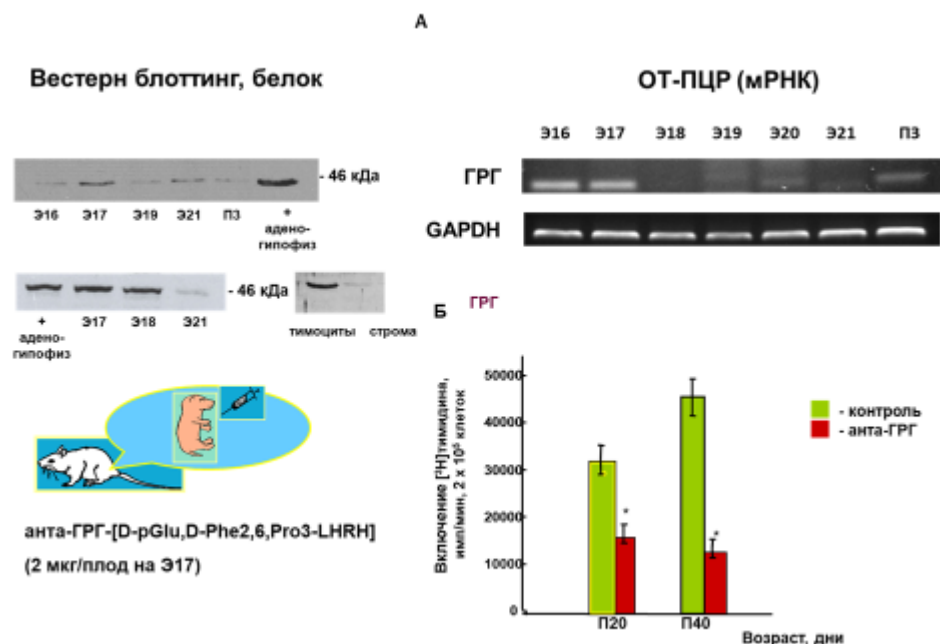


Рисунок 1.3 Возрастная динамика экспрессии рецепторов ГРГ в развивающемся тимусе крыс и их функциональная активность.

Влияние ГРГ на развитие тимуса может быть реализовано через цитокины, синтезируемые в тимусе плодов [18]. Добавление ГРГ в органотипическую культуру тимусов 18-ти дневных плодов приводит к увеличению экспрессии таких цитокинов, как ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-10, , ФНО α и ИФН γ , относящихся к рано синтезируемым цитокинам (на Э14). Увеличение экспрессии более поздних цитокинов (Э16) - ИЛ-1 α и ИЛ-2 не наблюдалось (рисунок 1.4). Анта-ГРГ подавлял их повышенный синтез. Увеличение экспрессии цитокинов сопровождалось двукратным увеличением численности Т-лимфоцитов-хелперов CD4 фенотипа, которые, как известно, являются источниками их синтеза. Таким образом, нарушение функциональной активности Т-лимфоцитов у половозрелого потомства после пренатального воздействия анта-ГРГ на пике экспрессии ГРГ-рецепторов свидетельствует о важной роли ГРГ в формировании тимуса. В реализацию эффекта ГРГ могут быть вовлечены цитокины, синтез которых увеличивается под действием ГРГ.

Для оценки функциональной значимости цитокинов в регуляции интраназальной миграции ГРГ-нейронов нами была налажена модель органотипической культуры обонятельных плакод, выделенных из назальной области головы плодов мышей (рисунок 1.5). Добавление в культуру различных провоспалительных цитокинов и их антагонистов позволит выявить конкретные сигнальные молекулы, среди которых можно выделить ИЛ-6.

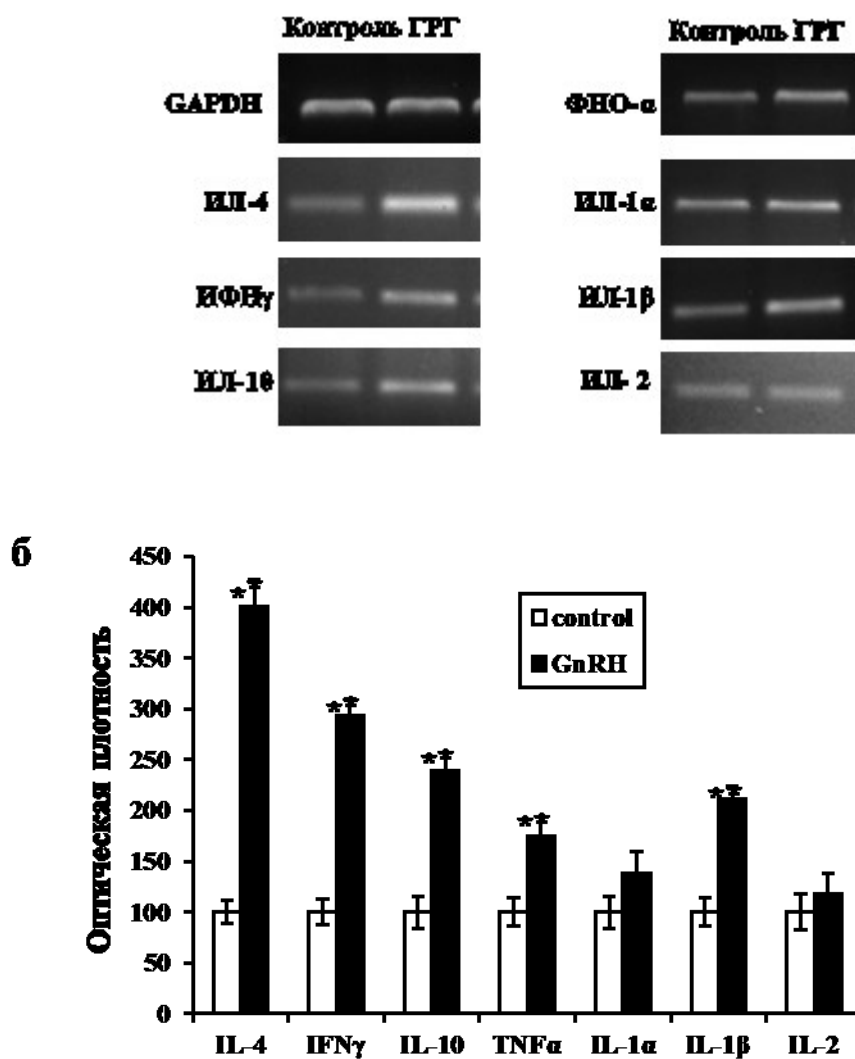


Рисунок 1.4 Влияние ГРГ (10^{-7} М) на синтез цитокинов (мРНК) в тимусе 18-ти дневных плодов (инкубация 24 ч). А – ПЦР, Б – оптическая плотность полос.

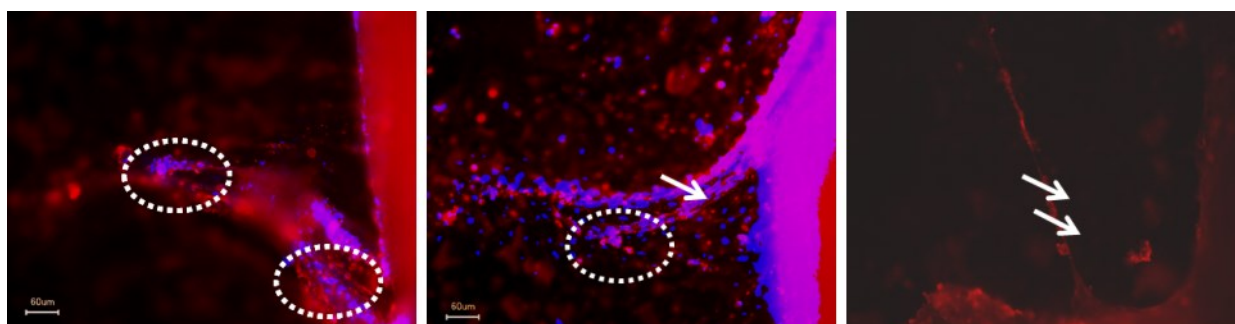


Рисунок 1.5 Примеры миграции ГРГ-нейронов (красный цвет) по прорастающим нервам (стрелки) в органотипической культуре обонятельных плакод плодов мыши. Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33342.

Нами была адаптирована описанная ранее модель [19]. Определяли состав инкубационной среды, способы прикрепления плакод и тип икубационных поверхностей. После прикрепления ткани на инкубационную поверхность проводили

иммуноцитохимическое определение присутствия ГРГ-нейронов в эмиграционных пулах клеток. Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33342.

Наряду с нарушением миграции ГРГ-нейронов после пренатального воздействия ЛПС, были выявлены также нарушения в развитии гонад у самок и самцов крыс, связанные, по-видимому, с повышенным содержанием провоспалительных цитокинов у плодов и половых стероидов в препубертатном периоде. Антагонисты рецепторов тестостерона (флютамид) и эстрадиола (фульвестрант), введенные в период повышенного содержания гормонов самкам и самцам, соответственно, восстанавливали половое созревание потомства. У них наблюдалось практически полное восстановление структуры половых желез, уровня половых гормонов и репродуктивной способности [11, 20, 21].

1.2.4 Заключение

Анализ литературных и собственных данных показал, что воздействия неблагоприятных факторов на ранних сроках беременности влияют на формирование нейроэндокринной и иммунной систем организма и их функционирование в отдаленные периоды жизни у потомства. Именно в раннем развитии реализуются эпигенетические механизмы, обеспечивающие адаптационную пластичность систем. Нарушения молекулярных механизмов регуляции развития в этот период могут приводить к длительно текущим или необратимым изменениям в их функционировании. Однако процессы становления этих систем не строго детерминированы генетически. Они характеризуются функциональной лабильностью и чувствительностью ко многим регуляторным факторам, что открывает возможности для коррекции нарушений процесса развития. Проведенная нами коррекция нарушений в репродуктивной системе антагонистами половых стероидов привела к восстановлению репродуктивной способности потомства. Таким образом, для своевременного предупреждения нарушений репродуктивного здоровья у людей детородного возраста необходимо контролировать как перинатальный, так и детский периоды развития.

1.2.5 Список использованных источников

1 Morale M.C., Gallo F., Tirolo C. et al. Neuroendocrine-immune (NEI) circuitry from neuron-glial interactions to function: Focus on gender and HPA-HPG interactions on early programming of the NEI system // Immunol. Cell. Biol. -2001. -Vol. 79. N. 4. P. 400-417.

2 Tomaszewska-Zaremba D., Herman A. The role of immunological system in the regulation of gonadoliberin and gonadotropin secretion // Reproductive biology. 2009. V. 9. P. 11-23.

3 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 Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery. -2009. -Vol. 3. P. 11–27.

4 Jacobson J.D., Crofford L.J., Sun L. et al. Cyclical expression of GnRH and GnRH receptor mRNA in lymphoid organs // Neuroendocrinology. -1998. -Vol. 67. P. 117–125.

5 Maroder M., Bellavia D., Vacca A. et al. The thymus at the crossroad of neuroimmune interactions // Ann. N. Y. Acad. Sci.- 2000. -Vol. 917. P. 741–747.

6 Tanriverdi F., Gonzalez-Martinez D., Hu Y., Kelestimur F., Bouloux P.M. GnRH-I and GnRH-II have differential modulatory effects on human peripheral blood mononuclear cell proliferation and interleukin-2 receptor gamma-chain mRNA expression in healthy males // Clin. Exp. Immunol. -2005. -Vol. 142. P. 103–110.

7 Zakharova L.A., Malyukova I.V., Proshlyakova E.V. Hypothalamo-pituitary control of the cell-mediated immunity in rat embryos: role of LHRH in regulation of lymphocyte proliferation // J. Reprod. Immunol. -2000. -Vol. 47. P. 17–32.

8 Zakharova L., Ermilova I.Y., Melnikova V. et al. 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. - Vol. 12. P. 85–91.

9 Угрюмов М.В. Механизмы нейроэндокринной регуляции. М.: “Наука”, -1999. 299 с.

10 Zakharova LA, Izvolskaia MS. Interactions between the reproductive and immune systems during ontogenesis: the role of GnRH, sex steroids and immunomediators. In book “Sex Steroids”. -2012. Zagreb, InTech. P. 341–370.

11 Izvolskaia Marina, Sharova Viktoria, Zakharova Liudmila. Prenatal Programming of Neuroendocrine System Development by Lipopolysaccharide: Long-Term Effects // Int. J. Mol. Sci. -2018, -Vol. 19 (11), 3695. doi:10.3390/ijms19113695.

12 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. -Vol. 1265. P. 196-204.

13 Zakharova, L. Perinatal stress in brain programming and pathogenesis of psychoneurological Disorders // Biology Bulletin. -2015, -Vol. 42. N 1. P 12–20.

14 Sharova VS, Izvolskaia MS, Zakharova LA. Lipopolysaccharide-induced maternal inflammation affects the gonadotropin-releasing hormone neuron development in fetal mice. Neuroimmunomodulation. -2015. -Vol. 22. P. 222-232.

- 15 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. -Vol. 3. P. 1–8.
- 16 Yarilin A.A., Belyakov I.M. Cytokines in the thymus: production and biological effects // *Curr. Med. Chem*. -2004. -Vol. 11. P. 447–464.
- 17 Zambrano E., Guzman C., Rodriguez-Gonzalez G. L. et al. Fetal programming of sexual development and reproductive function // *Molecular and Cellular Endocrinology*. -2014. -Vol. 382. P. 538–549.
- 18 Montgomery R.A., Dallman M.J. Analysis of cytokine gene expression during fetal thymic ontogeny using the polymerase chain reaction // *J. Immunol*. -1991. -Vol. 147. P. 554–560.
- 19 Klenke U, Taylor-Burds C. Culturing embryonic nasal explants for developmental and physiological study. *Curr Protoc Neurosci*. -2012. Chapter 3:Unit 3.2516. doi:10.1002/0471142301.
- 20 Ignatiuk V.M., Izvolskaya M.S., Sharova V.S., Voronova S.N., Zakharova L.A. Disruptions in the reproductive system of female rats after prenatal lipopolysaccharide-induced immunological stress: role of sex steroids // *Stress*. -2018. -Vol. 21. N 5. P.1-9. online <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.150>.
- 21 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*. -2018:e13204. doi: 10.1111/and.13204. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/and.13204>.

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

1.3.1 Введение

Протеасомы регулируют клеточные процессы и контролируют протеом, образуя биологически активные пептиды и гидролизуют факторы роста и транскрипции, рецепторы, компоненты сигнальных путей и другие белки. В различных развивающихся злокачественных опухолях млекопитающих и человека увеличены активность и экспрессия протеасом по сравнению с нормальными тканями [1, 2]. Напротив, в регрессирующей карциносаркоме Walker 256 активность и содержание протеасом резко падают [3]. Таким образом, рост опухолей зависит от функциональной активности протеасом, что делает их перспективными мишенями для противоопухолевого

воздействия. Применяемые в настоящее время ингибиторы протеасом (бортезомиб, карфилзомиб, иксазомиб) для лечения множественной миеломы вызывают серьезные побочные эффекты. Для уменьшения токсичности бортезомиба мы создали композиции, содержащие низкие дозы этого ингибитора и менадиона натрия бисульфит (MSB) [4]. Цель настоящей работы – исследовать механизмы действия созданных композиций на злокачественные клетки и их протеасомы *in cellulo* и *in vitro*.

1.3.2 Материалы и методы

Использовали клетки эпидермоидной карциномы (линия A-431) человека, гепатоклеточной карциномы (линия Нера 1-6) мыши и аденокарциномы толстой кишки (линия C26) мыши.

Множественные формы протеасом и их активность исследовали с помощью оригинального метода нативного электрофореза, разработанного нами для неочищенных фракций протеасом [5]. Химотрипсинподобную активность общего пула протеасом *in vitro* оценивали по гидролизу флуорогенного субстрата Suc-LLVY-AMC [5].

Цитотоксические эффекты соединений исследовали с помощью стандартного МТТ-теста. Апоптоз и некроз изучали методом проточной цитометрии с использованием соответственно Аннексина V, конъюгированного с FITC, и красителя SYTOX™ Blue Dead Cell (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 8.0. (Statsoft, 2008, <https://www.tibco.com/products/tibco-statistica>).

1.3.3 Результаты и обсуждение

В экспериментах *in cellulo* обнаружено, что MSB подавляет активность протеасом клеток C26 – аденокарциномы толстой кишки и других клеток во внутриклеточной среде [6]. При этом MSB оказывает опосредованное действие на протеасомы, генерируя супероксидные радикалы за счет нафтохиноновой структуры. Оригинальным методом нативного электрофореза показано, что MSB в исследуемых концентрациях подавляет активность не всех форм протеасом, а только 26S-протеасом, не влияя на их количество (рисунок 1.6). 26S-протеасомы отличаются от других форм наличием 19S-активатора, который, очевидно, и является мишенью непрямого действия MSB. Показано, что MSB таким же образом действует на клетки Нера 1-6 и другие злокачественные клетки.

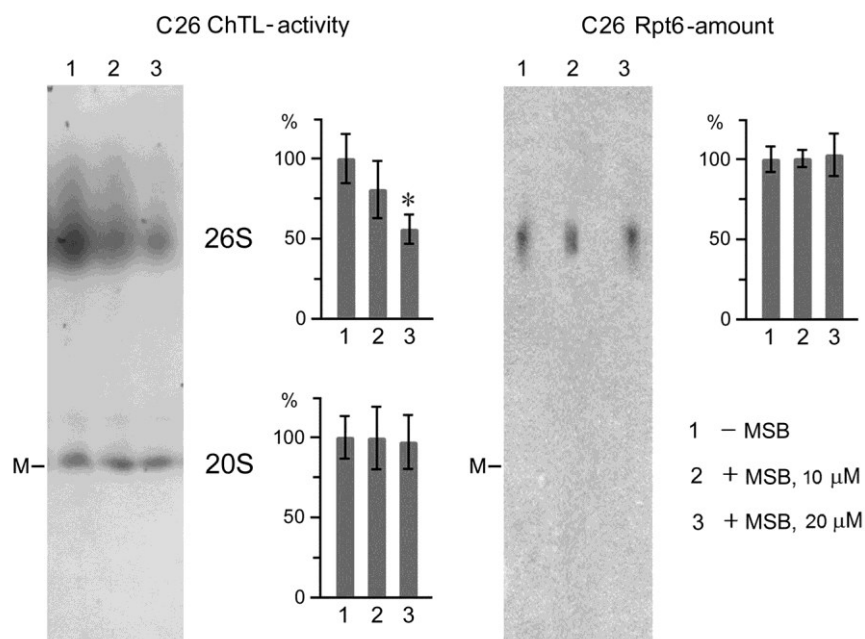


Рисунок 1.6 Действие MSB на химотрипсинподобную активность протеасом клеток C26.

Левая панель – активность протеасом в нативном геле после инкубации клеток в отсутствие или в присутствии MSB в течение 48 ч. Тироглобулин (670 кДа), меченный Су-3.5, использовали в качестве маркера (М) молекулярной массы. Правая панель – Вестерн блоты и содержание субъединицы Rpt6, маркера 19S-активатора. Активность нормализована на 10^6 клеток. * $p < 0.05$, $n = 5$. Рисунок опубликован [6].

В экспериментах *in vitro* MSB не влиял на активность протеасом клеток Нера 1-6 и А-431. Бортезомиб, взятый отдельно, оказывал доза-зависимый ингибирующий эффект на протеасомы обеих линий, MSB усиливал этот эффект. Синергетический эффект бортезомиба и MSB оценивали с помощью Блисс-метода (рисунок 1.7). Следует отметить, что линейка концентраций обоих соединений в данном эксперименте включала и концентрации, соответствующие их дозам в разработанных препаратах. Возникает вопрос о механизме синергетического действия бортезомиба и MSB. Этот вопрос мы исследовали с помощью разработанного нами оригинального метода нативного электрофореза. Осветленный гомогенат инкубировали в отсутствие или присутствии исследуемых соединений 60 мин, 37 °С. Затем протеасомы осветленного гомогената подвергали нативному электрофорезу и анализировали их активность в геле (рисунок 1.8).

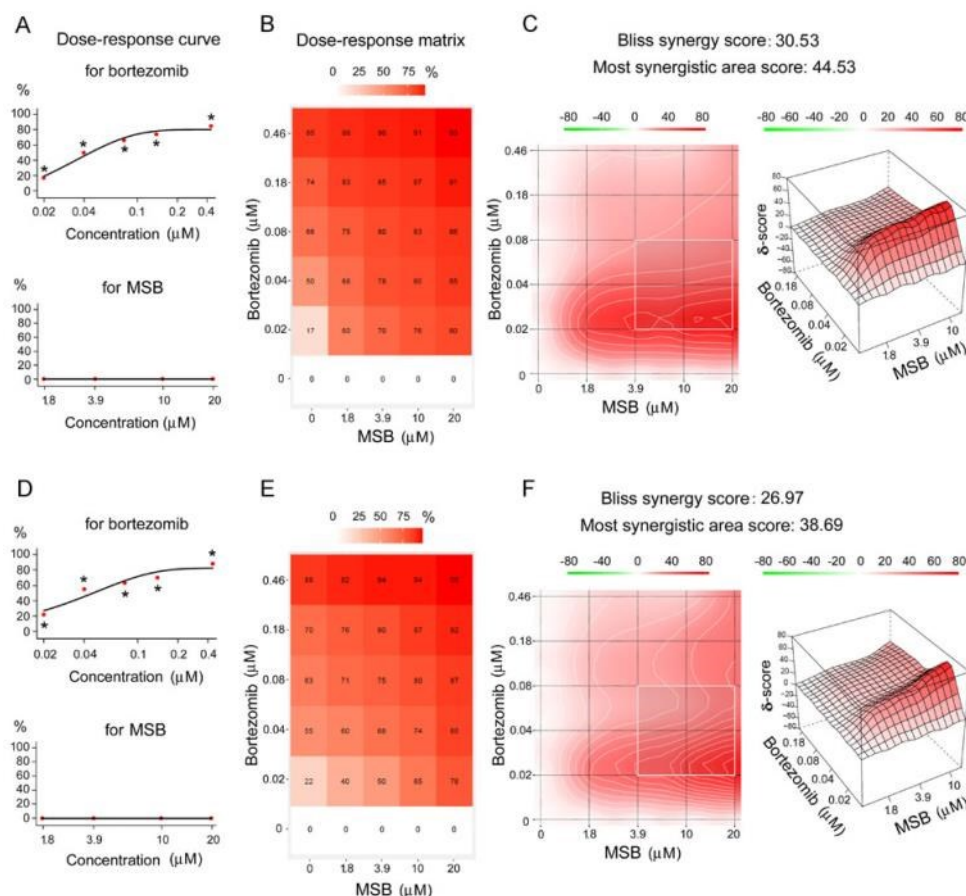


Рисунок 1.7 Синергетический эффект бортезомиба и MSB на химотрипсинподобную активность протеасом осветленных гомогенатов клеток Нера 1-6 (А–С) и А-431 (D–F). Доза-зависимые кривые для отдельно взятых соединений (А, D); доза-зависимый матрикс для комбинации соединений (В, Е); 2D и 3D карты синергии в Блисс-модели (С, F). * $p < 0.05$, $n = 10$. Рисунок опубликован [6].

Оказалось, что MSB усиливает действие бортезомиба против всех выявленных форм протеасом. Мы предположили, что этот эффект связан с облегчением проникновения бортезомиба в протеолитическую камеру протеасом. Очевидно, MSB за счет гидрофобной части молекулы приоткрывает гидрофобную пробку протеасом и способствует входу бортезомиба в протеолитическую камеру. Этого приоткрывания недостаточно для облегчения проникновения субстрата, молекулярная масса которого вдвое превышает молекулярную массу бортезомиба. Бортезомиб является конкурентным обратимым ингибитором протеасом, поэтому его дополнительные количества, проникая в протеолитическую камеру под действием MSB, вызывают более значимое ингибирование протеасомной активности.

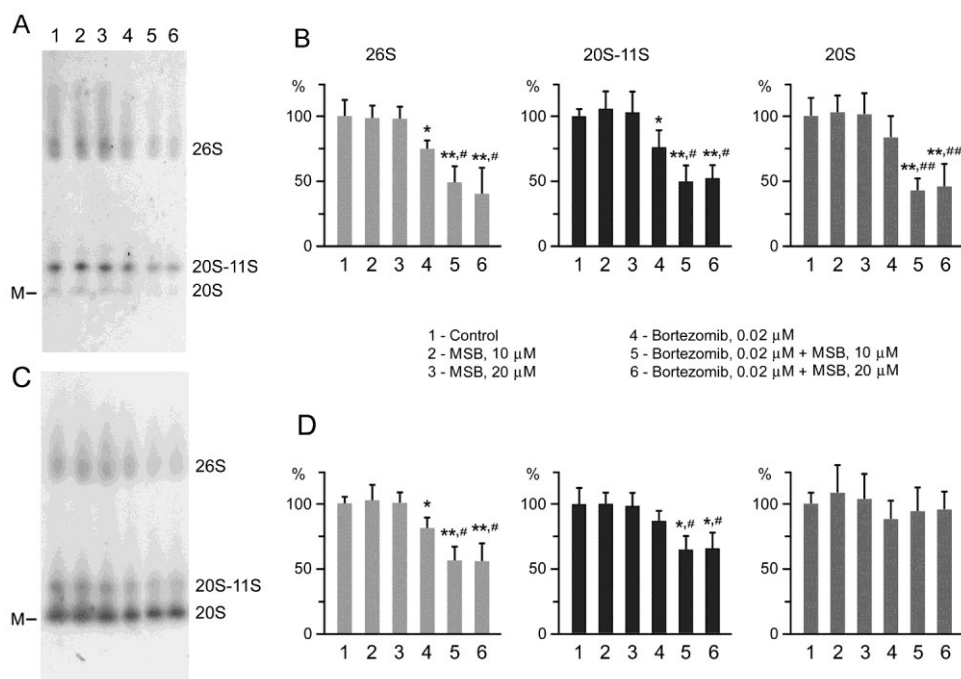


Рисунок 1.8 Действие MSB и бортезомиба на химотрипсинподобную активность протеасом клеток Нера 1-6 in vitro. Активность протеасом определяли в отсутствие (А, В) и в присутствии 0,04% SDS (С, D). Тироглобулин (670 кДа), меченный Су-3.5, использовали в качестве маркера (М) молекулярной массы; осветленные гомогенаты получены из 10^3 клеток (на дорожку). Достоверное отличие от контрольных проб при $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; от проб в присутствии бортезомиба при $^{\#}p < 0.05$; $^{\#\#}p < 0.01$, $n = 5$. Рисунок опубликован [6].

Данное предположение подтверждает результат эксперимента по определению активности протеасом в геле в присутствии 0,04% SDS (рисунки 1.8 С и D). Эта концентрация SDS полностью открывает вход в 20S-протеасомы для используемого нами субстрата. Активность этой формы протеасом резко возросла, субстрат вытеснил бортезомиб, и, как следствие, исчез эффект MSB, усиливающий действие бортезомиба.

Комбинированное действие MSB и бортезомиба на протеасомы опухолевых клеток приводит к синергетическому цитотоксическому эффекту. Причем MSB усиливает действие бортезомиба и в отношении апоптоза, и в отношении некроза. На рисунке 1.9 показана схема механизмов действия MSB и бортезомиба, лежащих в основе низкой токсичности и высокой противоопухолевой эффективности композиций этих соединений в доклинических исследованиях на моделях грызунов.

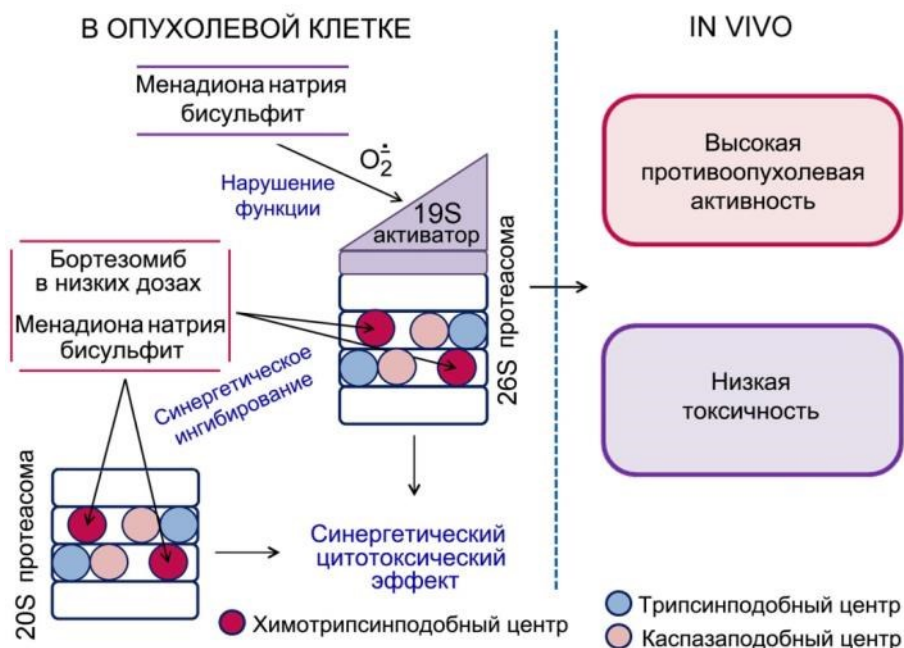


Рисунок 1.9 Схематическое представление механизмов действия MSB и бортезомиба.

Кроме того, за отчетный период проведено исследование химотрипсинподобной и каспазаподобной активностей и экспрессии тотального пула протеасом у больных немелкоклеточным раком легкого [7]. Выявлены повышенные активности протеасом в тканях первичных опухолей и лимфогенных метастазах по сравнению с неизменной тканью легкого. Количество протеасом в метастазах снижалось, а в тканях первичных опухолей оставалось неизменным. Очевидно, активности протеасом в тканях первичных опухолей и лимфогенных метастазах зависят не только от количества протеасом, но подвергаются более сложной регуляции. Таким образом, развитие метастатического процесса при немелкоклеточном раке легких связано с нелинейным изменением активности и содержания протеасом как в тканях первичных опухолей, так и в лимфогенных метастазах.

1.3.4 Заключение

Изучены механизмы действия разработанных в ИБР РАН противоопухолевых композиций MSB и бортезомиба: комбинированное влияние этих соединений на протеасомы приводит к синергетическому цитотоксическому эффекту против опухолевых клеток и лежит в основе их высокой противоопухолевой эффективности и низкой токсичности у грызунов *in vivo*. Разработанные композиции могут быть перспективными для лечения немелкоклеточного рака легких ввиду повышенной активности протеасом как в первичной опухоли, так и в лимфогенных метастазах у пациентов с этим онкологическим заболеванием.

1.3.5 Список использованных источников

1 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. No 4, P. 486–496.

2 Shashova E.E., Lyupina Y.V., Glushchenko S.A., Slonimskaya E.M., Savenkova O.V., Kulikov, A.M., Gornostaev N.G., Kondakova I.V., Sharova N.P. Proteasome functioning in breast cancer: Connection with clinical-pathological factors // PLoS ONE. -2014. -Vol. 9, e109933.

3 Zakharova L.A., Khagai I.I., Sharova N.P., Melnikova V.I., Karpova Y.D., Astakhova T.M., Popova N.A., Ivanova L.N. Pattern of MHC class I and immune proteasome expression in Walker 256 tumor during growth and regression in Brattleboro rats with the hereditary defect of arginine-vasopressin synthesis // Cell. Immunol. -2011. -Vol. 271. P. 385–391.

4 Шарова Н.П., Астахова Т.М., Морозов А.В., Ерохов П.А., Люпина Ю.В., Михайловская М.И., Чупикова Н.И., Сафаров Р.Р. Синергетическая комбинация ингибитора протеасом и витамина К для ингибирования роста и пролиферации опухолевых клеток, фармацевтическая композиция и противоопухолевое лекарственное средство на ее основе. Патент на изобретение № 2563986 от 31 августа 2015 г. РФ.

5 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.

6 Astakhova T.M., Morozov A.V., Erokhov P.A., Mikhailovskaya M.I., Akopov S.B., Chupikova N.I., Safarov R.R, Sharova N.P. Combined Effect of Bortezomib and Menadione Sodium Bisulfite on Proteasomes of Tumor Cells: The Dramatic Decrease of Bortezomib Toxicity in a Preclinical Trial // Cancers. -2018. -Vol. 10. Issue 10. pii: E351. doi: 10.3390/cancers10100351.

7 Колегова Е.С., Кондакова И.В., Завьялов А.А., Добродеев А.Ю., Шарова Н.П. Функционирование протеасом при лимфогенном метастазировании немелкоклеточного рака легкого // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. -2018. -Т. 165. № 4. С. 481–484.

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

Подраздел 2.1 Регуляция клеточных процессов с участием протеасом в воспалительном процессе у кольчатых червей

2.1.1 Введение

Актуальной проблемой биологии и медицины является выяснение механизмов адаптации и регуляции протеома клеток у многоклеточных животных. Ключевую роль в деградации индивидуальных белков в эукариотических клетках играет убиквитин-протеасомная система. Протеасомы взаимодействуют с белками шаперонами, которые повышают стабильность протеолитического комплекса, регулируют связывание с субстратом, утилизацию убиквитина и другие процессы [1-3]. Роль протеасом и шаперонов в обеспечении адаптационной пластичности у эволюционно удалённых холодноводных беспозвоночных не изучена. Не исследована структурная организация протеасом у морских губок, предковых форм Metazoa. Неизвестны молекулярные особенности функционирования протеасом в мышечных клетках аннелид при индукции воспаления. Использование модельных беспозвоночных позволяет получить оригинальные сведения о механизмах адаптации клеток многоклеточных организмов, находящихся на ранних этапах эволюции. В наших исследованиях использована уникальная природная система морских беспозвоночных приливно-отливной зоны холодноводных морей, характеризующаяся чрезвычайной устойчивостью к изменениям внешних факторов. Ранее нами были выявлены изменения в функционировании протеасом целомацитов аннелиды *Arenicola marina* при инфицировании ЛПС [4]. За отчетный период нами произведена de novo сборка генов белков протеасом холодноводных морских губок *Halichondria panicea* и *Halisarca dujardini*. Обнаруженные последовательности выложены в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Установлена взаимосвязь экспрессии белков теплового шока и активности протеасом с присутствием симбионтов бактерий рода *Pseudoalteromonas* в клетках различных морф холодноводных морских губок *H. panicea* (кл. *Demospongiae*). Полученные результаты частично опубликованы в журнале Докл. Акад. Наук. (Q4) [5]. Выявлены различия в структуре 20S протеасом мышечных клеток аннелиды *A. marina* при воспалении, индуцированном введением ЛПС.

2.1.2 Материалы и методы

В работе использованы современные методы молекулярной биологии, биохимии и протеомного анализа. Первичную структуру белка определяли с помощью секвенирования мРНК и методов биоинформатики. Белки протеасом выделяли с помощью разработанного в лаборатории оригинального метода электрофореза в нативном полиакриламидном геле и анализировали с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF. Протеолитическую активность протеасом определяли с использованием флуоресцентного субстрата Suc-LLVY-AMC. Экспрессию белков определяли с помощью Вестерн-блоттинга и специфичных антител. Ингибирование активности протеасом проводили с помощью специфических ингибиторов (MG-132 и бортезомиб). Субклеточную локализацию белков исследовали с помощью конфокальной микроскопии. Все методы, включая оригинальные разработки, описаны в публикациях коллектива лаборатории [4, 6].

2.1.3 Результаты и обсуждение

Характерной особенностью протеасом холодноводных губок и многощетинковых червей является низкое содержание формы 26S, свидетельствующее о том, что их протеасомная система специализируется преимущественно на гидролизе неубиквитинированных белков. Впервые нами установлена протеомная структура протеасом холодноводных морских губок *H. panicea* и *H. dujardini*. Осуществлена de novo сборка мРНК генов белков протеасом этих организмов. Установленные последовательности депонированы в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Для *H. dujardini*: BankIt2129107 Seq1-38 MH586732- MH586769; и для *H. panicea*: BankIt2136016 Seq1-39 MH683002- MH683040 [7]. Показана взаимосвязь состава эпibiонтов бактерий, экспрессии белков теплового шока HSP70 и активности протеасом клеток различных морф холодноводных морских губок *H. panicea* (кл. *Demospongiae*)[5]. Инфицирование (введение ЛПС) приводит к выраженной индукции синтеза белков теплового шока HSP70 и субъединиц 20S-протеасом и переключению протеасомной системы целоцитов на гидролиз 20S-протеасомами [4]. Нами установлено, что при инфицировании ЛПС происходит повышение активности протеасом и изменение электрофоретической подвижности в нативном геле 20S протеасом мышечных клеток аннелид. Методом масс-спектрометрии и протеомного анализа показано, что различия в подвижности протеасомной фракции в нативном геле обусловлены изменениями в субъединице бета7 коровой части протеасом. Введение специфического ингибитора протеасом, бортезомиба в дозе 10 мкМ, ингибирует повышение активности протеасом в клетках червя. Вестерн-блоттинг и конфокальная микроскопия показали увеличение содержания белков протеасом в условиях воспаления.

Таким образом, в ходе работы изучены особенности функционирования клеточных протеасом и шаперонов многоклеточных организмов, находящихся на ранних этапах эволюции. Впервые описаны протеасомы губок и показана важная роль симбионтов в регуляции их активности.

2.1.4 Заключение

Проведенное исследование выявило особенности протеасомных механизмов адаптации в клетках эволюционно удалённых беспозвоночных, губок и аннелид. Значительная эволюционная дистанция между представителями этих классов беспозвоночных позволяет предположить, что структурные перестройки в 20-протеасоме могут быть использованы для поддержания гомеостаза клеточного протеома в процессах адаптации у разных видов многоклеточных животных. Результаты работы следует учитывать при создании препаратов для коррекции нарушений адаптационной пластичности у млекопитающих.

2.1.5 Список использованных источников

- 1 Díaz-Villanueva J.F., Díaz-Molina R. and García-González V. Protein folding and mechanisms of proteostasis // *Int. J. Mol. Sci.* - 2015. - Vol.16, No 8. P.17193 - 17230.
- 2 Quadroni M., Potts A. and Waridel P. Hsp90 inhibition induces both protein-specific and global changes in the ubiquitinome // *J. Proteomics.* -2015. - Vol. 120. P. 215 - 229.
- 3 Vanoli A., Necchi V., Barozzi S., Manca R., Pecci A. and Solcia E. Chaperone molecules concentrate together with the ubiquitin-proteasome system inside particulate cytoplasmic structures: possible role in metabolism of misfolded proteins // *Histochem. Cell. Biol.* - 2015. - Vol.144, No2. P. 179 - 184.
- 4 Становова М. В., Ерохов П. А., Горностаев Н. Г., Михайлов В. С., Люпина Ю. В. Роль протеасом в неспецифическом иммунном ответе у морских аннелид. Докл. Акад., Наук – 2016. - Т. 471, No 1, С.428 - 430.
- 5 Кравчук О.И., Лавров А.И., Финошин А.Д., Горностаев Н.Г., Георгиев А.А., Абатурова С.Б., Михайлов В.С., Люпина Ю.В. Роль эписимбионтов бактерий рода *Pseudoalteromonas* и клеточных протеасом в адаптивной пластичности морских холодноводных губок. Докл. Акад. Наук. – 2018 - Т. 479, No 2, С. 1–3.
- 6 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 - 2016. - Vol. 864, No 6. P. 738 - 746.

7 Finoshin A.D., Kravchuk O.I., Mikhailov V.S., Lyupina, Y.V. GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Для *H. dujardini*: BankIt2129107 Seq1-38 MH586732- MH586769; и для *H. panicea*: BankIt2136016 Seq1-39 MH683002- MH683040.

Подраздел 2.2 Регуляция протеома клеток насекомых при инфекции бакуловirusами

2.2.1 Введение

Взаимодействие вирусов и хозяйских клеток является важной проблемой вирусологии, клеточной биологии и медицины. В ходе эволюции вирусы выработали эффективные механизмы противодействия защитным барьерам клетки и организма и научились перестраивать клеточный метаболизм для обеспечения инфекционного процесса и собственного размножения. Исследование взаимодействия бакуловirusов с клетками насекомых является актуальной научной задачей в связи с широким использованием этих вирусов в биотехнологии для продукции различных белков, в сельском хозяйстве для борьбы с насекомыми вредителями и в медицине для производства вакцин и в качестве перспективных векторов для генотерапии. Классической модельной системой для исследования бакуловirusов являются клетки листовой кукурузной совки *Spodoptera frugiperda*, инфицированные вирусом ядерного полиэдроза AcMNPV. В отчетный период нами проведено исследование роли клеточной транспортной АТФазы и сегрегазы VCP/p97 в инфекционном цикле бакуловirusа AcMNPV. Полученные результаты опубликованы в журнале *Virus Research* [1].

2.2.2 Материалы и методы

В работе использованы различные современные методы вирусологии, молекулярной и клеточной биологии, биохимии и протеомного анализа. Для анализа репликации вирусного генома использовали ПЦР в реальном времени. Первичную структуру белка определяли с помощью секвенирования мРНК и методов биоинформатики. Белок VCP/p97 выделяли с помощью разработанного в лаборатории оригинального метода электрофореза в нативном полиакриламидном геле и анализировали с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF. Протеолитическую активность протеасом определяли с использованием флуоресцентного субстрата Suc-LLVY-AMC. Экспрессию белков в ходе инфекционного цикла вируса определяли с

помощью Вестерн-блоттинга и специфичных антител. Ингибирование активности белка VCP/p97 проводили с помощью специфических ингибиторов и РНК-интерференции. Субклеточную локализацию исследовали с помощью конфокальной микроскопии. Для анализа продукции вируса использовали апробированные методы бакуловирологии. Все методы, включая оригинальные разработки, описаны в публикации по результатам проекта и в ранних публикациях коллектива [1-4].

2.2.3 Результаты и обсуждение

Проведенный протеомный анализ показал, что белок VCP/p97 в клетках насекомого *S. frugiperda* (линия Sf9) содержит 806 аминокислот и имеет массу 89 кДа. В клетках белок формирует из шести мономеров комплекс с массой 535 кДа, который мигрирует при электрофорезе между вакуольной АТФазой (~500 кДа) и 20S протеасомами (~670 кДа). Коммерческий препарат NMS-873 (Sigma), который является специфическим ингибитором АТФазной активности VCP/p97, в концентрациях 3-10 мкМ оказывает выраженный цитостатический эффект на клетки Sf9 и незначительно снижает их выживаемость в условиях опыта продолжительностью 48 час. Ингибитор NMS-873 оказался эффективным ингибитором инфекционного цикла вируса. Он вызывает ингибирование репликации генома вируса, подавление синтеза вирусных белков и блокирует продукцию зрелых вирусных частиц в концентрациях, не обладающих цитотоксическим эффектом. Вестерн-блоттинг и конфокальная микроскопия показали увеличение концентрации белков, модифицированных убиквитином, в условиях ингибирования активности клеточной транспортной АТФазы VCP/p97. Контрольные опыты показали, что повышенная продукция убиквитинированных белков не связана с подавлением протеолитической активности протеасом. Дополнительные эксперименты также показали снижение продукции вируса в условиях белка VCP/p97 с помощью РНК-интерференции. Однако ингибирующий эффект был менее выраженным в связи со специфическим механизмом деградации экзогенной РНК в клетках, связанным с защитным механизмом от инфицирования РНК-вирусами. Таким образом, в ходе работы изучено функционирование транспортной АТФазы VCP/p97 в клетках насекомых, инфицированных бакуловирусами, и показана важная роль этого белка в репродукции вирусов.

2.2.4. Заключение

Проведенное исследование показало, что транспортная АТФаза VCP/p97 выполняет важную функцию в инфекционном цикле бакуловирусов, которая связана с

процессингом убиквитинированных белков и поддержанием протеомного гомеостаза в инфицированных клетках. Результаты работы следует учитывать в биотехнологических приложениях, в которых используются клетки насекомых, инфицированные рекомбинантными бакуловирусами. В работе с инфицированными клетками следует контролировать функционирование факторов регуляции протеома, среди которых шапероны, протеасомы, а также белок VCP/p97.

2.2.5 Список использованных источников

1 Lyupina Y.V., Erokhov P.A., Kravchuk O.I., Finoshin A.D., Abaturova S.B., Orlova O.V., Beljelarskaya S.N., Kostyuchenko M.V., Mikhailov V.S. Essential function of VCP/p97 in infection cycle of the nucleopolyhedrovirus AcMNPV in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells//Virus Res. - 2018. - Vol. 253. P. 68 - 76.

2 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, No. 1. P. 49 - 58.

3 Lyupina Y.V., Orlova O.V., Abaturova S.B., Beljelarskaya S.N., Lavrov A.N., Mikhailov V.S. Egress of budded virions of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus does not require activity of *Spodoptera frugiperda* HSP/HSC70 chaperones//Virus Res. - 2014. - Vol. 192, P. 1 - 5.

4 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 - 2016. - Vol. 864, No 6. P. 738 - 746.

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. Представление о химической основе работы нервных клеток, так же как и обоснование универсального значения сравнительных физиологических исследований для понимания механизмов, организующих поведение животного, восходят к Х.С. Коштыяцу, который и сейчас воспринимается как основатель нашего направления исследований [1,2]. 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 легко доступных. 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. Однако общее представление о целостных механизмах интегрирующего влияния выделяемых факторов нервной системы еще не

сложилось. В действующем проекте интегрирующая роль медиаторов в онтогенезе животных исследуется на широком спектре физиологических моделей: эмбриональное и постэмбриональное развитие морских и наземных беспозвоночных, экспрессия генов, кодирующих нейропептиды и рецепторы к сигнальным молекулам, лиганд-рецепторные взаимодействия, развитие внутримозговых связей и организация поведенческих актов.

Одно из основных направлений исследований в настоящем разделе программы связано с определением роли химических факторов в механизмах организации поведения. Мы исходим из того положения, что моторное поведение дискретно – оно представлено некоторым репертуаром поведенческих актов, и каждый такой акт продуцируется определенным паттерн-генерирующим ансамблем нейронов [3, 4, 5].

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

Слуховые органы комаров - Джонстоновы органы (ДО) — считаются наиболее высокочувствительными и сложными по устройству среди насекомых. Один из двух парных ДО самца комаров содержит порядка 15 тысяч слуховых нейронов. По всей вероятности, впечатляющие возможности слуха комаров были отточены в ходе полового отбора, поскольку именно слух играет у них ключевую роль во взаимодействии самцов и самок и определяет выбор партнера в момент встречи. Наши предыдущие исследования поведения комаров показали, что комары способны 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 [6, 7, 8, 9]. Особенно значительный прогресс в исследовании эпигенетического контроля текущей активности нервных клеток был сделан после исследований роли микроРНК (miRNAs), которые представляют собой короткие цепочки длиной в 20-23 нуклеотида, которые работают в основном, как негативные регуляторы экспрессии генов [10, 11].

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.

Обучение. Среди множества парадигм обучения на моллюсках одной из особенно эффективных является обучение с одного сочетания стимулов, отработанная György Kemenes на прудовике *Lymanea stagnalis* [12]. Классическая схема обусловливания при однократном сочетании амилацетата, нейтрального химического условного стимула (CS) и сахарозы, безусловного пищевого стимула (US), приводит к формированию у большого прудовика *Lymanea stagnalis* памяти, хранящейся более недели.

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 [15].

В экспериментах на сенсорной системе комаров применялся разработанный нами уникальный метод акустической стимуляции с положительной обратной связью, который позволяет зарегистрировать ответы отдельных сенсорных нейронов [13, 14].

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 [15]

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.

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 пульмонат – 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 diantaeus* 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.

Известно, что эффективность обучения зависит от уровня мотивации животного. Ранее нами было показано, состояние голода-насыщения и коррелирующий с ним уровень концентрации глюкозы в гемолимфе улитки отражается в активности системы серотонинергических нейронов [16, 17]. В 2018 году впервые получены свидетельства взаимодействия инсулина и серотонина в уменьшении ингибирующего действия прошлого опыта на способность формировать пищевую аверсию у улитки. В работе [18], выполненной по совместному проекту ИБР РАН и Department of Biology (Waseda University, Tokyo, Japan), было показано, что для эффективного формирования аверсии на пищу критично снижение концентрации серотонина, происходящее в начальный период голодания. В то время как введение серотонина, - так же как и длительный голод, сопровождающийся спонтанным повышением концентрации серотонина, - снижает способность к выработке аверсии. Инъекция инсулина в итоговой концентрации в гемолимфе 100 нМ таким животным восстанавливает способность к формированию аверзивных реакций на пищевой стимул (рисунок 3.1). Выявленное взаимодействие инсулин-продуцирующей и серотонинергической систем нейронов требует дальнейшего исследования.

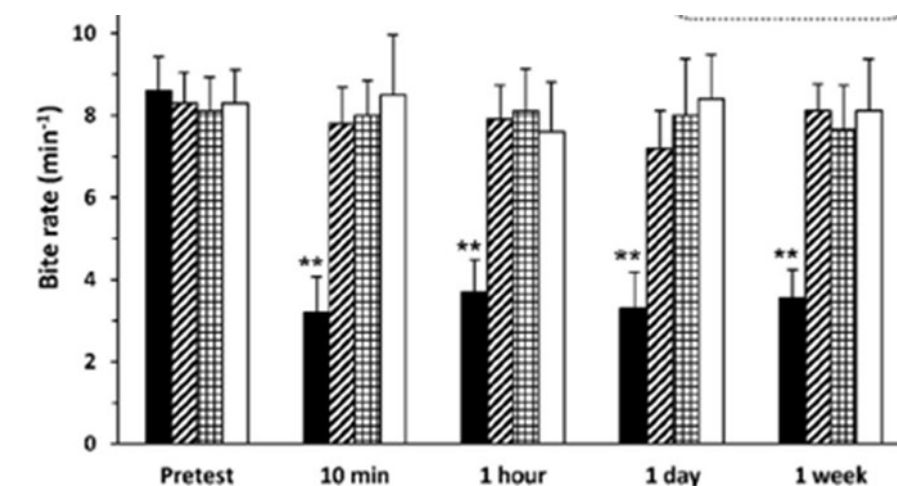


Рисунок 3.1 Инсулин (темные столбики) восстанавливает способность формировать пищевую аверсию у улиток с высоким содержанием серотонина. Эффект сохраняется до недели.

В 2018 году продолжались исследования нейронной организации слуховых органов комаров - Джонстоновых органов (ДО) и роли звуковой сигнализации в организации поведения этих животных [19]. Впервые экспериментально показано репеллентное действие тональных акустических сигналов на самцах комаров сем. Culicidae, акустические сенсорные клетки которых обладают оригинальными механизмами сложного анализа звукового сигнала [14].

Ненейрональная холинергическая система в регуляции активности амниона.

Исследовали механизмы холинергической регуляции в неиннервированном амнионе куриного эмбриона. Проведена фармакологическая идентификация холинергических рецепторов амниона. Показано, что сократительная активность амниона, вызванная холинергическими агонистами, опосредуется М3-холинорецепторами. Для специфических М-антагонистов порядок холинолитической активности ($-\log IC_{50}$) в отношении реакции на карбахол (КБХ) составил: 4-DAMP (М3) – 8.29 > тропикамид (М4) – 6.97 > пирензепин (М1) – 5.85 > метоктрамин (М2) – 5.63.

Нифедипин (0.1–1 мкМ), блокатор потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов L-типа, блокирует спонтанные и вызванные КБХ ритмические сокращения амниона, а также тоническую реакцию на гиперкалиевый раствор. Тоническая реакция на КБХ в норме и на фоне калиевой контрактуры полностью нифедипином не устраняется. Тапсигаргин (2 мкМ, 20 мин), ингибитор эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз и активного захвата кальция, снижает тоническую реакцию на КБХ на 40%. Высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных кальциевых депо в амнионе эффективно блокируется U73122 (5 мкМ), ингибитором

фосфолипазы C. Следовательно, в опосредовании KBX-вызванных сокращений амниона куриного эмбриона участвует система высвобождения кальция через IP3-чувствительные рецепторы саркоплазматического ретикулума. Кроме того, рианодин (10 мкМ), блокатор рианодиновых рецепторов, снижает тоническую реакцию амниона на KBX до 36% от контроля. Таким образом, KBX вызывает сократительные реакции в амнионе куриного эмбриона, опосредуемые M3-холинорецепторами и ионами Ca^{2+} , входящими через потенциалуправляемые каналы L-типа и мобилизуемыми из внутриклеточных запасов через IP3 и рианодиновые рецепторы.

Исследовали возможное включение кальциевых каналов T-типа в реализацию сократительных реакций амниона. Блокаторы T-каналов мибеградил и NNC 55-0396 вызывали дозозависимое торможение сократительной активности амниона, вызванной KBX, превышая по эффективности действие нифедипина. Нифедипин (0,1-1 мкМ) и NCC 55-0396 (0,1-5 мкМ) взаимно усиливали реакции друг друга: нифедипин, введенный на фоне действия NCC55-0396, потенцировал вызванное NCC 55-0396 торможение и наоборот [20].

Функциональное значение изменения уровня экспрессии нейронспецифических генов моллюсков

В 2018 году было продолжено исследование ранее найденного нами гена, кодирующего предшественник (preHelixSFamid) - одного из представителей большого семейства педальные пептиды/оркокинины. Мы исследовали уровень экспрессии preHelixSFamida у ювенильных и взрослых легочных моллюсков *Helix lucorum* L. в двух функциональных состояниях – сытое/голодное животное. Ген экспрессируется в группе серотонинергических клеток педального ганглия *Helix lucorum*, вовлеченных в модуляцию работы нейросети. Последовательность preHelixSFamid гомологична последовательности таких пептидов, как LymnaDFamide и педального пептида тритонии. Препропротеин preHelixSFamid состоит из гидрофобного лидера в N-концевой части и десяти предположительно амидируемых пептидов (рисунок 3.2). *In situ* гибридизация показала селективную экспрессию гена preHelixSFamid в отдельных идентифицированных нейронах педального, церебрального и плеврального ганглия. Эта экспрессия коррелирует с проявлением пищевого поведения.

По-видимому, пептиды preHelixSFamid участвуют в организации пищевого поведения виноградной улитки.

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

На первом этапе мы картировали транскрипцию изучаемого гена у взрослых животных при отсутствии, каких-либо воздействий. На втором этапе исследований мы попытались установить закономерность изменений в паттерне распределения в нервной системе экспрессии изучаемого гена, сопоставляя результаты гибридизации *in situ* нервной системы животных, находящихся в разном функциональном состоянии. Были поставлены эксперименты по исследованию зависимости уровня экспрессии гена *preHelixSFamid* от состояния насыщения животного. Для этого две группы животных (по 15 улиток) содержали в течение 12-14 дней в активном состоянии. При этом одна группа пищи не получала, а другая получала *ad libitum*. На препаратах ЦНС голодных улиток после проведения гибридизации *in situ* выявляется на 20-40% больше *preHelixSFamid*-экспрессирующих нейронов в плевральных ганглиях и в процеребруме.

Экспрессия данного гена в нервной системе начинается рано. Самая ранняя стадия, на которой в наших условиях устойчиво выявлялись клетки, маркированные зондом на мРНК *preHelixSFamid*, соответствует 11-12-ому дням эмбриогенеза, или переходу от позднего велигера к великонхе.

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, метациеребруме и в буккальном ганглиях. Наивысший уровень экспрессии наблюдается в педальном ганглии.

Результаты исследования требуют уточнения как на уровне полной структуры найденного гена *preHelixSFamid*, так и в отношении количественных параметров уровня экспрессии гена в структурах нервной системы улитки. Материалы готовятся к публикации.

В 2018 году продолжалась 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. Материалы этой серии экспериментов готовятся к публикации.

В 2018 году был завершен этап совместной работы по анализу молекулярных процессов, лежащих в основе долговременной памяти при одноразовом сочетании. Эта работа проводится вместе с коллегами из Университета Сасекса (Англия), на разработанной в лаборатории György Kemenes модели обучения прудовика [12]. В этом проекте использовался опыт нетравматического выделения живых нейронов, разработанный в нашем коллективе [16]. Для доказательства участия микроРНК Lym-miR-137 на одном из этапов формирования памяти проводился анализ РНК в изолированных идентифицированных нейронах церебрального ганглия, модулирующих активность центрального генератора паттерна (ЦГП) движений глотки. Клетки CGCs были идентифицированы и индивидуально выделены из ЦНС *Lymnaea*. Общая РНК, выделенная из CGCs (n = 10) с использованием кита Absolutely RNA miRNA (Agilent Technologies), была разделена пополам для анализа экспрессии Lym-miR-137 и Lym-CREB2 мРНК.

Работа [21] была построена на предположении, что устранение ингибирующих эффектов микроРНК играет важную роль в процессе запоминания. Чтобы проверить эту гипотезу, сначала были созданы библиотеки кДНК некодирующей РНК (snRNA) из ЦНС *Lymnaea stagnalis*, подвергнутых обучению. Секвенирование этих библиотек, позволило определить пул miRNAs, регулируемых при обучении. Из числа этих miRNAs, остановились на Lym-miR-137, проявляющую идеальную комплементарность к мишени в последовательности в 3'UTR мРНК для CREB2, который, как хорошо известно, является репрессором памяти. Было обнаружено, что LymmiR-137 был временно повышен через 1 ч после однократного сочетания стимулов, предшествующего снижению мРНК Lym-CREB2. Кроме того, было обнаружили, что Lym-miR-137 коэкспрессируется с Lym-CREB2. Эти эксперименты позволили сформулировать следующую схему процессов при запоминании сигнала пищевого предъявления у улитки (рисунок 3.3).

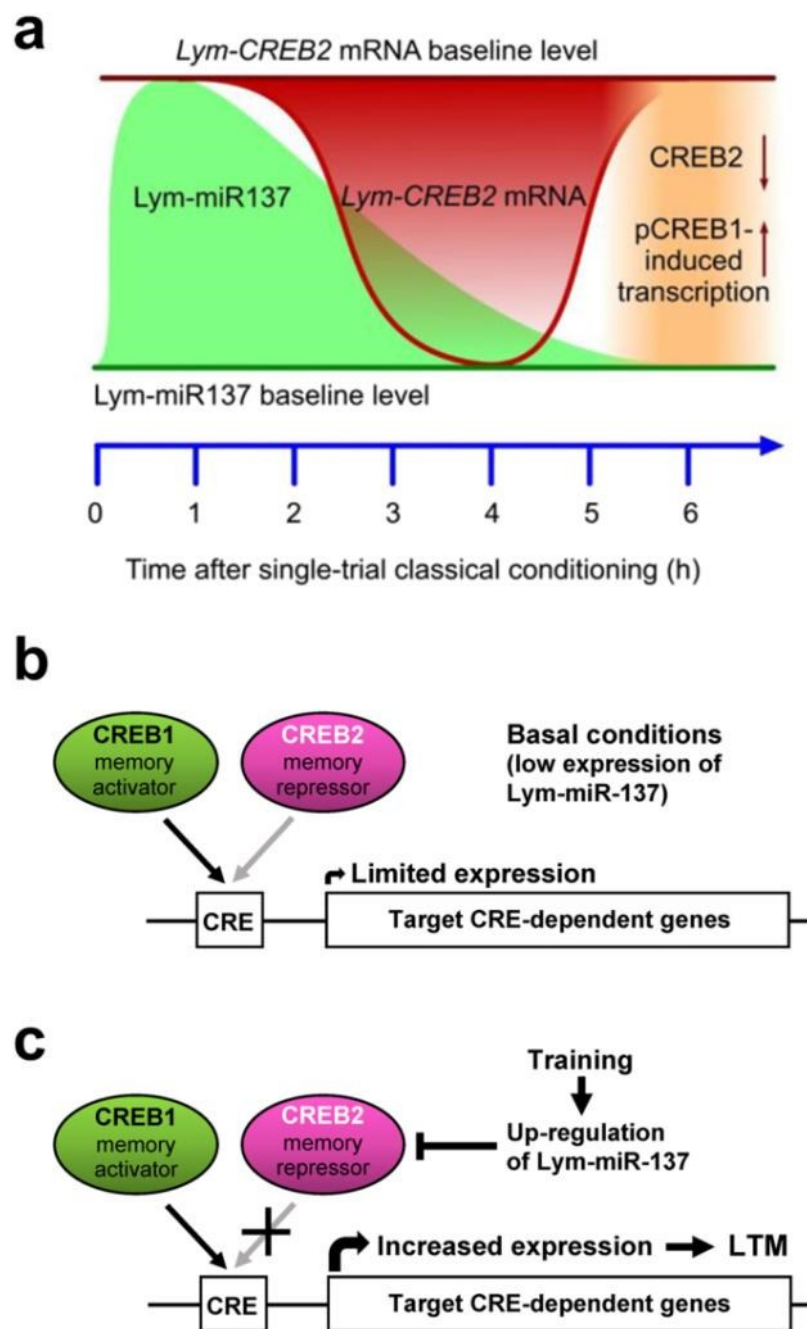


Рисунок 3.3 Схематическая модель роли *Lym-miR-137* в регуляции CREB-зависимого образования LTM. (a) Схема предполагаемых временных взаимосвязей между индуцированными обучением изменениями уровней мРНК *Lym-miR-137* и *Lym-CREB2* и транскрипцией гена, индуцированной pCREB1. Уровни *Lym-miR-137* измеряли через 1 ч и 6 ч после тренировки, уровни мРНК *Lym-CREB2* измеряли через 4 ч и 6 ч после тренировки, измеряли уровни pCREB1 и устанавливали транскрипционную зависимость через 6 ч после тренировки. (b) В базовых условиях CREB1 и CREB2 конкурируют за связывание с элементами ответа cAMP (CRE). Следовательно, экспрессия CRE-зависимых генов остается ограниченной. (c) Однократное сочетание стимулов увеличивает экспрессию *Lym-miR-137*, что приводит к подавлению CREB2. Эффект подавления CREB2 уменьшается, и CREB1 активирует экспрессию целевых CRE-зависимых генов, необходимых для образования долговременной памяти.

Таким образом, настоящие данные указывают на важную роль механизмов, контролируемых соотношением CREB1/CREB2 при формировании памяти, основанных на некодирующих РНК (sncRNA). MiR-137 имеет очень большое значение, поскольку участвует в регуляции нейрального развития и неопластических трансформациях [22], а также формировании памяти у млекопитающих [23, 24, 25].

В 2018 году были продолжены исследования, посвященные отбору модельных объектов, удобных для экспериментального анализа клеточных механизмов перестройки поведения и сравнительных онтогенетических исследований. Получены важные результаты по эволюционной истории морских беспозвоночных животных. Выявлены общие закономерности, объединяющие онтогенетическое развитие и биологическое разнообразие организмов [26, 27, 28].

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, поскольку основные 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 показывать 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 – с одной стороны, и той формой пластичности, которая относится к многочисленным формам обучения и переключения поведения – с другой стороны. В этом направлении важны получаемые в настоящий момент сведения о нейрохимических коррелятах возрастных этапов формирования комплексов программ поведения и соответствующих мотивационных состояний у зрелых животных. Представляется, что эти исследования также следует развивать в направлении выявления более глубоких молекулярных механизмов регуляции таких эпигенетических процессов.

3.5 Список использованных источников

1 Sakharov D. A. The Biochemical Model of the Synapse in Turpaev's Studies // *Neurochemical Journal*. -2018. -Vol. 12. No. 4. P. 285–287. Сахаров Д. А.. Биохимическая модель синапса в исследованиях Т.М. Турпаева // *Нейрохимия*. -2018. -Т. 35. № 4. С. 277-280.

2 Dyakonova V. The Puzzle of Behavioral Choice or How Organisms Channel Their Evolution: a Review of Rui Diogo's Evolution Driven by Organismal Behavior: A Unifying View of Life, Function, Form, Mismatches, and Trends // *Evolutionary Psychological Science*. - 2018. -Vol. 4. Is. 1. P. 67–70. DOI: 10.1007/s40806-017-0113-9.

3 Katz P. S. Neural mechanisms underlying the evolvability of behavior// *Phil. Trans. R. Soc. B* -2011. -Vol. 366, 2086-2099. doi: 10.1098/rstb.2010.0336

4 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.

5 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.

6 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.

7 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.

8 Norouzitallab P., Baruahb K., Vanrompay D., Bossier P. Can epigenetics translate environmental cues into phenotypes? //*Science of the Total Environment*. -2019. -Vol. 647. P.

9 Sweatt J. D. The epigenetic basis of individuality// Current Opinion in Behavioral Sciences. -2019, -Vol. 25. P. 51–57

10 McNeill, E. & Van Vactor, D. MicroRNAs shape the neuronal landscape //Neuron, - 2012. -Vol.75. P. 363–379.

11 Busto, G. U., Guven-Ozkan, T., Fulga, T. A., Van Vactor, D. & Davis, R. L. microRNAs that promote or inhibit memory formation in *Drosophila melanogaster* // Genetics, -2015. -Vol. 200, P. 569–580.

12 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.

13 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.

14 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

15 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.

16 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.

17 Dyakonova V.E., Hernádi L., Ito E., Dyakonova T.L., Zakharov I.S, Sakharov D.A. The activity of isolated snail neurons controlling locomotion is affected by glucose // Biophysics. - 2015. -Vol. 11. P. 55–60.

18 Aonuma H., Totani Y., Kaneda M., Nakamura R., Watanabe T., Hatakeyama D., Dyakonova V.E., Lukowiak K., Ito E. Effects of 5-HT and insulin on learning and memory formation in food-deprived snails // Neurobiology of Learning and Memory. -2018. -Vol. 148. P. 20-29. DOI:10.1016/j.nlm.2017.12.010.

19 Lapshin D.N., Vorontsov D.D. Low-Frequency Sounds Repel Male Mosquitoes *Aedes diantaeus* N.D.K. (Diptera, Culicidae) // Entomological Review. -2018. -Vol. 98. N 3. P. 266-271. DOI: 10.1134/S0013873818030028). Лапшин Д.Н., Воронцов Д.Д. Низкочастотные звуки отпугивают самцов комаров *Aedes Diantaeus* N. D. K. (Diptera, Culicidae) // Энтомологическое обозрение. 2018. Т. 97. № 2. С. 194-202.

20 Бойко О.В. Ненейрональная холинергическая система и внутриклеточная передача сигнала в амнионе куриного эмбриона//Материалы конференции с международным участием «Физиология и биохимия сигнальных систем», посвященной 100-летию со дня рождения академика Т.М. Турпаева, Москва, 23-25 октября 2018 г. М.: Перо, -2018. – С. 25 – 26.

21 Korneev S.A., Vavoulis D.V., Naskar S., Dyakonova V.E., Kemenes I., Kemenes G. A CREB2-targeting microRNA is required for long-term memory after single-trial learning // Scientific Reports. -2018. -Vol. 8. N. 1. P. 3950. DOI: 10.1038/s41598-018-22278-w.

22 Mahmoudi, E. & Cairns, M. J. MiR-137: an important player in neural development and neoplastic transformation. Mol Psychiatry, 2017. V. -22, P.- 44–55.

23 Huang, C. et al. Upregulation of miR-137 protects anesthesia-induced hippocampal neurodegeneration. Int J Clin Exp Pathol, -2014. -Vol. 7, P. 5000–5007.

24 Siegert, S. et al. The schizophrenia risk gene product miR-137 alters presynaptic plasticity. Nat Neurosci, -2015. -Vol. - 18, P. -1008–1016.

25 Karpinski, B. A., Morle, G. D., Huggenvik, J., Uhler, M. D. & Leiden, J. M. Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. Proc Natl Acad Sci USA, -1992. -Vol.- 89, P. - 4820–4824.

26 Korshunova T., Lundin K., Malmberg K., Picton B., Martynov A. First true brackish-water nudibranch mollusc provides new insights for phylogeny and biogeography and reveals paedomorphosis-driven evolution // PLoS ONE. 13(3), e0192177. DOI: 10.1371/journal.pone.0192177.

27 Korshunova T., Fletcher K., Lundin K., Picton B., Martynov A. The genus Zelentia is an amphi-boreal taxon expanded to include three new species from the North Pacific and Atlantic oceans (Gastropoda: Nudibranchia: Trinchesiidae) // Zootaxa. -2018. -Vol. 4482(2). P. 297-321. DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4482.2.4>.

28 Korshunova T., Fujita T., Martynov A. The First Record of Trinchesia lenkae Martynov, 2002 from Japan: Morphological and Molecular Comparison with the Material from the Type Locality in Russia (Nudibranchia: Trinchesiidae) // Venus. -2018. -Vol. 76(1-4). P. 19-28. DOI: http://doi.org/10.18941/venus.76.1-4_19.

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

4.1 Введение

В работах, охватывающих широкий круг представителей беспозвоночных животных различной филогенетической принадлежности, было показано, что уже на самых ранних стадиях развития личинки животных, имеющих в своем развитии бифазный жизненный цикл, обладают достаточно развитой нервной системой [1, 2]. Именно поэтому закономерности и особенности развития нервной системы личинок широко исследуются биологами различных специальностей. Одной из перспективных моделей в этой области, позволяющей выявить фундаментальные механизмы нейрогенеза и аксональной навигации, являются моллюски [3, 4]. При этом, самые ранние стадии развития, когда происходит дифференцировка ранних нейронов, является ключевым для дальнейшего паттерна формирования дефинитивной нервной системы [5, 6, 7]. Простота строения личинок и возможность регистрации у них скоординированного поведения делает их также удобными объектами для изучения вовлечения нервной системы в контроль поведения [1].

Признанная консервативность веществ, участвующих у высших животных в передаче нервных импульсов (нейромедиаторов), позволяет использовать маркеры этих веществ, наряду с молекулярно-генетическими данными, для установления анцестральной роли определенных медиаторов, их базовых функций, проявляющихся у наиболее примитивных животных или на самых ранних стадиях развития, когда ещё нет сформированной нервной системы [8].

4.2 Материалы и методы

Работы проводили на развивающихся личинках двустворчатых моллюсков: *Crassostrea gigas* и *Dreissena polymorpha*, а также на развивающихся эмбрионах лабораторной культуры брюхоного моллюска *Lymnaea stagnalis*, пресноводной костистой рыбы дано и взрослых особях *Trichoplax adhaerens* (Placozoa). Представители губок группы Spongillida были собраны в природе.

Для визуализации нервных, мышечных и ресничных структур использовали современные методы иммуноцитохимического и гистохимического маркирования в сочетании с лазерной сканирующей конфокальной микроскопией и последующим 3D моделированием. Метод иммунохимического маркирования нейрональных элементов с использованием специфических маркеров позволяет выявить нервные клетки в момент

начала синтеза в них нейромедиатора. Антитела против ацетилированного тубулина маркируют нейротубулы в отростках нейронов и цитоскелет ресничек, позволяя выявить общие контуры нервной системы и ресничные структуры. Двойное иммуномечение, сочетающее окраску нейрональных элементов и элементов цитоскелета, позволяет определить взаимное расположение и морфологическую взаимосвязь этих структур. Совместное выявление ресничных структур, мышечных элементов, филаментов и других клеточных компонентов, дает информацию о природе самых ранних дифференцировавшихся клеток. Детальное маркирование формирования последующих нервных элементов и структур позволяет установить роль ранних периферических нейронов в инициации нейрогенеза и навигации отростков в процессе формирования нервной системы.

Для изучения функций ранних нейромедиаторов, а также специфических генов в развитии использовался метод фармакологического модулирования, молекулярно-генетические подходы блокирования экспрессии генов, а также мутантные линейные животные. Вызванные отклонения в развитии и поведении эмбрионов контролировались визуально и документировались при помощи фотосъемки и последующего морфологического анализа. Препараты после иммунохимического маркирования изучались с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Keyence BZ-9000 microscope (Nikon, Minoto, Tokyo, Japan) и конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica, Wetzlar, Germany).

4.3 Результаты и обсуждение

Для подавляющего большинства водных беспозвоночных характерен бифазный цикл развития, когда взрослой стадии предшествует свободноплавающая или инкапсулированная личинка, которая в дальнейшем проходит метаморфоз и превращается во взрослое животное. Исследование клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе регуляции процессов онтогенеза, эволюции онтогенеза, является одной из фундаментальных задач, лежащих на стыке зоологии, нейробиологии и биологии развития. В процессе выполнения задач, стоящих в рамках выполнения госзадания, были получены нижеописанные результаты, лежащие в рамках заявленных планов.

Детально изучен клеточный состав и морфология нервных элементов моноаминергической (5-HT), пептидергической (FMRFамид) и холинергической (ACh) систем в развитии двустворчатого моллюска – тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas*. Впервые показано, что антитела к везикулярному транспортеру ацетилхолина (VAChT) маркируют нервные клетки и их отростки у личинок беспозвоночных животных.

Выявлена последовательность дифференцировки и взаимное расположение самых ранних нервных элементов. Прослежено формирование основных центральных ганглиев нервной системы. Показано, что именно ход отростков ранних нейронов, а не расположение их тел, является основным маркером для дифференцирующихся отделов дефинитивной нервной системы [9].

Определен механизм ключевой адаптации, которая позволяет пресноводному двустворчатому моллюску дрейсене (*Dreissena*) агрессивно распространяться в пресных и солоноватых водоемах, вытесняя эндемичные виды, меняя экологические сообщества и нанося вред водным сооружениям. Мы показали (совместно с сотрудниками Балатонского центра Экологических исследований Венгерской Академии Наук), что в отличие от всех других пресноводных двустворок, личинки дрейсен имеют развитую нервную систему уже на самых ранних этапах развития (рисунок 4.1).

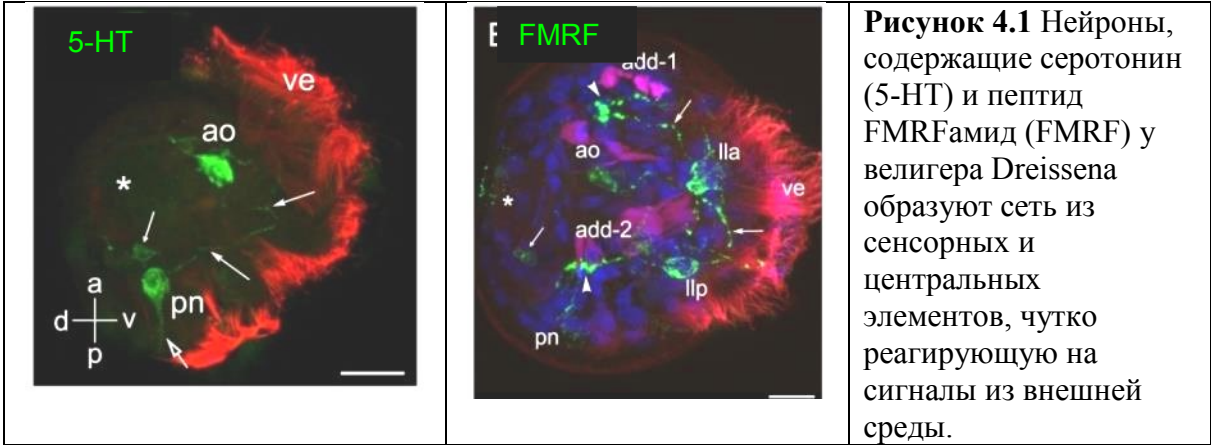


Рисунок 4.1 Нейроны, содержащие серотонин (5-HT) и пептид FMRFамида (FMRF) у велигера *Dreissena* образуют сеть из сенсорных и центральных элементов, чутко реагирующую на сигналы из внешней среды.

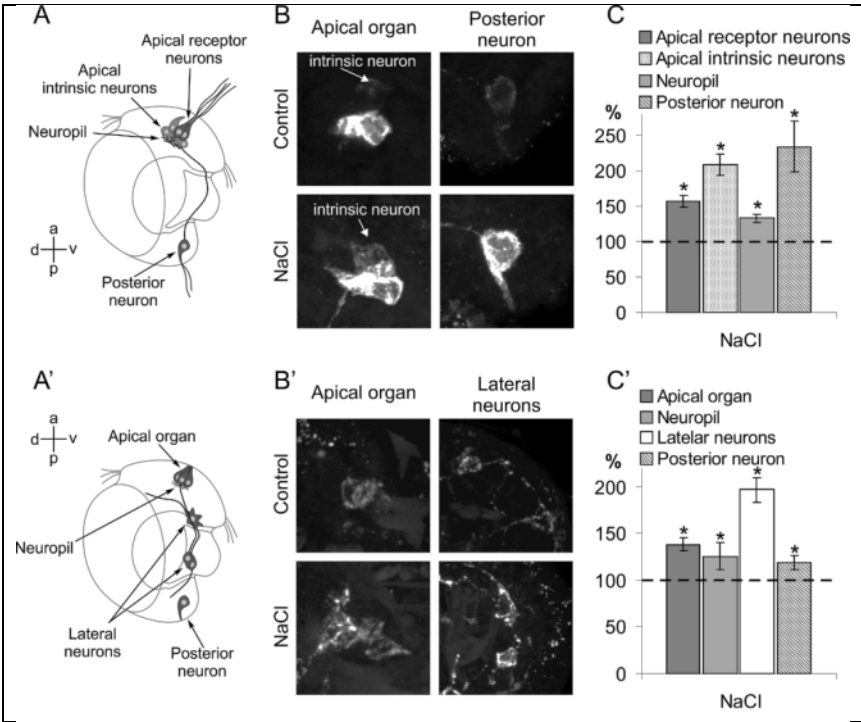


Рисунок 4.2 Повышение синтеза серотонина (A, B, C) и FMRFамида (A', B', C') в нейронах личинки при повышении солености (NaCl) приводит к ускорению плавания личинок и компенсаторным реакциям на изменение осмотичности, что позволяет им выжить и благополучно покинуть неблагоприятное место.

Личиночные нейроны, содержащие серотонин (5-HT) и пептид FMRFамид (FMRF), увеличивают синтез специфических медиаторов при неблагоприятных условиях среды (изменение солености) (рисунок 4.2), позволяя личинкам адаптироваться в широком диапазоне изменений и обеспечивая максимальное расселение вида [10]. Фундаментальные знания о генезе нервной системы личинок дрейсен позволят разработать новые экологические стратегии для остановки распространения этого опасного инвазивного вида-обрастателя.

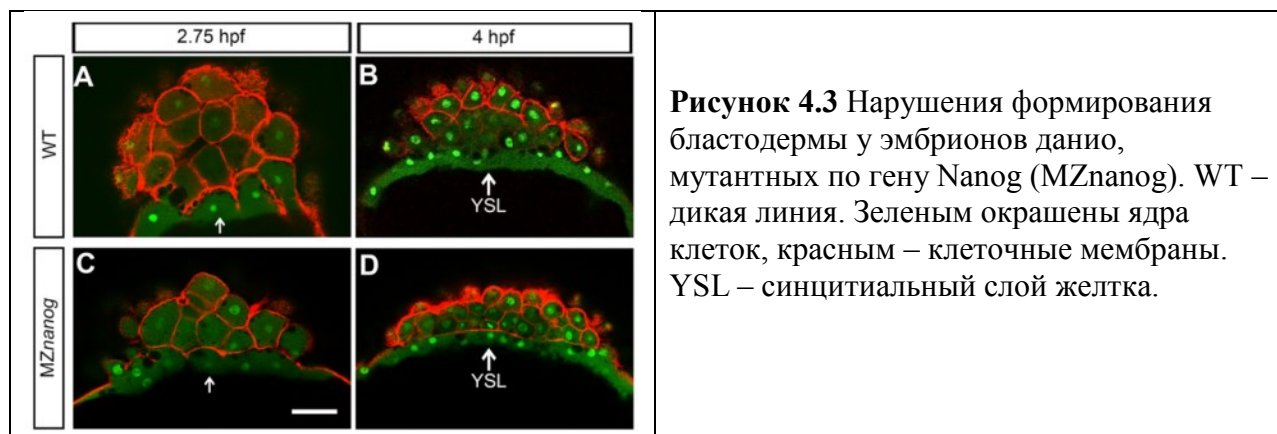
Показано, что паттерн активности буккального генератора – основной нейрональной сети, ответственной за сокращение буккальной мускулатуры, обеспечивающей работу радулы – зависит от комбинации задействованных специфических рецепторов 5-HT₁, 5-HT₆ и 5-HT₇ типов. На модели выхода из яйца пресноводного моллюска большого прудовика *Lymnaea stagnalis*, показано, что уровень серотонина модулируется именно в нейронах церебрального ганглия. При этом повышение синтеза серотонина несущественно сказывается на активности генератора, в то время как блокада синтеза приводит к значительному торможению буккального ритма. Таким образом, ставится под сомнение существующая гипотеза, что серотонин является ведущим медиатором в центральной регуляции буккального генератора. Высказывается предположение, что именно экспрессия рецепторов серотонина определенного типа и их баланс на конкретной стадии развития является ведущим для формирования финального паттерна нервной сети и результирующей активности буккальной мускулатуры [11].

Активность буккального аппарата моллюсков важна не только для поддержания существования вида, но и может принимать участие в формировании физико-химических и геологических составляющих нашей планеты. Среди морских водорослей, губок, моллюсков, кольчатых червей, ракообразных, морских ежей есть представители, сверлящие различные каменные породы (известковые и силикатные), а также другие твёрдые субстраты: раковины, скелеты кораллов и позвоночных животных. В палеонтологии такие отверстия используются в качестве индикаторов мелководных морских (и эстуарных) экосистем. В пресноводных экосистемах единственными источниками биогенной эрозии считались мелкие полихеты, сверлящие раковины моллюсков. Однако недавнее исследование донной экосистемы реки Каладан в Мьянме [12] показало, что в пресных водоёмах также возможна биогенная эрозия силикатных пород. Организмом, способным точить алевролитовые скалистые выходы, оказался двустворчатый моллюск *Lignopholas fluminalis*, близкий родственник морского моллюска-сверлильщика. Эрозийные процессы повышают биологическое разнообразие местообитаний, усложняя их трёхмерную организацию. На каменистых субстратах реки

Каладан, в частности, обнаружено сообщество беспозвоночных животных, активно использующих полости, остающиеся в породе в результате деятельности сверлильщика *L. fluminalis*. Среди них двусторонки двух других видов, укрывающиеся в этих полостях, брюхоногий моллюск, два вида полихет, и губка, обрастающая положительные и отрицательные поверхности породы. Таким образом, вторжение в пресные воды моллюска-камнеточца могло привести к образованию сообщества, сочетающего исходно эстуарные и пресноводные таксоны одновременно. Данная находка позволила предложить новую модель неотектонической эволюции нижнего течения рек Юго-Восточной Азии [12].

У древнейших представителей многоклеточных организмов – трихоплакса и губки – обнаружено наличие приспособительных механизмов, позволяющих им адаптироваться к условиям среды, даже не имея специально развитых сенсорных систем. В обоих случаях реализация механизмов осуществляется на уровне специфических внутриклеточных структур. Так, у трихоплакса обнаружены агаронитовые кристаллы внутри специфических клеток, что позволяет этому организму, лишенному нервной системы, правильно оценивать гравитацию [13]. У губок, относящихся к недавно выделенной группе Spongillida, хоаноциты обладают специфически устроенным кинетидным аппаратом, позволяющим им наиболее оптимальным образом организовывать работу ресничек, обеспечивающих питание и дыхание всей колонии [14].

Известно, что ген *Nanog* экспрессируется в эмбриональных стволовых клетках и является основным фактором плюрипотентности. Вместе с другими факторами: POU5F1 (Oct-4) и SOX2, *Nanog* обеспечивает статус эмбриональных стволовых клеток. На модели развития данио было показано, что без нормально функционирующего гена *Nanog* существенно нарушается процесс эпиболии, нарушается закладка осей тела, соответственно, не формируется нормальный зародыш, наблюдается массовая гибель клеток в конце гастрюляции [15]. У мутантов *MZnanog* проявляются три независимых нарушения: (1) организация микротрубочек в желтке, (2) деградация материнской мРНК, (3) актиновая структура синцитиального слоя. Все перечисленные процессы необходимы для нормальной эпиболии (рисунок 4.3). Гибель клеток у мутантов *MZnanog* была автономной. Оказалось также, что *Nanog* необходим для правильного пространственного распределения генов, определяющих вентральную сторону зародыша: *bmp2b*, *vox* и *vent*, а также нейронального фактора транскрипции *her3*. Таким образом, доказано, что именно материнские копии гена *Nanog* координируют несколько сетей регуляции генов, которые являются ключевыми в момент формирования эмбриона во время гастрюляции [15].



4.4 Заключение

В ходе анализа полученных результатов по проведению комплексного исследования роли нервной системы в процессах развития, участия медиаторов и генов плюрипотентности в реализации значимых адаптивных программ и формировании архитектоники зародыша, а также роли внутриклеточных структур, обеспечивающих адаптивные реакции у организмов без нервной системы, выявлены перспективные задачи для дальнейших исследований в рамках этой актуальной области современной биологии развития:

- продолжить исследование по определению консервативных клеточных и молекулярных механизмов, задействованных на самых ранних стадиях нейрогенеза, и обеспечивающих скоординированное развитие различных отделов центральной и периферической сенсорной системы зародыша, а также скоординированные реакции зародыша на внешние стимулы.
- установить роль внутриклеточных органелл, обеспечивающих скоординированный паттерн активности, лежащий в основе адаптивного поведения у многоклеточных животных, не имеющих нервной системы.

4.5 Список использованных источников

- 1 Voronezhskaya E.E., Croll R.P. Mollusca: Gastropoda. Invited chapter in "Structure and evolution of invertebrate nervous systems." Eds. Schmidt-Rhaesa, A., Harzsch, S. and Purschke, G. Oxford University Press. -2016. PP. 196-221
- 2 Croll R.P., Voronezhskaya E.E. Early elements in gastropod neurogenesis // Devel. Biol. - 1996. -Vol. 173. P. 344–347.
- 3 Nezlin L.P. The Golden Age of Comparative Morphology: Laser Scanning Microscopy and Neurogenesis in Trochophore Animals // Rus. J. Dev. Biol. -2010, -Vol. 41. №. 6. P. 381–390.

4 Croll R.P. Insights into early molluscan neuronal development through studies of transmitter phenotypes in embryonic pond snails // *Microsc. Res. Tech.* -2000. -Vol. 49. P. 570–578.

5 Voronezhskaya E.E., Ivashkin E.G. Pioneer neurons: a basis or limiting factor of Lophotrochozoa nervous system diversity? // *Russ. J. Dev. Biol.* -2010. Vol. 41. P. 337-346.

6 Ivashkin E., Voronezhskaya E. and Adameyko I. A paradigm shift in neurobiology: peripheral nerves deliver cellular material and control development // *Zoology.* -2014. –Vol. 117(5). P. 293-294

7 Незлин Л.П., Воронежская Е.Е.. Ранние периферические сенсорные нейроны в развитии трохофорных животных. Онтогенез. -2017. –Т. 48 № 2 с 149-164

8 Ivashkin E., Khabarova M.Yu., Melnikova V. et al. Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails // *Cell Reports* -2015. -Vol. 18. P. 1144-1158.

9 Yurchenko O.V., Skiteva O.I., Voronezhskaya E.E., Dyachuk V.A. Nervous system development in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia) // *Frontiers in Zoology.* -2018. -Vol. 15. Is. 1. N 10.

10 Battonyai I., Voronezhskaya E.E., Obukhova A., Horvath R., Nezlin L.P., Elekes K. Neuronal Development in the Larvae of the Invasive Biofouler *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia), with Special Attention to Sensory Elements and Swimming Behavior // *Biol Bull.* -2018 Jun; -Vol. 234(3):192-206.

11 Elekes K., Hiripi L., Balog G., Maasz G., Battonyai I.A., Khabarova M.Y., Horvath R., Voronezhskaya E.E. Serotonergic regulation of the buccal (feeding) rhythm of the pond snail, *lymnaea stagnalis*. An immunocytochemical, biochemical and pharmacological approach // *Acta Biologica Hungarica.* -2018. - Vol. 69. Is. 3. P. 225-243.

12 Bolotov I.N., Aksenova O.V., Bakken T., Glasby C.J., Gofarov M.Y., Kondakov A.V., Konopleva E.S., Lopes Lima M., Lyubas A.A., Wang, Y., Bychkov A.Y., Sokolova A.M., Tanmuangpak K., Tumpeesuwan S., Vikhrev I.V., Shyu J.B.H., Win T., Pokrovsky O.S. Discovery of a silicate rockboring organism and macrobioerosion in freshwater // *Nature Communications.* -2018. -Vol. 9(1). P. 2882.

13 Mayorova T.D., Smith C.L., Hammar K., Winters C.A., Pivovarova N.B., Aronova M.A., Leapman R.D., Reese T.S. Cells containing aragonite crystals mediate responses to gravity in *Trichoplax adhaerens* (Placozoa), an animal lacking neurons and synapses // *PLoS ONE.* -2018. - Vol.13. N 1. P. e0190905.

14 Pozdnyakov I.R., Sokolova A.M., Ereskovsky A.V., Karpov S.A. Kinetid structure in sponge choanocytes of Spongillida in the light of evolutionary relationships within Demospongiae // Zoological Journal of the Linnean Society. -2018. zlx109.

15 Veil M., Schaechtle M.A., Gao M., Kirner V.V., Buryanova L., Grethen R., Onichtchouk D. Maternal nanog is critical for the zebrafish embryo architecture and for cell viability during gastrulation // Development (Cambridge). -2018. -Vol. 45, dev155366.

РАЗДЕЛ 5 ИССЛЕДОВАНИЕ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА У БОЛЬНЫХ С ПРИОБРЕТЕННЫМИ И ВРОЖДЕННЫМИ ФОРМАМИ ТРОМБОТИЧЕСКИХ МИКРОАНГИОПАТИЙ

5.1 Введение

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура – орфанное заболевание, которое характеризуется быстрым течением и высокой летальностью в отсутствие необходимого лечения. Впервые тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП) была описана в 1924 году Мошковицем [1]. Он наблюдал 16-летнюю больную девушку, у которой заболевание сопровождалось сильной лихорадкой, острым внутрисосудистым гемолизом и комой, и в итоге привело к смерти спустя 2 недели с момента появления симптомов. Вскрытие выявило множественные гиалиновые тромбы в терминальных артериолах и капиллярах. В 1982 году J. Моакс обнаружил в сыворотке крови пациентов с наследственной формой ТТП необычно крупные мультимеры фактора Виллебранда [2]. Он пришёл к выводу, что болезнь может быть связана с отсутствием у больных протеазы, расщепляющей фактор Виллебранда. Последующие исследования показали, что в основе развития ТТП действительно лежит глубокий дефицит (<10%) металлопротеиназы ADAMTS-13 [3-7], который приводит к нарушению нормального расщепления фактора Виллебранда и образованию тромбоцитарных тромбов в мелких сосудах различных органов.

Выделяют наследственную и приобретенную форму ТТП. Приобретенная форма ТТП подразделяется на иммунную и вторичную (не иммунную). Иммунная форма составляет 50-55% случаев ТТП и вызвана ингибированием ADAMTS-13 аутоантителами, преимущественно класса G [7]. Вторичная форма ТТП может быть связана с онкологическими заболеваниями, трансплантацией органов и тканей, приемом лекарственных препаратов. Наследственная форма болезни или синдром Апшо-Шульмана (Upshaw-Schulman) составляет около 2% всех случаев заболевания, наследуется рецессивно и обусловлена мутациями в гене ADAMTS-13 [8].

Для благоприятного исхода крайне важное значение имеет раннее начало лечения, поскольку в отсутствие адекватной терапии летальность может достигать 90%. Основным подходом лечения ТТП на сегодняшний день остаётся плазмообмен. Использование данного подхода снизило смертность при ТТП до 10-20% [9]. Задачей проведенных исследований была разработка метода дифференциальной диагностики ТТП и оценка его эффективности при обследовании большой группы больных, подозреваемых на наличие этого заболевания. Выявление больных ТТП проводилось на начальной стадии, при

которой уже есть отдельные признаки этой болезни (тромбоцитопения и петехии), но не ещё произошли тяжелые необратимые повреждения мозга, почек и других органов. Дифференциальная диагностика необходима для того, чтобы отличить ТТП от других форм тромботических микроангиопатий и обосновать использование плазмаобмена для лечения больного. Второй задачей исследования было разработка протокола, позволяющего оценить эффективность проведение плазмаобмена у больных с наследственной формой ТТП. Эта процедура проводится у таких больных пожизненно, поэтому важно подобрать условия, минимизирующие её отрицательные побочные эффекты. Для этого важно знать, как быстро у конкретного больного происходят инактивация ADAMTS-13, поступившей с донорской плазмой, и накопление тромбогенных сверхкрупных мультимеров фактора Виллебранда.

5.2 Материалы и методы

Подбор больных.

Работа проводилась совместно с Гематологическим научным центром, Морозовской больницей и другими медицинскими учреждениями Москвы и других городов России, имеющими гематологические отделения. Для исследований отбирались больные с наличием таких клинических признаков, как тромбоцитопения, микроангиопатическая гемолитическая анемия (МАГА), неврологические нарушения, геморрагические кожные высыпания, нефропатия. Диагноз ТТП устанавливался на основании результатов анализа активности ADAMTS13 в том случае, если активность была ниже 10%.

Определение активности металлопротеиназы ADAMTS-13 в плазме крови.

В настоящее время в гематологических клиниках за рубежом определение активности ADAMTS-13 в плазме больных проводится преимущественно методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов. Его основным недостатком является большие трудозатраты и высокая дороговизна самих наборов. По этой причине применение данного метода для широкомасштабной диагностики ТТП среди больных с признаками тромботических микроангиопатий практически невозможно. В ИБР РАН нами применен подход, основанный на прямой регистрации активности ADAMTS-13 с использованием эффекта FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). В качестве субстрата использовали флуоресцентно меченый пептид FRET-S- VWF73 (Peptide Institute Inc, Japan), в состав которого введена флуоресцентная метка и тушитель. Регистрацию флуоресценции проводили с помощью планшетного спектрофлуориметра.

Анализ мультимерного состава фактора Виллебранда.

Для определения мультимерного состава фактора Виллебранда образец плазмы больного и образцы плазмы здоровых доноров подвергали электрофорезу с последующим анализом методом Western-гибридизации. Электрофорез проводился в 1,5% агарозном геле, в стандартном буфере TBE (трис/борат/ЭДТА), содержащем 0,1% додецилсульфата натрия (ДДС-Na). Для нанесения на гель образцы разводили следующим образом: 15 мкл плазмы крови смешивали с 15 мкл буфера для нанесения (1050 мкл TBE с бромфеноловым синим, 150 мкл глицерина, 300 мкл 10% ДДС-Na) и наносили полученные 30 мкл смеси в лунку геля. После проведения электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Инкубацию с первыми антителами (DACO Corporation Rabbit/ Anti-Human Von Willebrand Factor), взятыми в разведении 1:500, проводили в течение 1 часа. В качестве вторых антител использовали козы антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Bio-Rad Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate). Проявку мембраны проводили с диаминобензидином и перекисью водорода в стандартных условиях.

5.3 Результаты и обсуждение

Эпидемиологические исследования

Исследования проводили на препаратах плазмы больных, которую доставляли в замороженном виде из медицинских учреждений Москвы и других городов Российской Федерации. Усовершенствованный метод определения активности ADAMTS-13 в формате 96-луночного планшета позволил в относительно короткое время провести обследование больных в возрасте от нескольких месяцев до 60-70 лет с признаками тромбоцитопении, гемолитической анемии (МАГА), неврологических нарушений, геморрагических кожных высыпаний, нефропатии на предмет выявления у них тромботической тромбоцитопенической пурпуры (болезни Мошковица). Среди 1365 обследованных больных ТТП выявлена у 30 человек, что составило 2,2%. Среди этих больных у 5 человек (три мальчика в возрасте 5, 12 и 13 лет и двое мужчин 27 и 31 года) показано наличие врожденной формы ТТП (синдром Апшо-Шульмана), у остальных 25 человека выявлена приобретенная форма, что подтверждает наличие антител против ADAMTS-13. Среди больных с приобретенной формой ТТП преобладали женщины (18 больных в возрасте от 14 до 51 г. и две девочки 2 и 3 лет). Приобретенная ТТП выявлена у 7 мужчин от 23 до 60 лет. Отсутствие среди выявленных больных наследственной формой ТТП женщин может свидетельствовать о том, что девочки, страдающие этим заболеванием, погибают в юном возрасте до проведения обследования. Приобретенная

форма аутоиммунной природы чаще проявляется у женщин, что может быть связано с предрасположенностью к развитию у них ТТП во время беременности.

Оценка эффективности плазмаобмена у больных с наследственной формой ТТП (синдром Апишо-Шульмана).

Эндотелиальные клетки экспонируют фактор Виллебранда на своей поверхности и постоянно секретируют его в плазму и межклеточное пространство, что необходимо для свёртывания крови в микрососудах во время их повреждения фВБ в эндотелиальных клетках перед экспонированием и секрецией накапливается в тельцах Вейбеля-Паладе. Другим источником фВБ являются тромбоциты, несущие этот гликопротеин в альфа-гранулах. Дефицит фВБ вызывает длительные носовые кровотечения, кровотечения при вырывании зубов и при других обстоятельствах. фВБ секретируется в виде крупных мультимеров. Избыток фВБ при ТТП связан с тем, что не происходит расщепления тромбогенных высокомолекулярных форм этого гликопротеина. Их накопление приводит к образованию гиалиновых микротромбов в артериолах и капиллярах и микротромбозам. Лечение наследственной формы ТТП проводится путем периодического замещения (плазмафереза) части объема собственной плазмы (500-600 мл) на плазму донора. В настоящей работе было проведено измерение активности ADAMTS-13 у таких больных на разных стадиях до и после замещения плазмы. Одновременно определяли количество тромбоцитов. Как показано на рисунке 5.1 А, у больного (мужчина 29 лет) перед плазмаферезом количество тромбоцитов в миллилитре составляло немногим выше $20 \cdot 10^9$. Низкое содержание тромбоцитов обусловлено их потреблением на образование микротромбов. Сразу после плазмаобмена число тромбоцитов возрастало примерно в полтора раза, а через 3 дня поднималось до $160-170 \cdot 10^9$ и постепенно снижалось, после чего проводилась следующая процедура плазмаобмена. Активность ADAMTS-13 возрастала до 10-12% от нормального уровня сразу после плазмаобмена и быстро падала до уровня 2% и ниже (рисунок 5.1 Б). Тем не менее, несмотря на такое падение, происходила относительная стабилизация количества тромбоцитов.

Необходимо было оценить, как подобное лечение повлияет на показатели обмена фВБ. Мультимерный состав фВБ оценивался в начале лечения, то есть сразу после постановки диагноза, когда больному было 19 лет и через 10 лет, в течение которых больному проводили процедуры плазмаобмена. Как видно из этих данных, до лечения у больного был повышен уровень всех мультимеров фВБ по сравнению с нормой (рисунок 5.2 А) [10]. Длительное лечение с соблюдением графика плазмаобменов привело к стабилизации мультимерного состава фВБ на нормальном уровне (рисунок 5.2 Б). Пациент ведет нормальный образ жизни. Следует отметить, что в отдельные моменты

этот график плазмаобмена по вине пациента нарушался, что приводило к острой почечной недостаточности. Таким образом, строгое соблюдение индивидуально спланированной заместительной терапии, позволяет длительное время избегать развития тяжелых осложнений, приводящих пациентов к инвалидности.

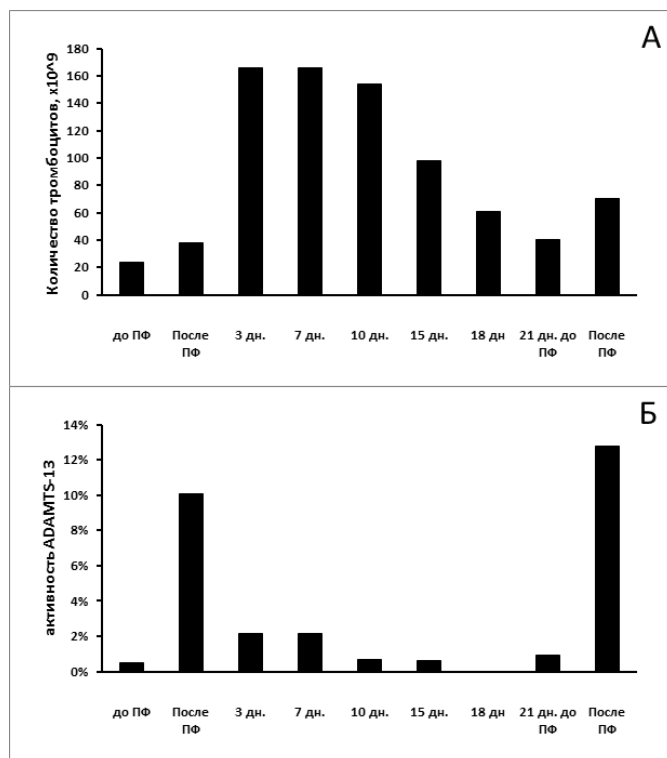


Рисунок 5.1 Количество тромбоцитов (А) и активность ADAMTS-13 (Б) до и в разные дни после плазмафереза (ПФ).

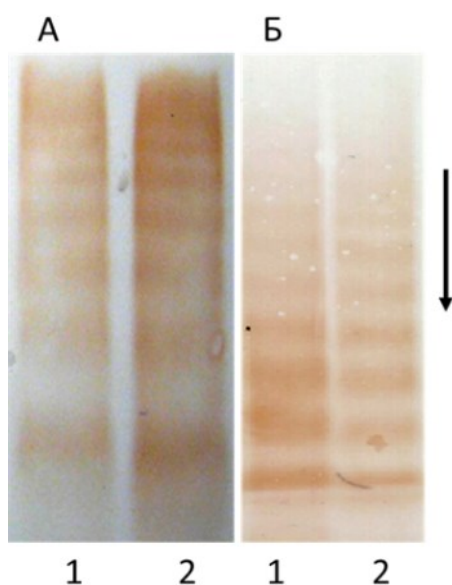


Рисунок 5.2 Мультимеры фактора Виллебранда контрольной плазмы (1) и плазмы пациента (2) после электрофоретического разделения и вестерн-гибридизации. Взяты образцы плазмы пациента до начала лечения в 2006 г. (А) и в 2014 г. через 8 лет после начала плазмаобмена (Б). В последнем случае плазма пациента взята на 21 день после трансфузии непосредственно перед очередной процедурой плазмаобмена. Стрелкой обозначено направление движения мультимеров в электрическом поле.

В настоящее время по этой же методике проведен подбор графика плазмаобмена мальчику 13 лет, страдающему наследственной формой ТТП. Плазмаобмен дробными порциями в течение 3 дней приводил к увеличению активности ADAMTS-13 до 30% от нормального уровня, однако за 3 недели также происходило снижение активности практически до нуля.

5.4 Заключение

1. Разработанные в ИБР РАН методы биохимической диагностики тромботической тромбоцитопенической пурпуры позволяют проводить массовое обследование пациентов на наличие этого смертельно опасного заболевания. Установлено, что встречаемость наследственной формы ТТП, по-видимому, недооценена, поскольку не удалось выявить ни одной больной женского пола. В целом по стране число таких больных может исчисляться сотнями. Число больных с приобретенной ТТП в несколько раз больше. Ранняя диагностика приобретенной (аутоиммунной) формы ТТП критически важна для сохранения здоровья и жизни этих больных. Диагностику особенно важно у женщин во время беременности, когда чаще всего наблюдаются рецидивы аутоиммунной формы данной болезни.

2. Методики определения активности ADAMTS-13 и мультимерного состава фактора Виллебранда важны для подбора индивидуального графика плазмаобмена и контроля состояния больного.

5.5 Список использованных источников

1 Moschcowitz E. An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease // Proc. NY Pathol. Soc. -1924. -Vol. 24/ P. 21–24.

2 Moake J.L., Rudy C.K., Troll J.H., Weinstein M.J., Colannino N.M., Azocar J., Seder R.H., Hong S.L., Deykin D. Unusually large plasma factor VII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura // N. Engl. J. Med. 1982. - Vol. 307. P. 1432–1435.

3 Furlan M., Robles R., Lämmle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis // Blood. -1996. -Vol. 87. № 10. P. 4223–4234.

4 Tsai H-M. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion // *Blood*. -1996. -Vol. 87. № 10. P. 4235–4244.

5 Furlan M., Robles R., Solenthaler M., Wassmer M., Sandoz P., Lämmle B. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura // *Blood*. -1997. -Vol. 89. P. 3097–3103.

6 Furlan M., Robles R., Galbusera M., Remuzzi G., Kyrle P., Brenner B., Krause M., Scharer I., Aumann V., Mittler U., Solenthaler M., Lämmle B. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome // *N. Engl. J. Med.* -1998. -Vol. 339. P. 1578–1584.

7 Tsai H-M., Lian E.-Y. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* -1998. -Vol. 339. P. 1585–1594.

8 Levy G.G., Nichols W.C., Lian E.C., Foroud T., McClintick J.N., McGee B.M., Yang A.Y., Siemieniak D.R., Stark K.R., Gruppo R., Sarode R., Shurin S.B., Chandrasekaran V., Stabler S.P., Sabio H., Bouhassira E.E., Upshaw J.D. Jr, Ginsburg D., Tsai H.M. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura // *Nature*. -2001. -Vol. 413. P. 488–494.

9 Rock G.A., Shumak K.H., Buskard N.A., Blanchette V.S., Kelton J.G., Nair R.C., Spasoff R.A. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N. Engl. J. Med.* // -1991. -Vol. 325. P. 393–397.

10 Накастоев И.М., Авдонин П.П., Грибанова Е.О., Калинин Н.Н., Цветаева Н.В., Петрова В.И., Калинина И.И., Канаева М.Л., Журавлев В.В., Бирюкова Л.С., Авдонин П.В., Рыжко В.В. Врожденная форма тромботической тромбоцитопенической пурпуры. Краткий обзор и описание клинического случая // *Гематология и трансфузиология* -2018, -Т.63, №2. С. 191-199. DOI 10.25837/HAT.2018.39..2..010.

РАЗДЕЛ 6 МЕХАНИЗМЫ ХИМИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СТАБИЛИЗАЦИИ И ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ СТРУКТУР

6.1 Введение

Скрининг химических соединений на разнообразных тест-системах с целью поиска потенциальных противоопухолевых препаратов является важной проблемой медицинской химии. Зародыши морского ежа благодаря своим уникальным качествам включены в список модельных организмов для медико-биологических исследований [1, 2]. Этот модельный объект используется нами для поиска новых веществ - ингибиторов клеточного деления, механизм действия которых обусловлен дестабилизацией микротрубочек. Разработанный ранее фенотипический метод скрининга на модели зародышей морского ежа [3] позволяет быстро идентифицировать вещества-антимитотики, дает представление об их механизме действия, не требует сложного дорогостоящего оборудования и дает хорошо воспроизводимые результаты, сопоставимые с данными, полученными на культурах опухолевых клеток. Антитубулиновый механизм действия веществ, выявленный на зародышах морского ежа, четко подтверждается ингибированием полимеризации очищенного тубулина *in vitro*.

6.2 Материалы и методы

Опыты проводили по описанному методу [3]. Взрослых морских ежей *Paracentrotus lividus* L. (Echinidae, Echinodermata) собирали в прибрежной зоне Кипра и содержали в аквариуме с аэрируемой морской водой. Нерест стимулировали инъекцией в полость тела животных 1–2 мл 0.5 М KCl. 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 0.05% для ДМСО). Для оценки антимитотической активности яйцеклетки обрабатывали веществами через 8–15 мин после оплодотворения, и через 2.5–6 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).

6.3 Результаты и обсуждение

На модели зародышей морского ежа *Paracentrotus lividus* испытано 88 веществ из библиотеки химических соединений Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, в том числе пиразинофуразаны, пиразолопиридины, гетероциклические аналоги природного антимитотика комбретастина, производные аллилполиметоксибензолов - компонентов эфирных масел семян петрушки и укропа. Выявлены 22 химических соединения с антимитотическим эффектом, обусловленным дестабилизацией микротрубочек. Следует отметить, что используемая модель сочетает как фенотипический, так и целевой (target-based) скрининг, поскольку показывает влияние исследуемого агента на делящиеся клетки развивающегося организма (рисунок 6.1) и в то же время доказывает дестабилизирующее действие на микротрубочки как клеточную мишень. Параллельно изучалось токсическое действие на развитие зародышей морского ежа 10 растворителей и эмульгаторов, применяемых в медицине, парфюмерии, косметологии, пищевой промышленности. Наименее токсичные диметилсульфоксид и этанол не влияли на развитие зародышей до 0.2% и 0.5% соответственно. Наибольший токсический эффект был выявлен у эмульгаторов кремофора Cremophor EL и сорбитана

монолаурата (пищевая добавка Е-493), которые в концентрации 0.005% нарушали развитие зародышей.

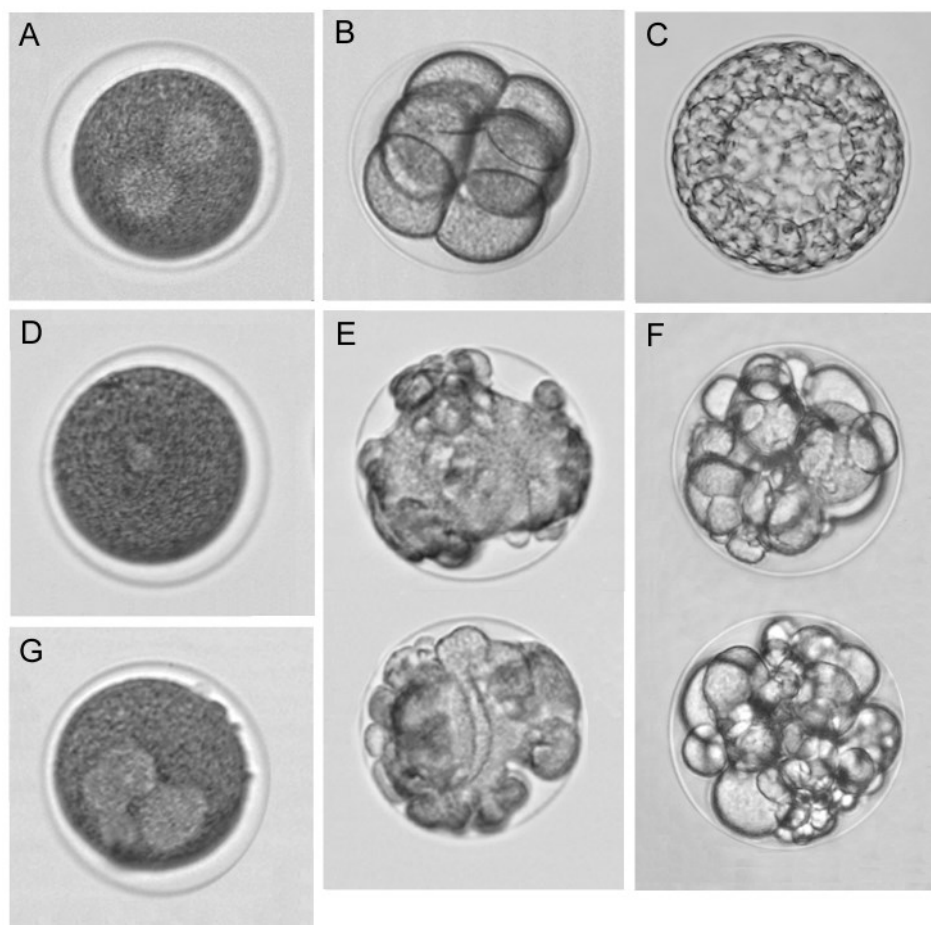


Рисунок 6.1 Действие веществ — модуляторов тубулина на яйцеклетки и зародышей морского ежа *Paracentrotus lividus*. (А–С) Контроль. (А) Интактные яйцеклетки с нормальным биполярным митотическим веретеном (светлые пятна) во время анафазы первого митотического деления. (В) Стадия 8 бластомеров. (С) Ранняя бластула. (D–F) Характерные эффекты дестабилизаторов микротрубочек на примере комбретастина А-4 в концентрации 20 нМ (D и E) и 5 нМ (F). (D) Неспособная делиться яйцеклетка, лишенная митотического аппарата. (E) Бугорчатые неделящиеся яйцеклетки. (F) Аномальное дробление. (G) Аберрантное мультиполярное митотическое веретено в яйцеклетке, обработанной стабилизатором микротрубочек таксолом в концентрации 5 μ M. Вещества добавляли к зиготам через 8–15 мин после оплодотворения. Инкубацию проводили при 21 °C. Яйцеклетки и зародышей наблюдали через 1 ч (А), 2.5 ч (В, D, E, G) и 6 ч (С, F) после оплодотворения. Диаметр яйцеклеток и зародышей составляет ~115 микрон.

Завершены испытания соединений класса стильбенов - аналогов природных антимитотиков комбретастинов, в которых этиленовый «мостик» заменен на пространственно стабильный гетероцикл (пиррол, пиразол, изоксазол, триазол) (рисунок 6.2). Проведено исследование зависимости антимитотической антитубулиновой активности стильбенов от их химической структуры [4-5].

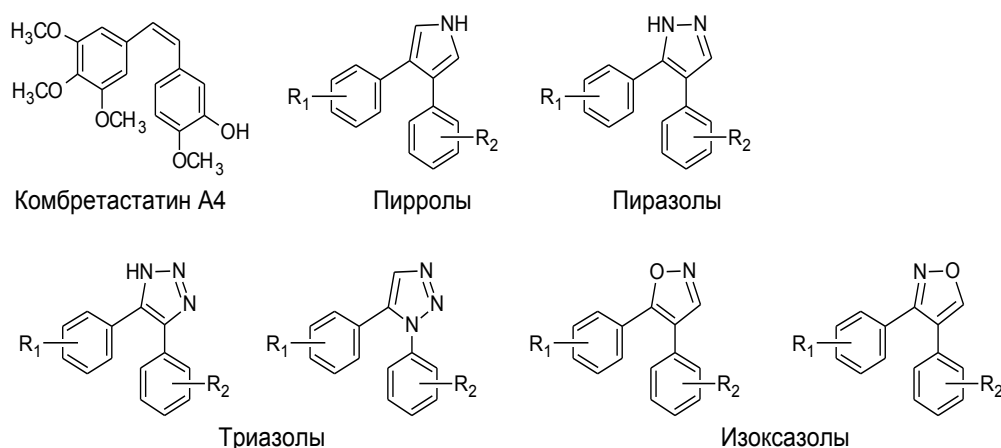


Рисунок 6.2 Структура молекул комбретаастатина А4 и его гетероциклических аналогов.

Исследованы биоизостерные аналоги коричной кислоты в качестве потенциальных нейропротекторов [6].

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. Обнаруженные антими́тотики могут найти применение при разработке новых противоопухолевых лекарственных средств [7].

Исследование связи активности веществ с химической структурой (structure-activity relationship, SAR) показало важную роль пиразольного, изоксазольного и триазольного линкера наряду с полиметоксибензольным фрагментом в проявлении антими́тотического антитубулинового эффекта. Для синтеза таких соединений легкодоступным исходным материалом служат аллилполиалкоксибензолы, содержащиеся в экстрактах семян петрушки и укропа.

6.5 Список использованных источников

1 Di Bernardo M., Di Carlo M. The sea urchin embryo: A model for studying molecular mechanisms involved in human diseases and for testing bioactive compounds. In Sea Urchin - From Environment to Aquaculture and Biomedicine, Agnello, M., Ed. InTech: Rijeka, Croatia, - 2017. P. 119–144.

2 Falugi C.; Lammerding-Koppel M., Aluigi M. G. Sea urchin development: An alternative model for mechanistic understanding of neurodevelopment and neurotoxicity // *Birth Defects Res. Part C.* -2008. -Vol. 84. P. 188–203.

3 Semenova M.N., Kiselyov A., Semenov V.V. Sea urchin embryo as a model organism for the rapid functional screening of tubulin modulators // *BioTechniques.* -2006. Vol. 40, N 6. P. 765-774.

4 Chernysheva N.B., Maksimenko A.S., Andreyanov F.A., Kislyi V.P., Strelenko Yu.A., Khrustalev V.N., Semenova M.N., Semenov V.V. Regioselective synthesis of 3,4-diaryl-5-unsubstituted-isoxazoles, analogues of natural cytostatic combretastatin A4 // *Eur. J. Med. Chem.*, -2018, -Vol. 146, P. 511–518. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.01.070.

5 Самет А.В., Сильянова Е.А., Ушкарров В.И., Семенова М.Н., Семенов В.В. Синтез 3,4-диарил- и 3-арил-4-ацилпирролов и изучение их антимиотической активности // *Известия РАН, Серия химическая*, -2018, № 5, с. 858–865. DOI: 10.1007/s11172-018-2150-3.

6 Неганова М.Е., Семенов В., Семенова М., Редкозубова О.М., Александрова Ю.Р., Лысова Е.А., Ключков С.Г., Шевцова Е.Ф. Биоизостерные аналоги коричной кислоты в качестве потенциальных нейропротекторов // *Biomedical Chemistry: Research and Methods.* -2018. -Vol. 1. No 3. e00052. DOI: 10.18097/bmcrm00052 .

7 **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., Konyushkin L.D., Raihstat M. M., Kiselyov A.S., Semenov V.V. The sea urchin embryo model as a reliable in vivo phenotypic screen to characterize selective antimitotic molecules. Comparative evaluation of combretapyrazoles, -isoxazoles, -1,2,3-triazoles, and -pyrroles as tubulin binding agents // *ACB Journal of Combinatorial Chemistry* 2018. V. 20. P. 700-721. DOI: 10.1021/acscombsci.8b00113.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За отчетный период проведена работа по исследованию роли гормонов, цитокинов, отдельных форм протеасом 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) Внесен вклад в понимание молекулярных механизмов развития иммунологической толерантности. Показано, что уровень иммунных протеасом с субъединицей LMP2 в мононуклеарных клетках печени является одним из ключевых факторов, определяющих эффективность приживления аллотрансплантатов у крыс независимо от донор-реципиентных различий (Подраздел 1.1). Этот результат перспективен для разработки способа диагностики приживления трансплантата по экспрессии иммунной субъединицы LMP2 протеасом в печени.

2) Решен ряд задач по проблеме взаимной регуляции нейроэндокринной и иммунной систем в раннем развитии (Подраздел 1.2). Показано влияние репродуктивного нейропептида ГРГ на развитие тимуса у плодов крыс и влияние медиаторов иммунной системы на развитие гипоталамо-гипофизарно-репродуктивной системы. Обнаружено, что наряду с нарушением миграции ГРГ-нейронов после пренатального воздействия ЛПС происходят также нарушения в развитии гонад у самок и самцов крыс, связанные, по-видимому, с повышенным содержанием провоспалительных цитокинов у плодов и половых стероидов в препубертатном периоде. Антагонисты рецепторов тестостерона (флютамид) и эстрадиола (фульвестрант), введенные в период повышенного содержания гормонов самкам и самцам, соответственно, восстанавливали половое созревание потомства. Этот результат указывает на возможность коррекции нарушений процесса развития.

3) Изучены механизмы действия противоопухолевых композиций, разработанных в ИБР РАН на основе MSB и низких доз бортезомиба (Подраздел 1.3). Обнаружено, что комбинированное влияние этих веществ на протеасомы приводит к синергетическому цитотоксическому эффекту против опухолевых клеток и лежит в основе их высокой противоопухолевой эффективности и низкой токсичности у грызунов *in vivo*. Результат указывает на перспективность и необходимость проведения клинических испытаний разработанных композиций.

4) Получены новые данные о протеасомах беспозвоночных: губок и кольчатых червей (Подраздел 2.1). Впервые установлена протеомная структура протеасом холодноводных морских губок *H. panicea* и *H. Dujardini*. Осуществлена *de novo* сборка

мРНК генов белков протеасом этих организмов. Установленные последовательности депонированы в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Для *H. dujardini*: BankIt2129107 Seq1-38 MH586732- MH586769; и для *H. panicea*: BankIt2136016 Seq1-39 MH683002- MH683040. Обнаружено, что в мышечных клетках аннелиды *A. marina* развитие воспаления, индуцированного введением ЛПС, связано с модификацией 20S-протеасом за счет изменений в структуре субъединицы бета7. Этот результат важен для понимания протеасомных механизмов развития реакции на индукцию воспаления у беспозвоночных, не экспрессирующих иммунные протеасомы.

5) Получен еще один важный результат, касающийся механизмов поддержания протеомного гомеостаза у беспозвоночных (Подраздел 2.2). Показано, что АТФаза VCP/p97 выполняет важную функцию в инфекционном цикле бакуловирусов, которая связана с процессингом убиквитинированных белков в инфицированных клетках. Результаты работы следует учитывать в биотехнологических приложениях, в которых используются клетки насекомых, инфицированные рекомбинантными бакуловирусами. В работе с инфицированными клетками следует контролировать функционирование факторов регуляции протеома, среди которых шапероны, протеасомы, а также белок VCP/p97.

6) Проведено исследование участия серотонина в механизме поведенческого выбора моллюсками (Раздел 3). Выявлено, что с уровнем серотонина связаны скоростные характеристики, но не структура поведения. Эксперименты с изоляцией серотонинергических нейронов показали, что нейрохимическое микроокружение клетки существенно влияет на проявление в ее активности тех пластических внутриклеточных модификаций, которые были вызваны навязанной локомоцией. Роль химических взаимодействий в формировании устойчивых нейронных ансамблей (центральных генераторов паттернов) показана при использовании математического моделирования (асинхронная модель) на основе химической коммуникации нейронов, имеющих различную трансмиссивную и рецепторную специфичность.

7) Кроме того, обнаружено парадоксально разнонаправленное изменение скорости локомоции у взрослых и ювенильных динофилид при повышении уровня серотонина в нервной системе, что предполагает смену рецепторов к серотонину в процессе развития (Раздел 4). Продемонстрировано, что гетерохрония в дифференцировке серотонин- и дофамин-содержащих нейронов обеспечивает адаптивные миграционные движения в толще воды у личинок морских ежей.

8) С использованием модели зародышей морских ежей отобраны 22 химических соединения с антимитотическим эффектом, обусловленным дестабилизацией микротрубочек (Раздел 6). Кроме того, исследовано токсическое действие на развитие зародышей морских ежей 10 растворителей и эмульгаторов, применяемых в медицине, парфюмерии, косметологии, пищевой промышленности. Наибольший токсический эффект был выявлен у эмульгаторов кремофора Cremophor EL и сорбитана монолаурата (пищевая добавка Е-493).

9) В ИБР РАН разработан метод дифференциальной диагностики ТТП на ранней стадии, на которой ещё отсутствуют клинические признаки, но уже есть неспецифические проявления этой болезни (тромбоцитопения и петехии) (Раздел 5). Совместно с Морозовской больницей и Гематологическим центром выявлено двое больных наследственной формой ТТП и проведена оценка эффективности их лечения по биохимическим показателям (мультимерному составу фактора Виллебранда). Разработанные методы могут быть использованы для обследования детей, у которых обнаружена тромбоцитопения неясной этиологии, для выявления среди них больных наследственной формой ТТП на доклинической стадии и составления реестра данных пациентов в России.

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 ***Карпова Я.Д., Люпина Ю.В., Алабедалькарим Н.М., Легач Е.И., Божок Г.А., Шарова Н.П.** Изменение содержания моноклеарных клеток печени, экспрессирующих иммунные протеасомы, при трансплантации ткани яичников в зависимости от донор-реципиентных различий у крыс//Бюлл. Эксп. Биол. Мед. -2018. № 6. С. 732 – 736.

Английская версия: Karpova Ya.D., Lyupina Yu.V., Alabedal'karim N.M., Legach E.I., Bozhok G.A., Sharova N.P. Changes in the Content of Mononuclear Liver Cells Expressing Immune Proteasomes after Transplantation of Ovarian Tissues Depending on Donor–Recipient Differences in Rats//Bulletin of Experimental Biology and Medicine. - 2018. - Vol. 165, Issue 6. P. 772 – 776.DOI: 10.1007/s10517-018-4263-y; - Q4.

2 ***Bozhok G.A., Alabedal'karim N.M., Legach E.I., Lyupina Y.V., Sharova N.P., Karpova Y.D.** Changes in the Expression of Immune Proteasomes in the Liver after the Induction of Portal Tolerance Depending on Donor-Recipient Differences in Rats /Bull Exp Biol Med. - 2018. - Vol. 164. No. 5. P. 541 - 644. DOI: 10.1007/s10517-018-4049-2; - Q4.

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 - 2018. e13204.тDOI: 10.1111/and.13204; - Q3.

4 **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(11), 3695. DOI: 10.3390/ijms19113695; - Q2.

5 ***Ignatiuk V.M., Izvol'skaya M.S., Sharova V.S., Voronova S.N., Zakharova L.A.** Disruptions in the reproductive system of female rats after prenatal lipopolysaccharide-induced immunological stress: role of sex steroids//Stress. - 2018. DOI: 10.1080/10253890.2018.1508440; -Q2.

Раздел 1 Подраздел 1.3

6 ***Astakhova T.M., Morozov A.V., Erokhov P.A., Mikhailovskaya M.I., Akopov S.B., Chupikova N.I., Safarov R.R., Sharova N.P.** Combined Effect of Bortezomib and Menadione Sodium Bisulfite on Proteasomes of Tumor Cells: The Dramatic Decrease of Bortezomib

Toxicity in a Preclinical Trial//Cancers. - 2018. - Vol. 10. Issue 10. pii: E351. - DOI: 10.3390/cancers10100351; - Q1.

7 *Колегова Е.С., Кондакова И.В., Завьялов А.А., Добродеев А.Ю., **Шарова Н.П.** Функционирование протеасом при лимфогенном метастазировании немелкоклеточного рака легкого//Бюлл. эксп. биол. мед. - 2018. - Т. 165. № 4. С. 481 – 484.

Английская версия: Kolegova E.S., Kondakova I.V., Zav'yalov A.A., Dobrodeev A.Y., **Sharova N.P.** Functioning of Proteasomes in Lymphogenic Metastasizing of Non-Small-Cell Lung Cancer// Bulletin of Experimental Biology and Medicine. - 2018. - Vol. 165. Is. 4. P. 486 – 489. DOI: 10.1007/s10517-018-4200-0; - Q4.

Раздел 2 Подраздел 2.1

8 *Кравчук О.И., Лавров А.И., Финошин А.Д., Горностаев Н.Г., Георгиев А.А., **Абатuroва С.Б., Михайлов В.С., Люпина Ю.В.** Роль эписимбионтов бактерий рода *Pseudoalteromonas* и клеточных протеасом в адаптивной пластичности морских холодноводных губок//Доклады Акад. наук. Сер. биол. - 2018. - Т. 479, No 2, С. 1 – 3.

Английская версия: Kravchuk O.I., Lavrov A.I., Finoshin A.D., Gornostaev N.G., Georgiev A.A., **Abaturova S.B., Mikhailov V.S., Lyupina Yu.V.** The Role of Epibionts of Bacteria of the Genus *Pseudoalteromonas* and Cellular Proteasomes in the Adaptive Plasticity of Marine Cold-Water Sponges//Doklady Biochemistry and Biophysics. - 2018. - Vol. 479. N 1. P. 77 -79. DOI: 10.1134/S1607672918020072; - Q4.

9 Finoshin A.D., Kravchuk O.I., Mikhailov V.S., Lyupina, Y.V. GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Для *H. dujardini*: BankIt2129107 Seq1-38 MH586732- MH586769; и для *H. panicea*: BankIt2136016 Seq1-39 MH683002- MH683040.

Раздел 2 Подраздел 2.2

10 *Lyupina Y.V., Erokhov P.A., Kravchuk O.I., Finoshin A.D., **Abaturova S.B., Orlova O.V.,** Beljelarskaya S.N., Kostyuchenko M.V., **Mikhailov V.S.** Essential function of VCP/p97 in infection cycle of the nucleopolyhedrovirus AcMNPV in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells//Virus Res. - 2018. - Vol. 253. P. 68 - 76. DOI: 10.1016/j.virusres.2018.06.001; - Q3.

Раздел 3

11 *Aonuma H., Totani Y., Kaneda M., Nakamura R., Watanabe T., Hatakeyama D., **Dyakonova V.E.,** Lukowiak K., Ito E. Effects of 5-HT and insulin on learning and memory formation in food-deprived snails//Neurobiology of Learning and Memory. - 2018. - Vol. 148. P. 20 - 29. DOI:10.1016/j.nlm.2017.12.010; - Q1-Q2.

12 *Korneev S.A., Vavoulis D.V., Naskar S., **Dyakonova V.E.**, Kemenes I., Kemenes G. A CREB2-targeting microRNA is required for long-term memory after single-trial learning//Scientific Reports. - 2018. - Vol. 8. N. 1. P. 3950. DOI: 10.1038/s41598-018-22278-w; - Q1.

13 ***Dyakonova V.** The Puzzle of Behavioral Choice or How Organisms Channel Their Evolution: a Review of Rui Diogo's Evolution Driven by Organismal Behavior: A Unifying View of Life, Function, Form, Mismatches, and Trends//Evolutionary Psychological Science - 2018. - Vol. 4. Is. 1. P. 67 – 70. DOI: 10.1007/s40806-017-0113-9.

14 **Korshunova T.**, Lundin K., Malmberg K., Picton B., Martynov A. First true brackish-water nudibranch mollusc provides new insights for phylogeny and biogeography and reveals paedomorphosis-driven evolution/ PLoS ONE - 13(3), e0192177. DOI: 10.1371/journal.pone.0192177; - Q1.

15 **Korshunova T.**, Fletcher K., Lundin K., Picton B., Martynov A. The genus Zelentia is an amphi-boreal taxon expanded to include three new species from the North Pacific and Atlantic oceans (Gastropoda: Nudibranchia: Trinchesiidae)//Zootaxa - 2018. - Vol. 4482(2). P. 297 - 321. DOI: 10.11646/zootaxa.4482.2.4; - Q3.

16 **Korshunova T.**, Fujita T., Martynov A. The First Record of Trinchesia lenkae Martynov, 2002 from Japan: Morphological and Molecular Comparison with the Material from the Type Locality in Russia (Nudibranchia: Trinchesiidae)//Venus - 2018. - Vol. 76(1-4). P. 19 - 28. DOI: http://doi.org/10.18941/venus.76.1-4_19; - Q4.

17 Лапшин Д.Н., **Воронцов Д.Д.** Низкочастотные звуки отпугивают самцов комаров Aedes diaantaeus N.D.K. (Diptera, Culicidae)//Энтомологическое обозрение - 2018. - Т. 97. № 2. С. 194 - 202.

Английская версия: Lapshin D.N., **Vorontsov D.D.** Low-Frequency Sounds Repel Male Mosquitoes Aedes diaantaeus N.D.K. (Diptera, Culicidae)//Entomological Review. - 2018. - Vol. 98. N 3. P. 266 - 271. DOI: 10.1134/S0013873818030028). - Q4.

18 **Сахаров Д.А.** Биохимическая модель синапса в исследованиях Т.М. Турпаева//Нейрохимия. - 2018. - Т. 35. № 4. С. 277 - 280.

Английская версия: **Sakharov D.A.** The Biochemical Model of the Synapse in Turpaev's Studies//Neurochemical Journal - 2018. -V. 12. No. 4. P. 285 – 287.

Раздел 4

19 *Yurchenko O.V., Skiteva O.I., **Voronezhskaya E.E.**, Dyachuk V.A. Nervous system development in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia)//Frontiers in Zoology - 2018. - Vol. 15. Is. 1. N 10. DOI: 10.1186/s12983-018-0259-8; - Q1.

20 ***Mayorova T.D.**, Smith C.L., Hammar K., Winters C.A., Pivovarova N.B., Aronova M.A., Leapman R.D., Reese T.S. Cells containing aragonite crystals mediate responses to gravity in *Trichoplax adhaerens* (Placozoa), an animal lacking neurons and synapses//PLOS ONE. - 2018. - Vol.13. N 1. P. e0190905. DOI: 10.1371/journal.pone.0190905; - Q1.

21 *Pozdnyakov I.R., **Sokolova A.M.**, Ereskovsky A.V., Karpov S.A. Kinetid structure in sponge choanocytes of Spongillida in the light of evolutionary relationships within Demospongiae//Zoological Journal of the Linnean Society - 2018. zlx109. DOI: 10.1093/zoolinnean/zlx109/4905843; - Q1.

22 *Bolotov I.N., Aksenova O.V., Bakken T., Glasby C.J., Gofarov M.Y., Kondakov A.V., Konopleva E.S., Lopes-Lima M., Lyubas A.A., Wang, Y., Bychkov A.Y., **Sokolova A.M.**, Tanmuangpak K., Tumpeesuwan S., Vikhrev I.V., Shyu J.B.H., Win T., Pokrovsky O.S. Discovery of a silicate rock-boring organism and macrobioerosion in fresh water//Nature Communications - 2018. - Vol. 9(1). P. 2882. DOI: 10.1038/s41467-018-05133-4; - Q1.

23 *Battonyai I., **Voronezhskaya E.E.**, **Obukhova A.**, Horvath R., Nezlin L.P., Elekes K. Neuronal Development in the Larvae of the Invasive Biofouler *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia), with Special Attention to Sensory Elements and Swimming Behavior //Biol Bull. - 2018 – Vol. 234(3). P. 192 - 206. DOI: 10.1086/698511; - Q3.

24 *Elekes K., Hiripi L., Balog G., Maasz G., Battonyai I.A., **Khabarova M.Y.**, Horvath R., **Voronezhskaya E.E.** Serotonergic regulation of the buccal (feeding) rhythm of the pond snail, *lymnaea stagnalis*. An immunocytochemical, biochemical and pharmacological approach//Acta Biologica Hungarica - 2018. - Vol. 69. Is. 3. P. 225 - 243. DOI: 10.1556/018.68.2018.3.1; - Q4.

Раздел 5

25 *Накастоев И.М., **Авдонин П.П.**, Грибанова Е.О., Калинин Н.Н., Цветаева Н.В., Петрова В.И., Калинина И.И., Канаева М.Л., Журавлев В.В., Бирюкова Л.С., **Авдонин П.В.**, Рыжко В.В. Врожденная форма тромботической тромбоцитопенической пурпуры. Краткий обзор и описание клинического случая//Гематология и трансфузиология - 2018. - Т.63. №2. С. 191 - 199. DOI 10.25837/НАТ.2018.39.2.010.

Раздел 6

26 *Chernysheva N.B., Maksimenko A.S., Andreyanov F.A., Kislyi V.P., Strelenko Yu.A., Khrustalev V.N., **Semenova M.N.**, Semenov V.V. Regioselective synthesis of 3,4-diaryl-5-unsubstituted-isoxazoles, analogues of natural cytostatic combretastatin A4//Eur. J. Med. Chem. - 2018, - Vol. 146. P. 511 – 518. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.01.070; - Q1.

27 *Самет А.В., Сильянова Е.А., Ушкаров В.И., **Семенова М.Н.**, Семенов В.В. Синтез 3,4-диарил- и 3-арил-4-ацилпирролов и изучение их антимиотической активности//Известия РАН, Серия химическая – 2018. № 5. С. 858 – 865.

Английская версия: Samet A.V., Sil'yanova E.A., Ushkarov V.I., **Semenova M.N.**, Semenov V.V. Synthesis of 3,4-diaryl- and 4-acyl-3-arylpyrroles and study of their antimitotic activity//Russian Chemical Bulletin - 2018. - Vol. 67. Is. 5. P. 858 - 865. DOI: 10.1007/s11172-018-2150-3; - Q4.

28 * **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., Konyushkin L.D., Raihstat M. M., Kiselyov A.S., Semenov V.V. The sea urchin embryo model as a reliable in vivophenotypic screen to characterize selective antimitotic molecules. Comparative evaluation of combretapyrazoles, -isoxazoles, -1,2,3-triazoles, and -pyrroles as tubulin binding agents // ACB Journal of Combinatorial Chemistry 2018. V. 20. P. 700-721. DOI: 10.1021/acscmbosci.8b00113. (WoS, Scopus).Q1.

Отчет утвержден на заседании Ученого совета, протокол № 12 от 27 декабря 2018 г.