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

УДК 611.013.1/.2 591.3
Рег. № ГЗ 0108-2018-0003
Рег. № НИОКТР АААА-А18-118041690134-0

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

_____ А.В. Васильев

«27» декабря 2018 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАННЕГО ОНТОГЕНЕЗА: ГАМЕТОГЕНЕЗ, ОПЛОДОТВОРЕНИЕ И РАННЕЕ РАЗВИТИЕ ЖИВОТНЫХ

Раздел № 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, проф.

_____ Н.Д. Озернюк
25.12.2018
подпись, дата

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

_____ С.Г. Васецкий
26.12.2018
подпись, дата

Москва 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор	подпись, дата 25.12.2018	Н.Д. Озернюк (Введение, раздел 5)
Руководитель, главный научный сотрудник, доктор биологических наук	подпись, дата 26.12.2018	С.Г. Васецкий
Исполнители: Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	подпись, дата 24.XII.2018	А.Ю. Кулибин (раздел 1)
Старший научный сотрудник, кандидат биол. наук	подпись, дата 24.XII.2018	Д.А. Никишин (раздел 3)
Ведущий научный сотрудник, доктор биол. наук	подпись, дата 25.12.2018	Ю.Б. Шмуклер (раздел 3)
Главный научный сотрудник, кандидат биол. наук	Краус подпись, дата 26.12.2018	Ю.А. Краус (раздел 4)
Старший научный сотрудник, кандидат биол. наук	подпись, дата 25.12.2018	С.В. Кремнёв (раздел 4)
Ведущий научный сотрудник, доктор биол. наук	подпись, дата 26.12.2018	А.А. Зотин (раздел 7)
Старший научный сотрудник, кандидат биол. наук	подпись, дата 24.12.2018	М.В. Нечаева (раздел 5)
Старший научный сотрудник, кандидат биол. наук	подпись, дата 26.12.2018	А.М. Красный (раздел 2)
Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук	подпись, дата 25.12.2018	С.Ю. Клейменов (раздел 6)
Нормоконтроль, ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук	подпись, дата 25.12.2018	Е.Б. Абрамова

РЕФЕРАТ

Отчет 82 с., 7 разд., 21 рис., 3 табл., 117 источников, 27 публикаций по теме.

КЛЕТКИ СЕРТОЛИ, МУЖСКОЕ БЕСПЛОДИЕ, КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ, ФЕРТИЛЬНОСТЬ, ПРОЛИФЕРАЦИЯ, СЕРОТОНИН, ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗ, МОРФОГЕНЕЗ, НЕЙРУЛЯЦИЯ, НЕРВНАЯ ТРУБКА, ЭМБРИОНАЛЬНАЯ ИНДУКЦИЯ, ОСИ ТЕЛА, ГОМЕОСТАЗ, ГИПОКСИЯ, ПРЕЭКЛАМПСИЯ, ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ БИОМОЛЕКУЛ

Объект исследования – процессы раннего онтогенеза, включая рост и формирование гамет, дифференцировка и морфогенез зародышей, последующие этапы развития отдельных тканей и органов.

Цель работы - выяснение особенностей регуляции онтогенетических процессов на разных этапах, от гаметогенеза до постэмбрионального развития, а также выявление механизмов, обеспечивающих устойчивое протекание этих процессов.

Методы, использованные в работе, сочетают морфологический, молекулярный, генетический и клеточный подходы.

В 2018 году выявлен ряд интересных фактов, приближающих к реализации поставленной цели. При изучении функционирования сперматогенной системы впервые показано, что комплекс ингибиторов сигнальных путей (YAC) увеличивает экспрессию генов - маркеров клеток Сертоли в культуре, что указывает на возможность восстановления мужской репродуктивной функции за счет Сертоли-подобных клеток взрослого организма. Показано, что в регуляции процессов фолликулогенеза, оогенеза и эмбриогенеза млекопитающих важную роль играет серотонинергическая система: в эти процессы вовлечен специфический мембранный транспортер Sert; серотонин влияет на паттерн экспрессии генов в клетках яичника. Получены новые данные по эволюционной пластичности эмбриональной индукции, обеспечивающей устойчивое формирование плана строения позвоночных, несмотря на изменение гаструляционных морфогенезов: опровергнута универсальность модели индукции нервной трубки, где основным источником сигнала является хорда. Установлено, что стимулом к развитию преэклампсии, нарушающей эмбриогенез человека, является разрушение эндотелия материнских сосудов и клеток трофобласта плаценты при повышенной активности провоспалительных макрофагов. Разработана серия регрессионных моделей, описывающих влияние климатических переменных на ростовые процессы пресноводных моллюсков и позволяющих оценить состояние популяций в условиях потепления климата. Показано, что стабильность биомолекул, как значимый фактор устойчивости онтогенеза, экономно обеспечивается за счет взаимодействий субъединиц аминокислотных остатков. Полученные результаты являются принципиально новыми и опубликованы в рецензируемых научных журналах.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ……. 6
ВВЕДЕНИЕ…… 7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ
РАЗДЕЛ 1. ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК СЕРТОЛИ МЫШИ…… 8
1.1 Введение……..... 8
1.2 Материалы и методы……. 8
1.3 Результаты и обсуждение……. 11
1.4 Заключение…… 16
1.5 Список использованных источников…….. 16
РАЗДЕЛ 2. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ 19
2.1 Введение……. 19
2.2 Материалы и методы……. 19
2.3 Результаты и обсуждение……. 22
2.4 Заключение…… 27
2.5 Список использованных источников…….. 27
РАЗДЕЛ 3. МЕДИАТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГАМЕТОГЕНЕЗА И РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ЖИВОТНЫХ…… 30
3.1 Введение……. 30
3.2 Материалы и методы……. 31
3.3 Результаты и обсуждение……. 32
3.4 Заключение…… 38
3.5 Список использованных источников…….. 39
РАЗДЕЛ 4. КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОРФОГЕНЕЗА В РАЗВИТИИ 43
4.1 Введение……. 43
4.2 Материалы и методы……. 45
4.3 Результаты и обсуждение……. 48
4.4 Заключение 53
4.5 Список использованных источников…….. 54
РАЗДЕЛ 5. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ (ГИПОКСИИ И ТЕМПЕРАТУРЫ) НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РАЗВИВАЮЩИХСЯ ЖИВОТНЫХ. ПОИСК АНТИГИПОКСИЧЕСКИХ СРЕДСТВ…… 57
5.1 Введение……. 57
5.2 Материалы и методы……. 57
5.3 Результаты и обсуждение……. 58
5.4 Список использованных источников…….. 59
РАЗДЕЛ 6. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ И ФЕРМЕНТНОЙ

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ БИОМОЛЕКУЛ…….. 60
6.1 Введение……. 60
6.2 Результаты и обсуждение ……. 61
6.3 Заключение ……. 64
6.4 Список использованных источников …… 65
РАЗДЕЛ 7. ДИНАМИКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА И РОСТА В ОНТОГЕНЕЗЕ ЖИВОТНЫХ И МЕХАНИЗМЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА 66
7.1 Введение……. 66
7.2 Материалы и методы ……. 67
7.3 Результаты и обсуждение 69
7.3 Список использованных источников …… 74
ЗАКЛЮЧЕНИЕ……. 76
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГОСЗАДАНИЯ ЗА 2018 ГОД……... 79

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДАД – диастолическое артериальное давление

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ИМТ – индекс массы тела

КЛСМ - конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

КС – клетки Сертоли

ИЛ – интерлейкин

НЧЗ – наночастицы золота

ОТ-ПЦР – сопряженная с обратной транскрипцией ПЦР

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР РВ – ПЦР в реальном времени

ПЭ – преэклампсия

САД – систолическое артериальное давление

СПК – Сертоли-подобные клетки

СЭМ - сканируюшая электронная микроскопия

ТЭМ - трансмиссионная электронная микроскопия

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭС – эпителиальная складка

CPEB – белок, связывающийся с цитоплазматическим элементом полиаденилирования

EGF – эпидермальный фактор роста

FBS – фетальная бычья сыворотка

FGF2 – фактор роста фибробластов 2

HUMgal - гистоноподобный белок из *Mycoplasma gallisepticum*

HUSpm - гистоноподобный белок из *Spiroplasma melliferum*

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1

IL - интерлейкин

ITS – добавка инсулин-трансферрин-селенит

LIF – лейкемия-ингибирующий фактор роста

NAADP – Никотиновой кислоты адениндинуклеотидфосфат

PBS – фосфатно-солевой буфер

PFA - параформальдегид

PTw – раствор PBS и Tween 20

SCI – индекс выпуклости раковины

YAC – комплекс низкомолекулярных ингибиторов Y-27632, A-83-01 и CHIR99021

αγ-Tpm – альфа-гамма гетеродимер тропомиозина,

βγ-Tpm – бета-гамма гетеродимер тропомиозина,

ВВЕДЕНИЕ

Анализ регуляции различных этапов индивидуального развития представляет несомненный интерес для понимания целостности онтогенетических процессов, а также специфических механизмов контроля дифференцировки и формообразования различных тканей и органов. Для определенных этапов онтогенеза характерен свой набор механизмов контроля роста и формирования гамет, а также дифференцировки и формообразования зародышей и последующих этапов развития отдельных тканей и органов. Регуляция ранних этапов онтогенеза осуществляется при помощи смены программ развития, имеющих место при переходе от роста к созреванию гаметогенных клеток, в процессе оплодотворения и последующего эмбрионального развития, а также при переходе к дифференцировке и формообразованию отдельных тканей и органов.

Выяснение особенностей регуляции данных этапов онтогенеза и механизмов смены программ развития при последовательном переходе от одного от одного этапа к другому составляет основную проблему современной биологии развития. Сочетание молекулярных, генетических и клеточных подходов стало необходимым инструментом анализа этих ключевых событий индивидуального развития. Особый интерес представляет сравнительное исследование онтогенетических процессов, прежде всего, развития беспозвоночных, находящихся на ранних этапах эволюции (губки, книдарии, гребневики), когда происходит формирование регуляторных механизмов индивидуального развития.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

РАЗДЕЛ 1. ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК СЕРТОЛИ МЫШИ

1.1 Введение

Изучение функционирования сперматогенной системы, а также воздействия на нее различных повреждающих факторов и возможностей восстановления является важной задачей репродуктивной биологии, имеющей, кроме фундаментального, и несомненное практическое значение для медицины. Действительно, по данным ВОЗ, продолжает расти частота случаев бесплодия в браке, примерно половина этих случаев связана с нарушением мужской фертильности. Одной из основных причин мужского бесплодия являются нарушения половых клеток или поддерживающих их дифференцировку клеток Сертоли (КС). КС взрослого организма являются дифференцированными, не пролиферирующими клетками, не способными к восстановлению после повреждения [1]. Тем не менее, дифференцировка КС до некоторой степени обратима [2], что проявляется при тепловом воздействии [3], при изменении гормонального фона [4] и при выведении КС в культуру [5]. Кроме того, ранее нами было установлено, что в отделе семенника половозрелой мыши, содержащем транзиторную зону семенных канальцев и сеть семенника, присутствует популяция клеток, способных к активной пролиферации в культуре [6]. Так как в этих клетках в культуре экспрессируются многие гены, специфические для КС, они были названы Сертоли-подобными клетками (СПК). В связи с этим целью настоящего этапа работы стал поиск путей *in vitro* восстановления популяции КС взрослого организма за счет СПК, а также изучение мутабильности половых клеток, подвергшихся повреждающему воздействию. Задачи исследования: оценить способность СПК из семенника мыши дифференцироваться в КС *in vitro* при разных условиях культивирования, в том числе их способность поддерживать развитие половых клеток; изучить влияние внутрибрюшинного введения наночастиц золота на возникновение микроядерных аберраций в половых клетках мыши.

1.2 Материалы и методы

1.2.1 Исследование экспрессии генов-маркеров СПК с использованием ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ).

Культуру СПК получали из семенников половозрелых мышей линии C57BL/6J по методике, описанной ранее [6]. Клетки культивировали на 50-мм чашках Петри с мембраной

PEN (WillCo Wells), покрытых Matrigel (Corning), при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в среде DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher) с добавлением 1% FBS, пенициллина-стрептомицина, пирувата натрия и ITS. К части культур добавляли низкомолекулярные вещества Y-27632 (10 μM, Abcam), A-83-01 (0,5 μM, Sigma) и CHIR99021 (3 μM, Sigma). На 9 сут культивирования клетки окрашивали прижизненным красителем SYBR Green I (1:5000) и вырезали колонии СПК с помощью системы лазерной диссекции Leica LMD 7000 по ранее описанной методике [7]. Из полученного материала выделяли РНК с помощью RNeasy Micro Kit (Qiagen).кДНК синтезировали с помощью MMLV RT kit (Евроген). Далее проводили ПЦР РВ, используя SYBR green qPCRmix-HS with ROX (Евроген), на StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). В качестве референс-гена для нормализации результатов ПЦР использовали Hprt.

1.2.2 Исследование влияния факторов роста на долю Dmrt1+ СПК в культуре

Культуры СПК получали по методике, описанной ранее [6]. Клетки культивировали в культуральных планшетах, покрытых матригелем, в CO_2-инкубаторе (37°C, 5 % CO_2). В качестве основы для всех сред использовали DMEM/F12 с GlutaMAX, содержащую пируват натрия, ITS, пенициллин/стрептомицин и ингибиторы YAC. Исследовали влияние следующих факторов: EGF (10 нг/мл, SCI Store), IGF-1 (10 нг/мл), LIF (1 нг/мл), FGF2 (50 нг/мл, SCI Store, Россия)) или фолликулостимулирующего гормона (ФСГ 2МЕ/мл, Organon, Нидерланды). Анализ доли Dmrt1 экспрессирующих СПК в культуре проводили на 9 сут культуры. Для этого культуру клеток окрашивали на общий для всех СПК маркер Wt1 и, затем, на Dmrt1 по методике, описанной ранее [6]. Использовали первичные антитела против Wt1 (Santa Cruz Biotechnology, США, sc-192, 1:100) и Dmrt1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-377167, 1:50) и соответствующие вторичные антитела с флуоресцентной меткой (Thermo Fisher, A11008 и A31571, 1:500). Препараты фотографировали на микроскопе Leica DMI6000 (Германия), анализировали и проводили подсчеты с помощью программного обеспечения Cell Profiler.

1.2.3 Анализ способности СПК, выращенных в 2D-культуре поддерживать развитие половых клеток в условиях 3D-сокультуры с клетками семенника мышонка.

Для этого эксперимента культуру СПК получали от GFP-мышей линии C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J, все клетки которых экспрессируют GFP под промотором гена бета-актина. Суспензию клеток семенника мышонка получали из мышат линии ICR возрастом 4-6 сут. Использование трансгенных животных, экспрессирующих GFP позволило

идентифицировать СПК клетки в 3D-сокультурах. Для создания 3D-сокультур суспензию клеток из культуры СПК, культивировавшихся в 2D условиях в течение 9 сут. соединяли (в соотношении 1:10) с суспензией клеток семенников мышат, заключали в коллаген I типа (1,5 мг/мл, Thermo Fisher) по методике, описанной ранее [6], и культивировали на границе фаз жидкость/газ в среде с 10 % KSR в течение 2 нед. Суспензию клеток семенников мышат получали путем долговременной (1 ч.) инкубации фрагментов семенников в смеси коллагеназы IV типа (3 мг/мл), ДНКазы I типа (0,1 мг/мл) и гиалуронидазы (2 мг/мл). Иммунофлуоресцентная окраска 3D со-культур: Образцы 3D со-культур окрашивали тотально антителами к Dmrt1, GFP (Thermo Fisher, A10262, 1:400), Ddx4 (Abcam, ab13840, 1:200), Stra8 (Abcam, ab49602, 1:200) и соответствующими вторичными антителами (Thermo Fisher, A10036, A21207 и A11039, 1:500); инкубацию с антителами проводили при 37°C в течение 18 ч. Канальцеподобные структуры, сформировавшиеся в гелях, фотографировали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5.

1.2.4 Анализ мутагенного эффекта внутрибрюшинного введения 2.5 нм наночастиц золота (НЧЗ) мышам линии 129/JY

Для исследования использованы половозрелые самцы линии 129/JY (J, Jackson Laboratory, BarHarbor, ME, United States). Животные были разделены на контрольную и экспериментальные группы по 4 мышей на группу. Животным из контрольной группы однократно, внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл физраствора. Мышам из опытных групп однократно или 4-х кратно (в течение 4 сут и 1 раз в сут) вводили наночастицы золота (НЧЗ) в 0,2 мл физ. Раствора (~10^{15} частиц/мл.). Мышей из контрольной и опытной групп забивали на 14 сут после последней инъекции. Далее, проводили цитогенетическое исследование, для чего извлекали семенники, разрезали на половинки и делали отпечатки сперматогенной ткани на предметных стеклах, которые, затем, фиксировали 4% формалином и окрашивали по Фельгену. На препаратах под микроскопом проводили подсчет числа микроядерных аберраций в популяции округлых сперматид.

1.3 Результаты и обсуждение

Применение методики лазерной диссекции колоний клеток (рисунок 1.1 А, Б) позволило отделить СПК от примесных клеток: перитубулярно-мышечных клеток и КС семенных канальцев, располагающихся между колониями [7]. Прижизненная окраска культур SYBR Green I способствовала точному выявлению колоний СПК в культуре во время процедуры лазерной диссекции.

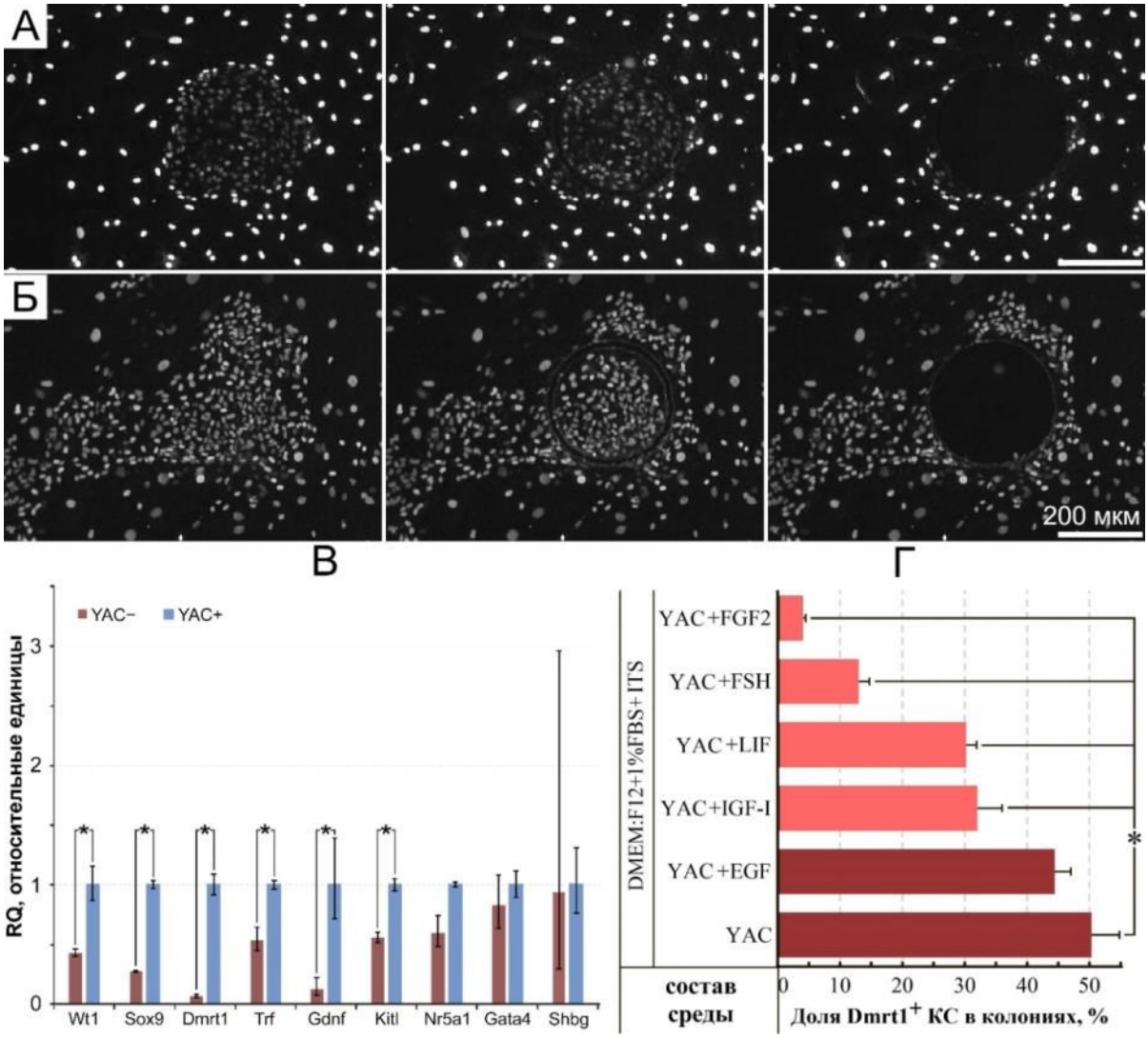

Рисунок 1.1 - Анализ экспрессии генов-маркеров КС в культурах СПК. А, Б – репрезентативные фотографии колоний клеток, поддерживаемых на среде с YAC (А) или без YAC (Б), во время проведения лазерной микродиссекции. Показан процесс вырезания клеток. Клетки окрашены SYBR Green I. В – результаты ПЦР в реальном времени. RQ – относительное количество РНК. * – $P \leq 0.05$, здесь и далее непараметрический критерий Манна–Уитни. Г – доля $Dmrt1^+$ СПК в культурах, полученных от 2-3-мес мышей, на 9 сут культивирования в средах различного состава. * – различия в количестве $Dmrt1^+$ клеток статистически достоверны при $P \leq 0.05$. На графиках представлены средние значения от трех независимых экспериментов и стандартные ошибки среднего.

Анализ экспрессии генов-маркеров КС в культуре СПК с помощью ПЦР в реальном времени показал, что добавление к культуральной среде YAC (комплекса из трех низкомолекулярных веществ: ингибитора Rho-ассоциированной киназы Y-27632 (Y), ингибитора рецептора TGFbeta 1 типа A-83-01 (A) и ингибитора гликоген-синтазы-киназы 3 CHIR99021 (C)) статистически значимо повышало уровень экспрессии транскрипционных факторов Wt1, Sox9 и Dmrt1 (рисунок 1.1 В). Все эти факторы являются ключевыми для

спецификации КС в ходе эмбрионального развития [8], а также входят в состав комплекса генов, которые необходимо и достаточно активировать в фибробластах, чтобы прошла их трансдифференцировка в КС [9]. Также YAC достоверно увеличивал экспрессию Trf, Gdnf и Kitl (рисунок 1.1 В). Белки, кодируемые этими генами, участвуют в процессах поддержания жизнеспособности и дифференцировки половых клеток [10]. Экспрессия части генов, специфичных для КС (Nr5a1, Gata4, Shbg), не зависела от добавления YAC (рисунок 1.1 В). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что комплекс низкомолекулярных веществ YAC, при его добавлении к культуре СПК, повышает уровень функционального состояния КС, то есть способствует их дифференцировке в сторону КС. YAC может быть использован для эффективного поддержания СПК в культуре. Это особенно важно, так как позволит продолжить изучение свойств этих клеток *in vitro*.

Далее мы исследовали влияние различных факторов роста и ФСГ на долю Dmrt1-экспрессирующих клеток (уровень экспрессии транскрипционного фактора Dmrt1 важен для дифференцировки КС и поддержания развития гонады по мужскому типу), при этом в качестве базовой была использована среда с добавлением YAC. Как видно из графика, (см. рисунок 1.1 Г), добавление LIF, IGF-1, FGF2 и ФСГ значимо снижает уровень Dmrt1 в культуре по сравнению со средой без факторов и только EGF не изменяет количества $Dmrt1^+$ клеток (рисунок 1.1 Г). На рисунке 1.2 представлены примеры колоний СПК, окрашенных на маркер КС Wt1 (зеленый), экспрессирующийся всеми СПК в культуре, и Dmrt1, экспрессирующийся только частью клеток. Видно, что добавление таких факторов как EGF и IGF-1 увеличивает пролиферативную активность СПК в культуре и при этом процент $Dmrt1^+$ клеток максимален из всех исследованных факторов. Из полученных результатов следует, что только добавление YAC ингибиторов значительно увеличивает долю $Dmrt1^+$ СПК в культуре примерно до 50%. Возможно, для 100% экспрессии Dmrt1 нужны дополнительные факторы, хотя все добавки, протестированные в настоящем исследовании (EGF, IGF-1, LIF, FGF2, ФСГ), не увеличивали долю $Dmrt1^+$ клеток в культуре. Вероятно, это объясняется гетерогенностью популяции СПК, то есть часть этих клеток, по-видимому, в принципе не способна к экспрессии Dmrt1. Наиболее перспективным вариантом среды для культивирования СПК на наш взгляд является среда с добавлением YAC и EGF, так как добавление последнего не снижает долю $Dmrt1^+$ СПК в культуре, а также способствует сохранению клетками их эпителиальной морфологии.

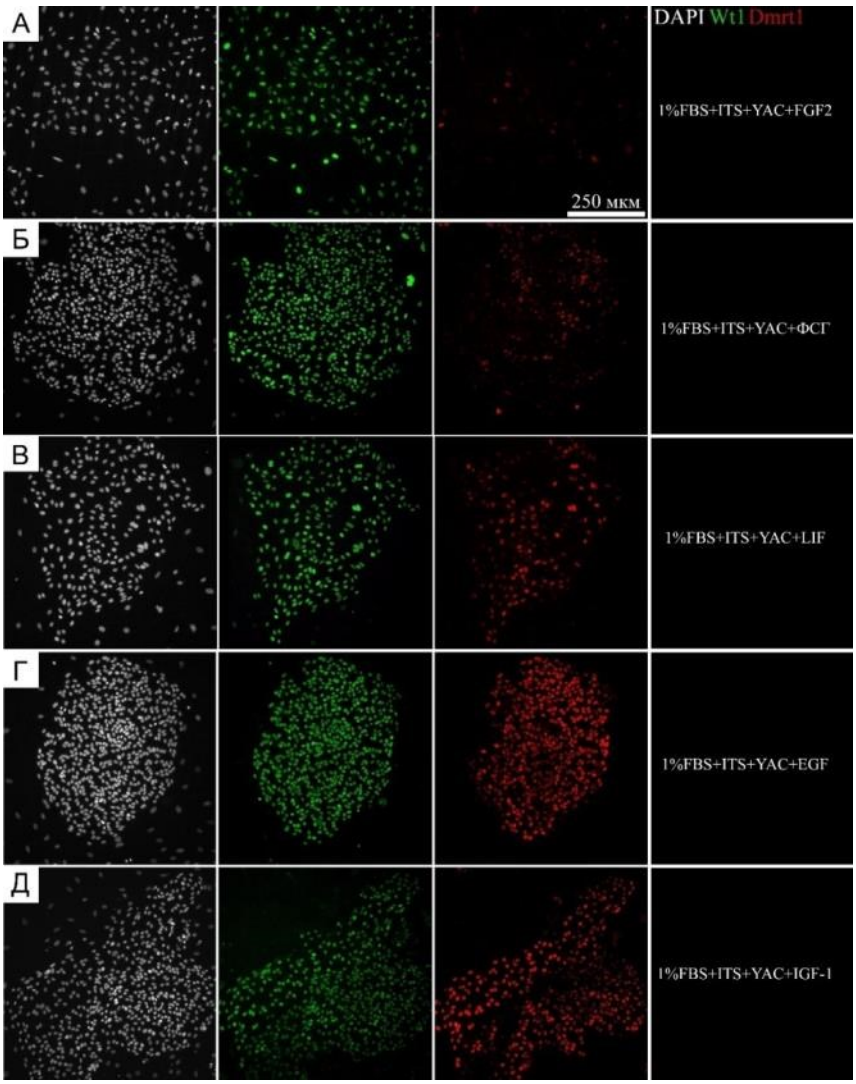

Рисунок 1.2 - Репрезентативные микрофотографии колоний СПК на 9 сут культивирования в средах с добавлением различных факторов роста или ФСГ. Двойная окраска на маркеры КС транскрипционные факторы Wt1 и Dmrt1.

Было проведено исследование способности СПК поддерживать развитие половых клеток в условиях совместной 3D-культуры с половыми и соматическими клетками семенника неонатальной мыши. К базовой среде (Dmem:F12+10%KSR) для культивирования половых клеток в 3D-условиях были добавлены факторы: ФСГ и экстракта гипофиза, содержащий лютеинизирующий гормон. Установлено что к 14 сут СПК в 3D-культуре встраиваются в образующиеся семенные канальцы и вступают в контакт с половыми клетками (рисунок 1.3 А).

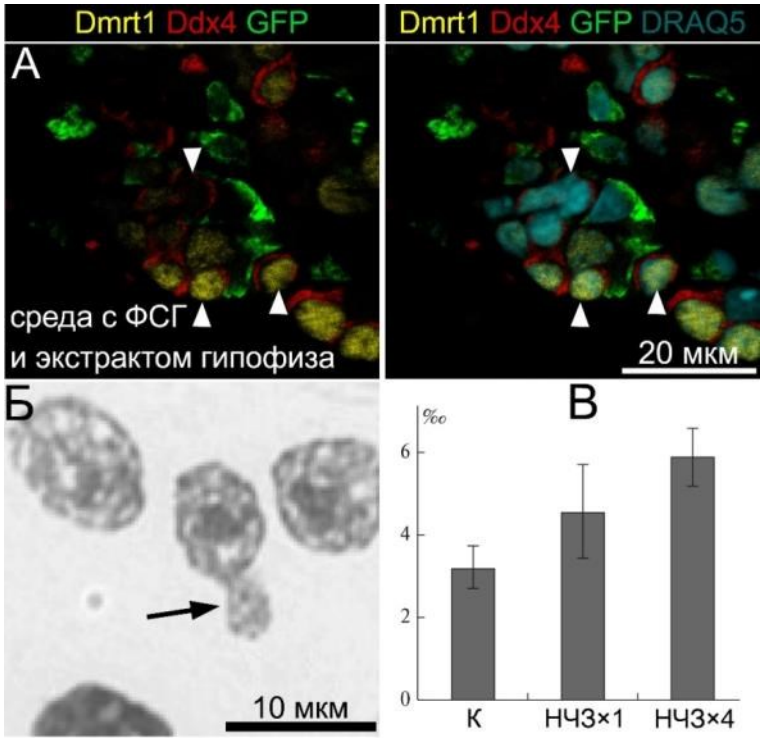

Рисунок 1.3 - А – микрофотографии канальцев, сформированных в 3D-культуре клетками мышонка и СПК (зеленая окраска, GFP), видны $Ddx4^{+}/Dmrt1^{+}$ сперматогонии, находящиеся в контакте с СПК (головки стрелок). Б – микрофотография ядер округлых сперматид, окрашенных по Фельгену, стрелкой указано микроядро. В – доля округлых сперматид с микроядерными аберрациями в контрольной и опытных группах. К – контроль, НЧЗ – наночастицы золота.

На этом сроке культивирования основными половыми клетками, встречающимися в канальцах, были $Ddx4^{+}/Dmrt1^{+}$ сперматогониальные клетки. Отсутствие более дифференцированных половых клеток может быть связано с несколькими факторами, во-первых, с короткой продолжительностью культивирования, действительно, при 3D культивировании неонатальных клеток семенника мыши гаплоидные маркеры появляются только через 7 нед. культивирования [11]. Во-вторых, культивирование проводилось при 37ºС согласно методикам, приведенным в одном из последних исследований [12], возможно, что снижение температуры до физиологичной (34ºС) позволит получить гаплоидные половые клетки *in vitro*.

Исследование мутагенного эффекта внутрибрюшинного введения 2.5 нм наночастиц золота (НЧЗ) мышам линии 129/JY показало, что однократная инъекция НЧЗ (0.2 мл раствора, ~10^{15} частиц/мл) не приводит к статистически значимому увеличению частоты микроядерных аберраций (рисунок 1.3 Б) в популяции округлых сперматид на 14 сут после инъекции (P=0.165) по сравнению с контрольной группой мышей, которым вводили физраствор. Четырехкратное введение НЧЗ в той же дозе приводит к статистически

значимому увеличению числа ядер с микроядрами (P=0.012) через две недели после последней инъекции (рисунок 1.3 B) [13]. Ранее мы показали, что при таких же условиях эксперимента однократное введение НЧЗ мышам CBA×C57Bl/6 приводило к резкому статистически значимому увеличению числа аберрантных округлых сперматид по сравнению с контролем [14], в то время как четырехкратное введение частиц не оказывало эффекта. Необходимо также отметить, что уровень спонтанной мутабильности в популяции округлых сперматид у мышей линии CBA×C57Bl/6 был в 4 раза ниже, чем у мышей линии 129/JY, несущих нонсенс мутацию в гене, кодирующем ДНК-полимеразу йота. Высокий уровень спонтанной мутабильности у мышей линии 129/JY отчасти объясняет отсутствие эффекта однократного введения им НЧЗ. Разница в результатах, полученных при четырехкратном введении наночастиц на двух разных линиях мышей, вероятно, связана с разницей в функционировании систем репарации ДНК. Так у мышей CBA×C57Bl/6 эффективность систем репарации ниже, чем у 129/JY, и пролонгированное введение НЧЗ может приводить к гибели части половых клеток в процессе мейотических делений и уменьшению доли аберрантных округлых сперматид.

1.4 Заключение

Впервые установлено, что низкомолекулярные ингибиторы YAC, по данным ПЦР РВ, увеличивают экспрессию основных генов маркеров КС в культуре СПК. Добавление к культуральной среде EGF, IGF-1, LIF, FGF2, ФСГ во всех случаях кроме EGF приводит к снижению доли Dmrt1+ клеток. Среда с YAC и EGF, из всех исследованных, наиболее оптимальна, так как способствует наилучшей пролиферативной активности СПК и сохранению ими эпителиального фенотипа. Добавление ФСГ и экстракта гипофиза к 3D ко-культуре минорной популяции КС с половыми и соматическими клетками семенника неонатальной мыши не способствовало увеличению числа половых клеток или их более эффективной дифференцировке, что вероятно связано с малым сроком и условиями 3D-культуры. В дальнейшем мы предполагаем провести дополнительные исследования. Наночастицы золота оказывают незначительный мутагенный эффект на половые клетки мышей линии 129/JY.

1.5 Список использованных источников

1 Malolina E.A., Kulibin A.Yu., Naumenko V.A., Gushchina E.A., Zavalishina L.E., Kushch A.A. Herpes simplex virus inoculation in murine rete testis results in irreversible testicular damage//International Journal of Experimental Pathology – 2014. - V. 95. P. 120 – 130.

2 Tarulli G.A., Stanton P.G., Meachem S.J. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? //Biology Reprodaction - 2012. - Vol. 87. P. 1 - 11.

3 Zhang Z.H., Hu Z.Y., Song X.X., Xiao L.J., Zou R.J., Han C.S., Liu Y.X. Disrupted expression of intermediate filaments in the testis of rhesus monkey after experimental cryptorchidism // Internal Jornal of Andrology - 2004. - Vol. 27.P. 234 - 239.

4 Tarulli G.A., Stanton P.G., Loveland K.L., Rajpert-De Meyts E., McLachlan R.I., Meachem S.J. A survey of Sertoli cell differentiation in men after gonadotropin suppression and in testicular cancer // Spermatogenesis - 2013. - Vol. 3.P. e24014.

5 Ahmed E.A., Barten-van Rijbroek A.D., Kal H.B., Sadri-Ardekani H., Mizrak S.C., van Pelt A.M., de Rooij D.G. Proliferative activity in vitro and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells // Biology Reprodaction - 2009. - Vol. 80. P. 1084 - 1091.

6 Kulibin A.Yu., Malolina E.A. Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture // Reproduction - 2016. - Vol. 152, № 4.P. 271 - 281.

7 Малолина Е.А., Кулибин А.Ю. Комплекс низкомолекулярных ингибиторов YAC повышаетуровень экспрессии генов-маркеров клеток Сертоли в культуре Сертоли-подобных клеток семенника взрослой мыши//Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки - 2018. № 12. (принята к печати).

8 Lin Y.T., Capel B. Cell fate commitment during mammalian sex determination//Current Opinion Genetic and Development – 2015. - Vol. 32. P. 144 - 152.

9 Buganim Y., Itskovich E., Hu Y.C., Cheng A.W., Ganz K., Sarkar S., Fu D., Welstead G.G., Page D.C., Jaenisch R. Direct reprogramming of fibroblasts into embryonic Sertoli-like cells by defined factors//Cell Stem Cell – 2012. - Vol. 11, № 3. P. 373 - 386.

10 Sertoli Cell Biology.Eds M.K. Skinner, M.D. Griswold. San Diego; L.: Elsevier Academic Press, 2005. - 512 p.

11 Yokonishi T., Sato T., Katagiri K. et al. In vitro reconstruction of mouse seminiferous tubules supporting germ cell differentiation//Biology Reprodaction – 2013. - Vol. 89, №1. P. 15.

12 Zhou Q., Wang M., Yuan Y., Wang X., Fu R., Wan H. Complete meiosis from embryonic stem cell-derived germ cells in vitro//Cell Stem Cell – 2016. - Vol. 18, № 3. P. 330 - 340.

13 Муджири Н.М., ЗахидовС.Т., РудойВ.М., ДементьеваО.В., МакаровА.А., МакароваИ.В., Зеленина И.А., Андреева Л.Е., Маршак Т.Л. Цитогенетическая активность наночастиц золота в половых и соматических клетках мышей линии 129 с нонсенс-мутацией

в гене ДНК-полимеразы йота//Известия Российской академии наук. Серия биологическая - 2018. № 2. С. 137 - 143.

14 Захидов С.Т., Муджири Н.М., Рудой В.М., Дементьева О.В., Макаров А.А., Зеленина И.А., Маршак Т.Л. Наночастицы золота: мутаген, антимутаген, комутаген?//Известия Российской академии наук. Серия биологическая - 2017. № 3. С. 213 - 217.

РАЗДЕЛ 2. РАЗДЕЛ 6. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ.

2.1 Введение

Преэклампсия (ПЭ) - это гестационное многофакторное заболевание неясной этиологии, в основе которого лежит гипертензия в сочетании с протеинурией и/или дисфункцией жизненно важных органов. Одна из концепций развития ПЭ предполагает формирование недостаточной иммунной толерантности к полуалогенному плоду (или полностью аллогенному в случае донации яйцеклетки) [1]. Также как возможную причину ПЭ, рассматривают недостаточный уровень адаптации тканей и органов к изменениям в организме происходящих во время беременности. Одним из таких изменений является значительное увеличение активных форм кислорода (АФК) в крови у беременных женщин. Ранее мы установили, что к третьему триместру беременности уровень АФК в крови повышается примерно в 2-3 раза как у женщин с физиологически протекающей беременностью, так и у женщин с ПЭ [2]. Однако уровень АФК в случае с ПЭ был взаимосвязан с уровнем протеинурии. У женщин с ПЭ отмечаются повышенные уровни маркеров повреждения эндотелиальных клеток - фибронектина и фактора фон Виллебранда [3]. Предполагается, что существует связь между отклонениями в инвазии трофобласта плаценты и материнской эндотелиальной дисфункцией, возникающей за счет высвобождения плацентарных факторов в кровь матери [4, 5]. Однако полного понимания причин возникновения материнской эндотелиальной дисфункции на данный момент нет. Данная работа направлена на решение двух задач. Первая - выявить факторы, имеющие наиболее значимые различия при развившейся ПЭ, для дальнейшего их использования в динамических исследованиях. Вторая - поиск взаимосвязей между про- и противовоспалительными цитокинами, а также total cfDNA и fetal cfDNA в плазме крови матери при ПЭ для выявления возможных причин и механизмов развития ПЭ.

2.2 Материалы и методы

Было собрано 19 образцов плазмы от женщин с ПЭ (из них 15 с умеренной и 4 с тяжелой ПЭ, и 18 образцов плазмы от женщин, контрольной группы, в Научном центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова Минздрава РФ. Исследование было одобрено этическим комитетом, всеми пациентками было подписано информированное согласие на участие в данном исследовании. Забор переферической крови осуществляли до начала развития родовой деятельности.

Определение концентрации цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFNγ и TNFα в плазме периферической крови проводили мультиплексным методом с использованием стандартной 8-плексной тест-системы Bio-Plex Pro Human Cytokine 8-plex Assay (Bio-Rad, США) на проточном лазерном иммуноанализаторе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США). Результаты обрабатывали с помощью приложения Bio-Plex Manager 6,0 Properties (Bio-Rad, США). Содержание интерлейкинов представлено в пг/мл.

Для количественного определения total cfDNA и fetal cfDNA было собрано по пять мл периферической крови беременных женщин в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА, и обработаны в течение часа после забора. Плазма была выделена центрифугированием в два этапа при 4°C: первый - 10 мин, 200 g, второй - 10 мин, 4500 g. Образцы плазмы хранили при температуре -80°C. В данной работе уровень total cfDNA был оценен количественным ПЦР-анализом путем определения концентрации промотора гена *RASSF1A*. Оценка уровня fetal cfDNA основана на данных о том, что в геноме плода промотор гена *RASSF1A* гиперметилирован [6], и, соответственно, концентрация его гиперметилированной части в крови матери будет соответствовать количеству геномных единиц fetal cfDNA. Total cfDNA выделяли из 1000 мкл плазмы с использованием магнитных частиц (Силекс, Россия) согласно рекомендациям изготовителя. Полученную ДНК переосаждали этанолом с соосадителем Satellite Red (Евроген, Россия) с предварительной очисткой хлороформом, далее разводили в 13 мкл воды. 10 мкл раствора ДНК использовали в реакции метилчувствительной рестрикции, для выделения гиперметилированного промотора гена *RASSF1A*. Были использованы ферменты HhaI (NEB, England) 30 единиц активности (E), HpaII (NEB, England) 30 E, BstUI (NEB, England) 60 E. Реакцию рестрикции проводили в два этапа: 2 ч при 37°C и 6 ч при 60°C. После чего ДНК осаждали этанолом, с предварительным удалением рестриктаз с помощью хлороформа. Полученную ДНК растворяли в 10 мкл воды. 2 мкл полученного раствора использовали в реакции ПЦР для контроля рестрикции с праймерами к гену *ACTB*. В случае отсутствии ответа оставшийся раствор ДНК использовали в реакции ПЦР с праймерами к *RASSF1A*. ПЦР-анализ проводили одновременно с пятью различными концентрациями стандарта ДНК, который изготовили из ДНК, выделенной из крови, с использованием магнитных частиц (Силекс, Россия). Концентрацию стандарта ДНК определили с помощью спектрофотометра (DeNovix, USA). Для проведения ПЦР использовали амплификатор CFX96 (BioRad, USA). Программа ПЦР: 95°C - 3 мин, 45

циклов: 95°C 10 с, 60°C, 30 с 72°C. Последовательности праймеров и зондов представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 - Последовательности праймеров и зондов

Ген	Последовательность	Праймер/Зонд
RASSF1A	CCGTGGCCACCGCTTCC	Прямой праймер
	CGCACGACGCCCCAGATG	Обратный праймер
	(R6G)GGGCCCGCCACGCACACG(BHQ2)	Зонд
ACTB	GCAAAGGCGAGGCTCTGT	Прямой праймер
	CGTTCCGAAAGTTGCTTTTATGG	Обратный праймер
	(FAM)ACCGCCGAGACCGCGTC(MGB)	Зонд
SRY	TGGCGATTAAGTCAAATTCGC	Прямой праймер
	CCCCCTAGTACCCTGACAATGTATT	Обратный праймер
	(FAM)AGCAGTAGAGCAGTCAGGGAGGCAGA(RTQ1)	Зонд

Для подтверждения валидности метода, используемого для определения концентрации fetal cfDNA, была набрана дополнительная группа – 19 женщин без уточненного диагноза на третьем триместре беременности с мужскими плодами и проведено исследование корреляции концентраций гиперметилированной части промотора *RASSF1A* и *SRY*, гена Y хромосомы в плазме крови. Было установлено, что концентрация *RASSF1A* после обработки рестриктазами коррелирует с концентрацией *SRY* плазме матери (r_s = 0.891; p<0,0001; корреляция Спирмена) (рисунок 2.1).

Анализ значимости различий между группой преэкламсия и контрольной группой проведен с использованием двухстороннего теста Манна-Уитни. Данные представлены в виде медианы (M), 1 и 3 квартилей (25%, 75%). Для изучения взаимосвязи между исследуемыми факторами использовали метод ранговой корреляции Спирмена. Результаты представлены в виде коррелограмм. Достоверными различия считались при p<0,05. Статистический анализ, построение коррелограмм и графиков выполнены в среде R версии 3.3.3 с использованием библиотек ggplot2, pROC и corrplot (RFoundationforStatisticalComputing, Vienna, Austria).

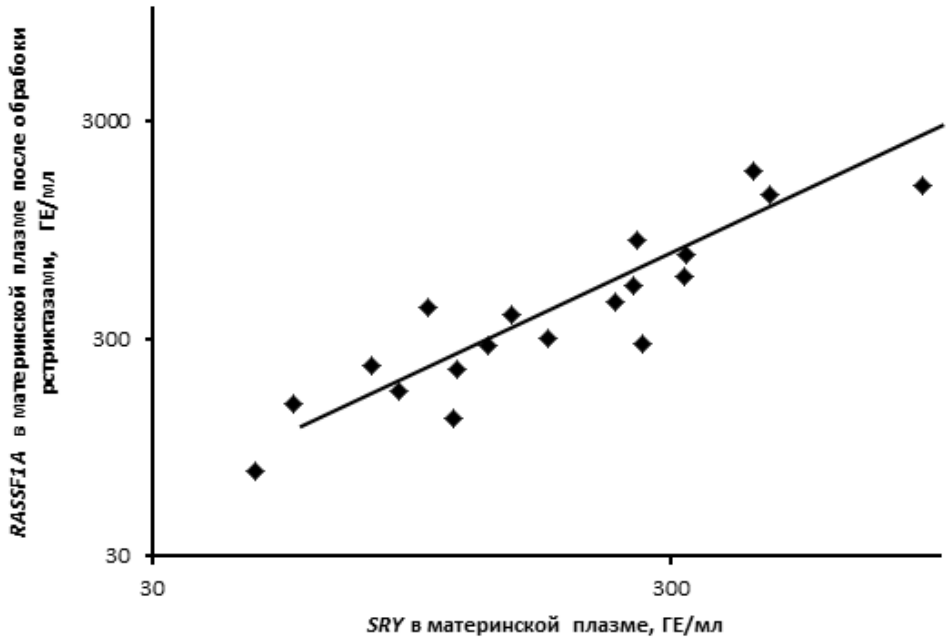

Рисунок 2.1 - Корреляция концентраций гиперметилированной части промотора *RASSF1A* и *SRY* в плазме матери в третьем триместре беременности женщин с мужскими плодами (r_s = 0.891; p<0,0001; корреляция Спирмена). Оси в логарифмическом масштабе. Количество fetal cfDNA и *SRY* в плазме крови женщин указано в геномных единицах на мл (ГЕ/мл).

2.3 Результаты и обсуждение

Основные клинические характеристики женщин включенных в исследование представлены в таблице 2.2.

Таблица 2.2 - Основные клинические характеристики женщин группы норма и преэклампсия

Параметры	Группа Норма (n=20)	Группа ПЭ (n=20)	p
Средний возраст, лет	29±4.36	30±4.62	0.22
ИМТ, кг/м^2	26.24±3.6	30.27±6.33	0.02
САДсут, мм рт. ст.	118±9.2	141.42±8.64	0.001
ДАДсут, мм рт. ст.	76±5.72	88.57±5.34	0.001
Протеинурия сут, г/л	Отсутвует/<0,3	0.75±0.93	0.03
Гестационный срок при родоразрешении, нед.	39.22±1.32	35.85±3.95	0.002
Вес ребенка при рождении, г	3352.94±386.23	2627.27±1011.68	0.02

Примечание: Оценка достоверности разницы двух средних показателей проведен с помощью t-критерия Стьюдента, достоверность результатов учитывалась при значении p< 0,05. Данные представлены в виде M±m, где M – среднее арифметическое, m – стандартное отклонение.

Средний возраст в исследуемых группах был примерно одинаковым (29±4.36 лет для группы Норма и 30±4.62 лет для группы ПЭ). ИМТ в группе ПЭ был выше 30.27±6.33 кг/м^2, по сравнению с контрольной группой - 26.24±3.6 кг/м^2 (p=0.22). Артериальная гипертензия и протеинурия в группе ПЭ (САД-141.42±8.64 и ДАД-88.57±5.34 мм рт.ст; протинурия-0.75±0.93 г/л) были достоверно выше по сравнению с контрольной группой (САД-118±9.2, ДАД-76±5.72 мм рт.ст; протеинурия <0,3 г/л). Гестационный возраст на момент родов в группе ПЭ составлял 35.85±3.95 недель, что соответственно отражалось на весе ребенка - 2627.27±1011.68 г, по сравнению 39.22±1.32 недель гестации и 3352.94±386.23 г – вес ребенка в контрольной группе.

Было проведено сравнение уровней цитокинов, fetal cfDNA и total cfDNA в плазме крови женщин с ПЭ и контрольной группы (рисунок 2.2). Достоверные различия были обнаружены в уровне fetal cfDNA, total cfDNA, IL-6 и IL-10. В случае ПЭ концентрации fetal cfDNA составила 384 (335; 909) ГЕ/мл, в контрольной группе - 149 (87; 214) ГЕ/мл, ($p=4*10^{-6}$). Концентрация total cfDNA при ПЭ составила 6701 (4530; 9004) ГЕ/мл, в группе контроля - 1522 (926; 1646) ГЕ/мл ($p=3*10^{-9}$). Исследование цитокинов показало, что при ПЭ достоверно повышено значение уровня IL-6 (p=0.046) и IL-10 (p=0.0046). В случае ПЭ концентрация IL-6 составила 1.13 (0.126; 6.13) пкг/мл, в группе контроля - 0.14 (0.12; 0.94). В случае ПЭ концентрация IL-10 составила 2.09 (0.68; 3.80), группы контроля – 0.26 (0.10; 0.82) пг/мл.

Хорошую диагностическую эффективность согласно оценке площади под ROC – кривой показали fetal cfDNA и total cfDNA. Наиболее точным параметром ПЭ оказался уровень total cfDNA, при этом AUC=0.924 (0.83; 1.0), чувствительность составила 89.47%; специфичность - 93.75%, при значении концентрации равным 2873 ГЕ/мл (рисунок 2.3 а). Для fetal cfDNA AUC=0.868(74.7; 99), чувствительность составила 73.68% специфичность - 87.5%, при значении концентрации равным 277 ГЕ/мл (рисунок 2.3 б). Важным наблюдением является то, что у двух женщин с наименьшем значением total cfDNA из группы ПЭ на фоне антикоагулянтной терапии к моменту забора крови основные параметры ПЭ (давление и белок в моче) нормализовались.

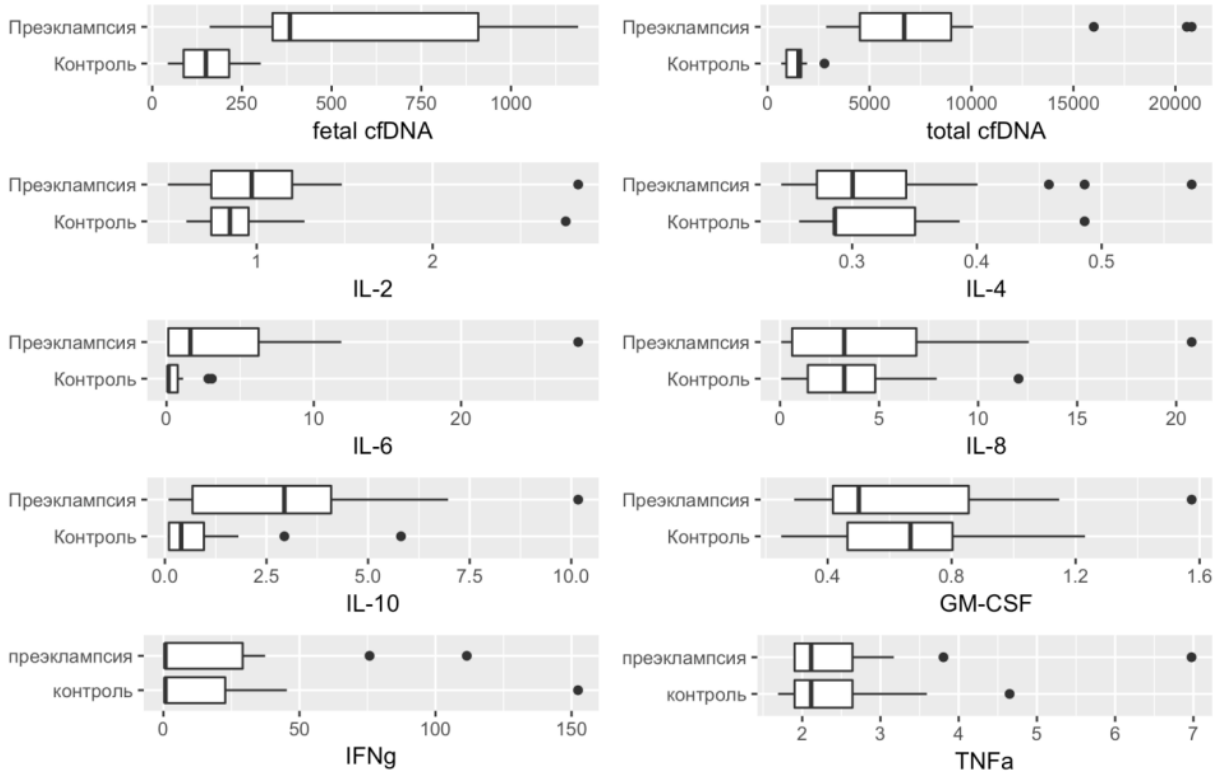

Рисунок 2.2 - Сравнение уровней цитокинов, total cfDNA и fetal cfDNA в плазме крови в группе норма и преэклампсия. Достоверные различия обнаружены в уровне fetal cfDNA , total cfDNA, IL-6 и IL-10. Для IL-2/4/8, GM-CSF, TNFα, IFNγ не обнаружено достоверных различий. Результаты представлены как количество ГЕ/мл для fetal cfDNA и total cfDNA и пг/мл для цитокинов.

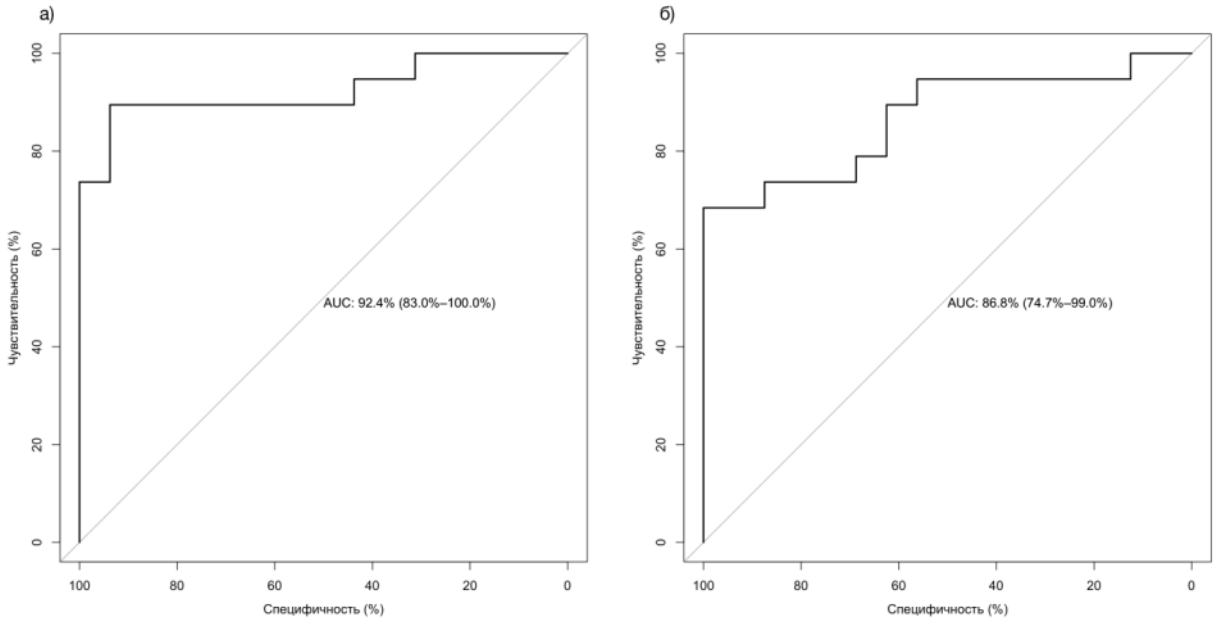

Рисунок 2.3 - Оценка диагностической эффективности total cfDNA и fetal cfDNA в плазме крови с помощью ROC кривых. а) Площадь под ROC кривой для total cfDNA составляет 0.924 (0.83; 1.0), чувствительность 89,47%, специфичность 93,75% при концентрации 2873 ГЕ/мл. б) Площадь под ROC кривой для fetal cfDNA составляет 0,868 (0,74; 0,99), чувствительность 73.68% %, специфичность 87.5% % при концентрации фетальной ДНК 277ГЕ/мл.

Между уровнем fetal cfDNA и total cfDNA наблюдалась высокая корреляция как в группе ПЭ (p=0.000003), так и контрольной группе (p=0.004) (рисунок 2.4). Цитокин IL-6 имел высокую корреляцию с TNFa и INFg (p<0.0001). Уровень IL-6 и IL-10 имели корреляцию и с fetal cfDNA, и total cfDNA (p<0.05). В контрольной группе подобных корреляций не наблюдалось.

а)

	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	GM-CSF	IFNg	TNFa	total cfDNA	fetal cfDNA
IL-2	1									
IL-4	-0.21	1								
IL-6	0.26	-0.02	1							
IL-8	-0.47	0.71	-0.05	1						
IL-10	0.25	0.58	-0.19	0.46	1					
GM-CSF	0.36	0.02	-0.08	0.01	0.45	1				
IFNg	-0.26	0.76	0.13	0.58	0.33	-0.09	1			
TNFa	-0.11	0.66	0.34	0.44	0.23	-0.02	0.9	1		
total cfDNA	-0.3	-0.28	0.17	0.06	-0.16	0.29	-0.04	0.05	1	
fetal cfDNA	0.11	-0.43	0.29	-0.17	-0.12	0.59	-0.19	-0.03	0.82	1

б)

	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	GM-CSF	IFNg	TNFa	total cfDNA	fetal cfDNA
IL-2	1									
IL-4	-0.33	1								
IL-6	-0.04	0.44	1							
IL-8	-0.57	0.59	0.56	1						
IL-10	0.33	0.05	0.34	-0.01	1					
GM-CSF	0.54	-0.63	-0.32	-0.42	0.47	1				
IFNg	-0.16	0.79	0.53	0.61	-0.01	-0.52	1			
TNFa	-0.1	0.62	0.67	0.57	-0.01	-0.46	0.89	1		
total cfDNA	0.37	0.04	0.53	0.05	0.51	0.07	0.02	0.04	1	
fetal cfDNA	0.19	0.2	0.44	0.08	0.51	-0.07	0.08	0.01	0.92	1

Рисунок 2.4 - Корреляционные зависимости fetal cfDNA , total cfDNA и цитокинов между собой в групах контроль и ПЭ. а) В группе норма наблюдается корреляция между уровнем fetal cfDNA и total cfDNA (p=0.004). б) В группе ПЭ наблюдается высокая корреляция между уровнем fetal cfDNA и total cfDNA (p=0.000003), IL-6 с TNFa и INFg (p<0.0001), IL-6 и IL-10 с fetal cfDNA, и total cfDNA (p<0.05).

Поиск наиболее оптимальных маркеров ПЭ является одной из актуальных задач современного акушерства. CfDNA рассматривается перспективным прогностическим маркером более 10 лет [7], однако до сих пор не создано тест-системы для определения ПЭ. Некоторые исследователи отмечают методические сложности как главное препятствие широких исследований. В данной работе мы подробно описали метод для количественного определения total cfDNA и fetal cfDNA основанный на ПЦР-анализе.

В нашей работе мы установили, что более точным диагностическим маркером ПЭ является повышение уровня total cfDNA по сравнению с уровнем fetal cfDNA в крови матери. Подобные результаты ранее были получены Salvianti et al. [8]. Эти данные указывают на то, что причина развития ПЭ наиболее вероятно находится в кровеносной системе матери, и меньше связана с процессами, протекающими в плаценте. Одним из факторов, в результате которого развивается ПЭ, может быть активация эндотелия сосудов, с последующим его

разрушением, что отражается в увеличении уровня total cfDNA. Chen et al. показали, что уменьшение тяжести ранней формы тяжелой ПЭ может быть связано с переходом эндотелиальных клеток из активированного состояния в нормальное [9]. Не ясно, какие факторы приводят к активации и разрушению эндотелия. Предполагается, что данные факторы высвобождаются из плаценты при недостаточной ее инвазии в матку [4, 5]. Но, возможно, причиной активации и последующего разрушения эндотелия сосудов матери при ПЭ является повышенный в 2-3 раза уровень АФК в крови во время беременности [2], а в случае нормы такой активации не происходит, что связано с адаптацией эндотелия сосудов к окислительному стрессу, происходящей во время беременности.

Мы обнаружили высокий уровень корреляции между total cfDNA и fetal cfDNA у женщин с ПЭ. Это позволяет предположить, что клетки плаценты, источник fetal cfDNA в крови матери, возможно, разрушаются под воздействием тех же факторов, что и эндотелий материнских сосудов. Отсутствие повышенных значений total cfDNA у женщин, у которых лечение ПЭ привело к исчезновению симптомов, свидетельствует, о том, что наблюдение за динамикой уровня total cfDNA в процессе лечения ПЭ может быть прогностическим фактором дальнейшего развития ПЭ.

При исследовании цитокинов мы не обнаружили различий в уровнях IFNγ и IL-4 – маркеров активности про- и противовоспалительных лимфоцитов Th1 и Th2. При этом уровень IL-10, который в основном продуцируют моноциты [10] был достоверно повышен в группе ПЭ. Это также подтверждается данными других исследований [11]. Считается, что IL-10 обладает противовоспалительным эффектом, об этом может свидетельствовать его корреляция с IL-4 в контрольной группе. Однако в случае ПЭ наблюдается корреляция IL-10 и GMCSF, фактора способного поляризовать макрофаги в сторону провоспалительного M1-фенотипа. Известно, что в момент апоптоза макрофаги выделяют значительное количество IL-10 [12]. При этом апоптоз макрофагов может быть непосредственно связан с cfDNA. Choi et al. [13]. установили, что без макрофагов некротические или апоптотические клетки практически не высвобождают cfDNA. Однако при взаимодействии с некротическими или апоптотическими клетками макрофаги сами могут подвергаются апоптозу, что, может является причиной появления cfDNA [13]. Обнаруженная нами корреляция уровня IL-10 как с total cfDNA, так и с fetal cfDNA при ПЭ указывает на возможную роль макрофагов в разрушении и эндотелия сосудов, и клеток трофобласта плаценты. Известно, что уровень IL-10 снижается в процессе беременности примерно в три раза [11], что возможно связано с

возникновением иммунной толерантности к плоду, выраженной в снижении способности макрофагов к апоптозу. Таким образом, повышенный уровень IL-10 при ПЭ может отражать формирование недостаточной иммунной толерантности. Полученные нами результаты, о том, что IL-6 повышен при ПЭ, также подтверждаются другими исследователями [14]. Высокая корреляция IL-6 и IFNγ, фактора поляризующего макрофаги в сторону M1-фенотипа, а также TNFα, фактора продуцируемого макрофагами M1-фенотипа, указывает на связь IL-6 и активности провоспалительных макрофагов. IL-6, как и IL-10, коррелировал и с уровнем total cfDNA и с уровнем fetal cfDNA. В контрольной группе подобных корреляций не наблюдалось [15, 16, 17].

2.4 Заключение

Таким образом, на основании данной работы, можно сделать предположение, что причиной развития ПЭ может быть разрушение эндотелия материнских сосудов и клеток трофобласта плаценты при повышенной активности провоспалительных макрофагов.

2.5 Список использованных источников

1 Gleicher N., Kushnir V.A., Barad D.H. Redirecting reproductive immunology research toward pregnancy as a period of temporary immune tolerance//J Assist Reprod Genet. - 2017. - Vol. 34. - P. 425 - 430.

2 Красный А.М., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Ховхаева П.А., Волгина Н.Е., Сергунина О.А., Тютюнник Н.В., Беднягин Л.А. Окислительный стресс при преэклампсии и при нормальной беременности//Акушерство и гинекология. - 2016. -No5. - С. 90-95.

3 Roberts J.M., Taylor R.N., Goldfien A. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia//Am J Hypertens. - 1991. - Vol. 4, No 8. - P. 700-708.

4 Redman C.W., Sargent I.L. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response//Placenta . - 2003. - No 24. - P.21-27.

5 Powe C.E., Levine R.J., Karumanchi S.A. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease//Circulation. - 2011. - Vol. 123, No 24. - P. 2856-2869.

6 Chan K.C., Ding C., Gerovassili A., Yeung S.W., Chiu R.W., Leung T.N., Lau T.K., Chim S.S., Chung G.T., Nicolaides K.H., Lo Y.M. Hypermethylated *RASSF1A* in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis//Clin Chem. - 2006. - Vol. 52, No 12. - P. 2211-2218.

7 Грачева М.И., Кан Н.Е., Красный А.М. Роль внеклеточной фетальной ДНК в ранней диагностике осложнений беременности//Акушерство и гинекология. -2016. - No10. - С. 5-10.

8 Salvianti F., Inversetti A., Smid M., Valsecchi L., Candiani M., Pazzagli M., Cremonesi L., Ferrari M., Pinzani P, Galbiati S. Prospective evaluation of *RASSF1A* cell-free DNA as a biomarker of pre-eclampsia//Placenta. - 2015. - Vol. 36, No 9.- P. 996-1001.

9 Chen Q., Sousa J.D., Snowise S., Chamley L., Stone P. Reduction in the severity of early onset severe preeclampsia during gestation may be associated with changes in endothelial cell activation: A pathological case report//Hypertens Pregnancy. -2016. - Vol. 35, No 1. - C. 32-41.

10 Pilette C., Detry B., Guisset A., Gabriels J., Sibille Y. Induction of interleukin-10 expression through Fcα receptor in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells: role of p38 MAPKinase//Immunol Cell Biol. -2010.- Vol. 88, No 4. - P. 486-493.

11 Szarka A., Rigó J. Jr., Lázár L., Beko G., Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array//BMC Immunol. -2010. - No 11.- P. 59-68.

12 Bzowska M, Guzik K, Barczyk K, Ernst M, Flad HD, Pryjma J. Increased IL-10 production during spontaneous apoptosis of monocytes//Eur J Immunol. -2002. - Vol. 32, No 7. - C. 2011- 2020.

13 Choi J. J., Reich C. F., Pisetsky D. S. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells//Immunology. -2005. - Vol. 115, No 1. - C. 55-62.

14 Wang Y., Lewis D.F., Gu Y., Zhao S., Groome L.J. Elevated maternal soluble Gp130 and IL-6 levels and reduced Gp130 and SOCS-3 expressions in women complicated with preeclampsia//Hypertension. - 2011. - Vol. 57, No 2. - P. 336-342.

15 Krasnyi A.M.,Gracheva M.I., Sadekova A.A., Vtorushina V.V., Balashov I.S., Kan N.E., Borovikov P.I., Krechetova L.V., Tyutyunnik V.L. Complex Analysis of Total and Fetal DNA and Cytokines in Blood Plasma of Pregnant Women with Preeclampsia // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2018. P. 721-725. DOI: 10.1007/s10517-018-4066-1. (WoS, Scopus)

16 Karapetyan A.O., Baev O.R., Krasnyi A.M., Sadekova A.A., Mullabaeva S.M. Extracellular DNA in the Dynamics of Uncomplicated Pregnancy // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2018. DOI: 10.1007/s10517-018-4295-3. (WoS, Scopus).

17 Krasnyi A.M., Khachaturyan A.A., Kan N.E., Khachatryan Z.V., Tyutyunnik V.L., Volgina N.E., Ganichkina M.B., Mantrova D.A., Sadekova A.A. The role e-kadherin in the

formation of intrauterine growth restriction // Akusherstvo i Ginekologiya (Russian Federation). 2018. V. 6. P. 38-43. DOI: 10.18565/aig.2018.6.38-43). (Scopus).- Красный А.М., Хачатурян А.А., Кан Н.Е., Хачатрян З.В., Тютюнник В.Л., Волгина Н.Е., Ганичкина М.Б., Мантрова Д.А., Садекова А.А. Ролье-кадгерина в формировании задержки роста плода//Акушерство и гинекология. 2018. № 6. С. 38-43. DOI: 10.18565/AIG.2018.6.38-43.

РАЗДЕЛ 3. МЕДИАТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГАМЕТОГЕНЕЗА И РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА

3.1 Введение

Моноаминергические трансмиттеры являются универсальными сигнальными молекулами, контролирующими процессы развития [1, 2]. Среди них выделяется серотонин, как обладающий наибольшим числом описанных функций вне нервной системы – как в эмбриональном развитии, так и во взрослых организмах. Одной из универсальных в животном мире функций серотонина является регуляция женской репродуктивной функции на всех ее этапах. Серотонин в физиологических концентрациях определяется в яичниках млекопитающих, в частности, в ооцитах, клетках кумулюса [3], в фолликулярной жидкости [4]. Известно, что основным источником катехоламинов в яичнике являются терминали иннервирующих его вегетативных ганглиев [5], тогда как источником серотонина предполагается прежде всего кровь, а также, на основании экспрессии триптофангидроксилазы, синтез в самом яичнике [6]. На различных моделях показано, что серотонин обладает стимулирующим действием на функцию фолликулярных клеток. Наряду с непосредственным влиянием овариального серотонина на функцию фолликулярных клеток и процесс созревания ооцита, существуют его отложенные эффекты, проявляющиеся в дальнейшем эмбриональном и постэмбриональном развитии. Установление конкретных молекулярных механизмов влияния серотонина на фолликулогенез является крайне важным для оценки его роли как регулятора репродуктивной функции. В ряде работ показана экспрессия отдельных компонентов серотонинергической системы в доимплантационном развитии [3, 7-11]. В совокупности с результатами, полученными на амфибиях [12] и птицах [13], об одновременной экспрессии сразу нескольких типов серотониновых рецепторов в период раннего развития представляла интерес аналогичная ситуация в эмбриогенезе млекопитающих. В то же время, данных о серотонинергической системе в развивающемся овариальном фолликуле фактически нет, так как большая часть работ выполнена на ооцит-кумулюсных комплексах [3, 9]. С целью решения этих вопросов и для устранения имеющихся пробелов, нами были выполнены полный обзор экспрессии мРНК всех компонентов серотонинергической системы в фолликулярных клетках гранулезы, кумулюса и желтого тела, а также ооцитах, дробящихся эмбрионах и бластоцистах мыши, функциональный анализ активности систем синтеза и захвата серотонина в яичнике

млекопитающих и эксперименты по выявлению влияния серотонина на экспрессию ключевых маркерных генов, отражающих физиологическое состояние яичника.

3.2 Материал и методы

Яичники мыши выделяли и препарировали в среде L-15 (Sigma-Aldrich, США) под контролем стереомикроскопа. Клетки гранулезы получали из стенки антральных фолликулов посредством пункции тонкой иглой. Клетки желтого тела изолировали микрохирургически из яичников беременных самок (12,5 сут). Ооцит-кумулюсные комплексы выделяли из ампул яйцеводов через 0,5 сут после спаривания с вазэктомированными самцами и обрабатывали раствором гиалуронидазы (Sigma-Aldrich, США), после чего отбирали зрелые MII ооциты, а клетки кумулюса осаждали центрифугированием. Дробящиеся эмбрионы на стадии 4-8 клеток получали через 2-2,5 сут после спаривания путем диссекции яйцеводов. Бластоцисты вымывали из рогов матки через 4,5 сут после спаривания [14]. Фрагменты овариальной кортикальной ткани человека были получены из Медицинского радиологического научного центра Министерства здравоохранения Российской Федерации и разделены на две группы – интактные, из которых РНК выделяли сразу, и витрифицированные, которые подверглись процедурам криоконсервации, замораживания и оттаивания [15].

РНК из клеток и эмбрионов мыши выделяли с использованием TRI Reagent (Sigma, США). Тотальную РНК из образцов овариальной ткани человека выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Концентрацию общей РНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop1000 (Thermo Scientific, США) с контролем качества по A260/280. После обработки ДНКазой I (Fermentas, США) 1 мкг РНК использовали для синтеза кДНК с помощью набора реактивов «MMLV RT kit» (Евроген, Россия).

ПЦР проводили на амплификаторе T100 (BIO RAD, США) с использованием готовой смеси для ПЦР «ScreenMix-HS» (Евроген, Россия). Анализ продуктов проводили с помощью агарозного гель-электрофореза и системы видеорегистрации «Взгляд» (Хеликон, Россия). Специфические олигонуклеотиды для проведения двух раундов «гнездовой» ПЦР подбирали с помощью сервиса NCBI Primer-BLAST с учетом экзон-интронной структуры генов [14].

Количественную ОТ-ПЦР в реальном времени проводили на системе StepOnePlus (AppliedBioSystems, США) с использованием набора SYBR® greenI с ROX в качестве внутреннего стандарта. Для абсолютной количественной оценки экспрессии референсных генов использовалась рекомбинантная плазмидная ДНК в качестве внешних стандартов.

Стабильность экспрессии референсных генов была оценена тремя распространенными программами: geNormv.3.5 [16], Bestkeeper [17] и NormFinder [18].

Для иммуногистохимического исследования яичники фиксировали в 4% параформальдегиде, после чего получали криосрезы толщиной 10 мкм. Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов проводили поликлональными антителами кролика против серотонина (AB938 Milipore), декарбоксилазы Ddc (HPA017742 Sigma) или против Sert (ab174770 Abcam), и вторичными антителами козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с красным флуорофором Alexa Fluor® 568 (ab175694 Abcam). Препараты просматривали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica SP5.

3.3 Результаты и обсуждение

В 2018 году завершено и опубликовано [14] ОТ-ПЦР исследование экспрессии всех основных компонентов серотонинергической сигнальной системы в ооцитах и преимплантационных эмбрионах мыши (рисунок 2.1). Исследование экспрессии мРНК ферментов синтеза серотонина в ооцитах и доимплантационных эмбрионах показало, что триптофангидроксилаза Tph2 экспрессируется в ооцитах и исчезает к дроблению, тогда как декарбоксилаза Ddc появляется только на стадии бластоцисты. Исходя из этого, следует полагать, что в ходе преимплантационного развития мыши синтез серотонина становится возможен только к стадии бластоцисты, при условии сохранения активности Tph2 на этой стадии. Мембранный транспортер серотонина Sert экспрессируется в ооцитах и дробящихся эмбрионах, но исчезает к стадии бластоцисты. По всей вероятности, экспрессия транспортера серотонина несколько снижается к концу доимплантационного развития, на что косвенно указывает также продемонстрированное французскими исследователями уменьшение интенсивности иммуноокрашивания Sert в бластоцистах, по сравнению с дроблением [3]. Наряду с мембранным транспортером серотонина, в ходе доимплантационного развития выявляется экспрессия везикулярных транспортеров моноаминов, необходимых для осуществления межклеточной сигнальной функции, а также основного фермента деградации серотонина моноамиоксидазы Maoa.

ОТ-ПЦР анализ показал, что в ооцитах экспрессируется мРНК трех серотониновых рецепторов, причем Htr7 и канальный Htr3a исчезают к дроблению, тогда как Htr5b экспрессируется в течение всего доимплантационного развития. Интересно, что на стадии делений дробления наблюдается транзиторная экспрессия мРНК шести других рецепторов серотонина.

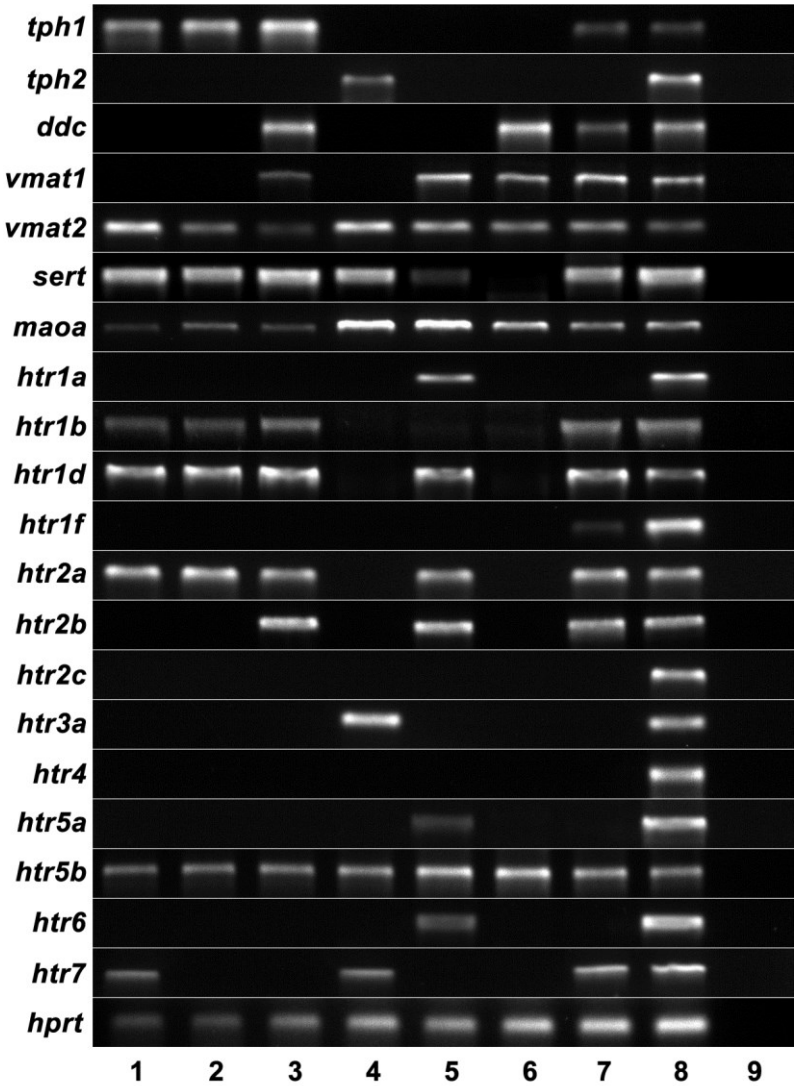

Рисунок 3.1 - ОТ-ПЦР анализ экспрессии компонентов серотонинергической системы в фолликулогенезе и раннем эмбриогенезе мыши. 1 – клетки гранулезы стенки антрального фолликула; 2 – клетки постовуляторного кумулюса; 3 – желтое тело беременности (12,5 сут); 4 – зрелые MII ооциты; 5 – 4-8-клеточные эмбрионы (2-2,5 сут); 6 – бластоцисты (4,5 сут); 7 – яичник; 8 – 18-дневный зародыш; 9 – отрицательный контроль (ПЦР без матрицы).

Стоит отметить, что из выявленной экспрессии мРНК не следует экспрессия на уровне белка, и вопрос о функциональной активности этих рецепторов требует дальнейшего исследования.Однако полученный результат является хорошей иллюстрацией периода вариабельности, наблюдающегося в доимплантационном развитии млекопитающих и характеризующегося временной избыточной и стохастической экспрессией разных генов в различных клетках раннего эмбриона [19]. Данные об одновременной экспрессии мРНК серотониновых рецепторов нескольких типов в фолликулогенезе и раннем эмбриогенезе млекопитающих, показанной в данной работе, и аналогичные данные на зародышах амфибий

и птиц [12, 13] позволяют предположить существование нетривиального механизма, при котором к одному и тому же трансмиттеру в клетке, присутствуют рецепторы более чем одного типа, способные одновременно активировать разные сигнальные пути и, таким образом, реализовывать различные функции [20]. Так, например, в бластомерах морских ежей серотонин одновременно вовлечен в регуляцию клеточного цикла [21], жесткости кортикального цитоскелета [22], адгезии бластомеров [23] и прямых межклеточных взаимодействий [24]. Кроме того, серотонин вероятно может служить субстратом для синтеза мелатонина. Экспрессия ферментов синтеза мелатонина и его функциональная активность показана в ооцитах и преимплантационных эмбрионах крыс и свиней [25, 26]. Возможность одновременной экспрессии мРНК целого ряда серотониновых рецепторов в раннем развитии млекопитающих подкрепляется аналогичными данными о дофаминовых и адренергических рецепторах в эмбриогенезе у млекопитающих [27].

Проведено исследование экспрессии генов компонентов серотонинергической сигнальной системы в фолликулярных клетках, полученных на разных стадиях фолликулогенеза. Профили экспрессии ряда генов отличаются в клетках стенки фолликула и кумулюсе [28], однако экспрессия компонентов серотонинергической системы (за исключением Htr7) в этих субпопуляциях фолликулярных клеток совпадает. Так, экспрессия мРНК генов ферментов триптофангидроксилазы Tph1 и моноаминоксидазы Maoa, транспортеров Vmat2 и Sert, рецепторов Htr1b, Htr1d, Htr2a и Htr5b выявляется как в клетках гранулезы и кумулюса, так и в желтом теле. Транскрипты генов фермента синтеза декарбоксилазы ароматических аминокислот Ddc, везикулярного транспортера Vmat1 и рецептора Htr2b не выявляются в клетках гранулезы и кумулюса, но появляются в желтом теле. Рецептор Htr7 экспрессируется в клетках гранулезы, но не выявляется в кумулюсе и желтом теле. Гены *Tph2, Htr1a, Htr1f, Htr2c, Htr3a, Htr4, Htr5a* и *Htr6* не экспрессируются в исследованных пробах фолликулярных клеток.

Система деградации серотонина в фолликулярных клетках представлена экспрессией мРНК моноаминоксидазы А. В то же время, как свидетельствуют полученные нами результаты, собственный синтез серотонина в них невозможен. Как в клетках гранулезы, так и в кумулюсе экспрессируется только триптофангидроксилаза Tph1, осуществляющая синтез 5-гидрокситриптофана, но не экспрессируется декарбоксилаза Ddc, необходимая для синтеза серотонина. В то же время в фолликулярных клетках выявляется экспрессия мембранного транспортера Sert, который осуществляет захват серотонина из внешней среды. Активность

системы захвата серотонина и отсутствие его синтеза показаны нами invivo на изолированных преантральных фолликулах [29] и на овариальной ткани [30]. При инкубации фолликулов с биохимическим предшественником серотонина HTP накопления трансмиттера не происходило, тогда как при инкубации овариальных фолликулов с серотонином мы зарегистрировали его накопление в ооцитах, а в фолликулярных клетках накопления серотонина не зафиксировали. Предварительная обработка овариальных фолликулов селективным ингибитором обратного захвата серотонина флуоксетином предотвращала накопление серотонина в ооцитах. Учитывая, что кровь является основным пулом периферического серотонина в организме, его мембранный транспорт может играть важную роль в реализации регуляторных функций в яичнике. Наряду с этим экспрессирующийся в клетках гранулезы везикулярный транспортер Vmat2 способен осуществлять накопление серотонина и других моноаминов в секреторных гранулах, что необходимо для реализации межклеточной сигнализации. Существуют данные о негативном влиянии ингибиторов обратного захвата серотонина на функции яичника у Danio [31] и крыс [32], а способность захвата серотонина из внешней среды показана на клетках кумулюса мыши [3]. Следует предполагать, что нормальное функционирование данной сигнальной системы определяется серотонином, экзогенным по отношению к фолликулярным клеткам. Интересно, что отсутствие синтеза и активность мембранного и везикулярного транспорта в клетках гранулезы показаны на крысах для других моноаминергических регуляторов функции яичника, катехоламинов [33].

Из множества рецепторов серотонина мРНК пяти – Htr1b, Htr1d, Htr2a, Htr5b и Htr7 – одновременно детектируются в гранулезе. Клетки кумулюса экспрессируют те же типы рецепторов, за исключением Htr7. Все эти рецепторы серотонина являются метаботропными семидоменными рецепторами, сопряжеными с разными системами вторичных мессенджеров и могут опосредовать различные пути серотонинергической регуляции. На преовуляторных фолликулах крысы, культивируемых *in vitro*, было показано, что серотонин стимулирует синтез эстрадиола, а специфические антагонисты серотониновых рецепторов 2 типа устраняют этот эффект [34]. В аналогичных экспериментах на хомячках была продемонстрирована активность серотониновых рецепторов 1 типа [35]. Для того чтобы установить роль каждого из экспрессирующихся рецепторов серотонина в регуляции функций клеток гранулезы мыши, требуются дальнейшие исследования.

Оценка физиологического состояния компонентов яичника по уровню экспрессии маркерных генов методом ПЦР в реальном времени является перспективным методическим подходом. Проведена работа по подбору референсных генов, стабильно экспрессирующихся в ткани яичника при экспериментальных воздействиях [15] с применением трех наиболее широко используемых математических алгоритмов. GeNorm, который использует попарное вычисление корреляции и ранжирует по остаточному принципу, определил гены TBP, HPRT, GAPDH и PPIA как наиболее стабильные.BestKeeper, который оценивает коэффициент корреляции каждого отдельного гена с геометрическим средним для всех генов, определил гены RPL4, RPS18, RPLP0 и HSP90AB1 как наиболее стабильные референсы.NormFinder, который оценивает межгрупповую вариабельность экспрессии, определил гены RPLP0, RPS18 и HSP90AB1 как наиболее стабильные. В результате корреляционного анализа (рисунок 2.2) получены интересные данные.

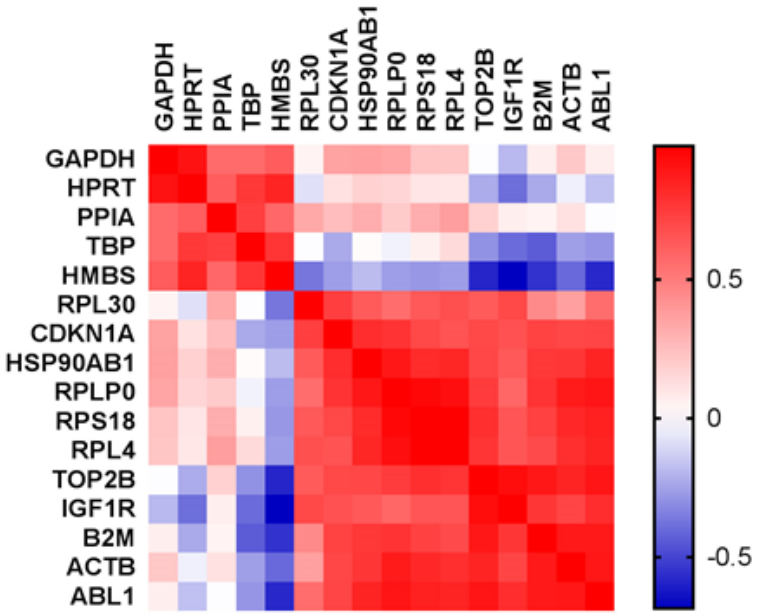

Рисунок 3.2 - Корреляционная матрица, рассчитанная для экспрессии кандидатныхреференсных генов в ткани яичника человека, подвергнутой процедурам криоконсервации и оттаивания. Красный цвет указывает на то, что экспрессия двух генов имеет положительную корреляцию; синий – отрицательную. Гены домашнего хозяйства кластеризуются в две группы, по-разному реагирующие на экспериментальное воздействие.

Выявлено, что исследуемые гены делятся на две группы– в первой уровень экспрессии генов не изменяется при экспериментальном воздействии, тогда как во второй, более обширной, количество копий мРНК уменьшается. К первой группе относятся популярные референсные гены TBP, GAPDH и HPRT, которые демонстрируют наименьшую

вариабельность при нормировке на тотальную РНК, но согласно анализу методами BestKeeper и NormFinder, не являются наиболее стабильными референсами. Ко второй группе относятся гены RPL4, RPLP0 и RPS18, которые, напротив, стабильно экспрессируются в пробах яичника, в то же время, демонстрируя уменьшение абсолютного количества при нормировке на тотальную РНК. На основе полученных данных, можно рекомендовать использовать гены рибосомальных белков в качестве референсных при работе с овариальной тканью.

Для подтверждения гипотезы о модуляторном эффекте серотонина на функциональную активность фолликулярных клеток, было выполнено экспериментальное исследование влияния серотонина на уровень экспрессии генов-маркеров функционального состояния ооцитов и фолликулярных клеток. В эксперименте фрагменты яичника инкубировали в присутствии серотонина (1 мкМ) в течение 48 ч, после чего выделяли РНК и проводили количественный анализ экспрессии методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Получены предварительные результаты, согласно которым в ткани яичника под действием серотонина увеличивается экспрессия ряда генов, являющихся маркерами функционального состояния ооцитов и клеток гранулезы. Так, достоверно повышается экспрессия CPEB-зависимых ооцитарных генов Smad5, Spin1, Dnmt1o и TiParp, а также ростового фактора Gdf9, который синтезируется в ооците и играет ключевую роль в регуляции фолликулярного роста. Среди маркеров функциональной активности клеток гранулезы под действием серотонина увеличивается экспрессия генов Igfbp4, Has2, Ptgs2, Ihh. Неожиданным стало отсутствие изменений в уровне экспрессии генов рецепторов гонадотропных рецепторов Fshr и Lhr, стероидогенных ферментов Cyp11a1, Cyp17a1 и Cyp19a1 и регулятора стероидогенеза Star. Отсутствует также эффект серотонина на маркеры пролиферации Pcna и Ki67, однако в экспериментальных группах достоверно повышается экспрессия циклинов Ccnd1, Ccnd2 и Ccne1, что может свидетельствовать о модуляторном эффекте трансмиттера на процесс пролиферации. Были проанализированы также гены-маркеры апоптоза Bad, Bax, Bcl2, Casp3 и p53, однако их уровень экспрессии под действием серотонина не изменился. С целью выявить прямые эффекты серотонина на фолликулярные клетки, проведена и опубликована [36] аналогичная работа на первичной культуре гранулезы. Среди всех исследуемых генов на данной модели достоверно увеличивается экспрессия только трех генов – Has2, Ihh и Ccnd1 (рисунок 2.3). Полученные результаты явно указывают на наличие опосредованного действия серотонина на функциональную активность фолликулярных клеток, по всей вероятности

через влияние на ооцит. Для проверки этой гипотезы требуется провести дальнейшие исследования.

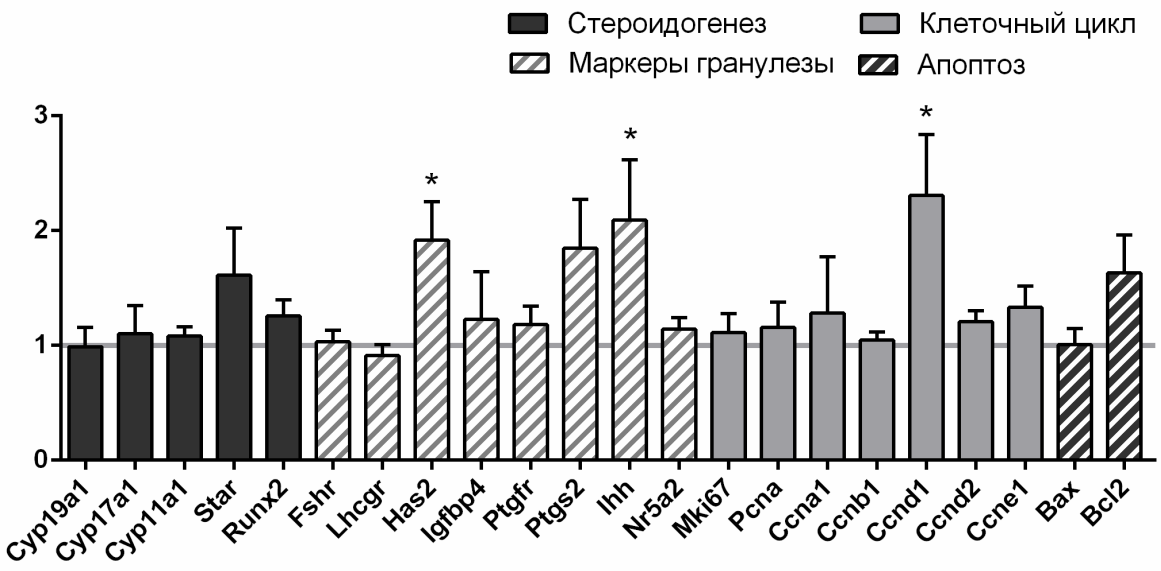

Рисунок 3.3 - Относительный уровень экспрессии генов-маркеров функционального состояния гранулезы в клетках, культивируемых 48 ч в присутствии 1 мкМ серотонина. Относительную экспрессию генов рассчитывали методом ddCt с нормировкой на ген *Hprt*, экспрессия в контроле принята за 1. M±SEM. * $p < 0.05$ по t-критерию Вилкоксона.

3.4 Заключение

Таким образом, проведено полное исследование экспрессии компонентов серотонинергической системы в раннем эмбриональном развитии и в оогенезе. Полученные результаты показывают, что серотонинергическая система постоянно в той или иной форме присутствует на всех стадиях фолликулогенеза, оогенеза и последующего эмбриогенеза, выполняя одновременно и (или) последовательно целый ряд функций, конкретные детали реализации которых требуют дальнейшего глубокого изучения. На основе молекулярно-биологических и экспериментальных данных, можно заключить, что важную роль в регуляции созревания ооцитов и раннего эмбрионального развития млекопитающих играет специфический мембранный транспортер серотонина Sert. Проведенное методическое исследование стабильности экспрессии генов домашнего хозяйства позволяет сделать вывод, что для овариальной ткани наиболее стабильными референсными генами, рекомендуемыми к использованию для анализа методом ПЦР в реальном времени, являются гены рибосомальных белков RPL4 и RPLP0 и RPS18. В ходе работы получены предварительные результаты, свидетельствующие о влиянии серотонина на экспрессию специфических генов в

яичнике. Полученные результаты свидетельствуют об опосредованном влиянии серотонина на функцию фолликулярных клеток через воздействие на ооцит.

3.5 Список использованных источников

1 Бузников Г.А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. - М.: Наука, 1967.

2 Бузников Г.А. Донервные трансмиттеры как регуляторы эмбриогенеза. Современное состояние проблемы//Онтогенез. - 2007. - Vol. 38, No. 4. P. 262 - 270.

3 Amireault P., Dubé F. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos//Biology of Reproduction. - 2005. - Vol. 73, No. 2. P. 358 - 365.

4 Bòdis J., Bognàr Z., Hartmann G., Török A., Csaba I.F. Measurement of noradrenaline, dopamine and serotonin contents in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment//Gynecologic and Obstetric Investigation. - 1992. - Vol. 33, No. 3. P. 165 - 167.

5 Mayerhofer A., Smith G.D., Danilchik M., Levine J.E., Wolf D.P., Dissen G.A., Ojeda S.R. Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop//Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States. - 1998. - Vol. 95, No. 18. P. 10990 - 10995.

6 Dubé F., Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos//Life Sciences. - 2007. - Vol. 81, No. 25. - 26. P. 1627 - 1637.

7 Veselá J., Rehák P., Mihalik J., Czikková S., Pokorný J., Koppel J. Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos//Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca. - 2003. - Vol. 52, No. 2. P. 223 - 228.

8 Il'ková G., Rehák P., Veselá J., Cikos S., Fabian D., Czikková S., Koppel J. Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development//Zygote (Cambridge, England). - 2004. - Vol. 12, No. 3. P. 205 - 213.

9 Amireault P., Dubé F. Intracellular cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse cumulus-oocyte complexes//Molecular Pharmacology. - 2005. - Vol. 68, No. 6. P. 1678 - 1687.

10 Hinckley M., Vaccari S., Horner K., Chen R., Conti M. The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes//Developmental Biology. - 2005. - Vol. 287, No. 2. P. 249 - 261.

11 Basu B., Desai R., Balaji J., Chaerkady R., Sriram V., Maiti S., Panicker M.M. Serotonin in pre-implantation mouse embryos is localized to the mitochondria and can modulate mitochondrial potential//Reproduction (Cambridge, England). - 2008. - Vol. 135, No. 5. P. 657 - 669.

12 Nikishin D.A., Kremnyov, S.V., Konduktorova V.V., Shmukler Y.B. Expression of serotonergic system components during early Xenopus embryogenesis//The International Journal of Developmental Biology. - 2012. - Vol. 56, No. 5. P. 385 - 391.

13 Stępińska U., Kuwana T., Olszańska B. Serotonin receptors are selectively expressed in the avian germ cells and early embryos//Zygote (Cambridge, England). - 2015. - Vol. 23, No. 3. P. 394 - 405.

14 Никишин Д.А., Храмова Ю.В., Багаева Т.С., Семенова М.Л., Шмуклер Ю.Б. Экспрессия компонентов серотонинергической системы в фолликулогенезе и доимплантационном развитии мыши//Онтогенез. - 2018. - Vol. 49, No. 3. P. 208 - 216.

15 Nikishin D.A., Filatov M.A., Kiseleva M.V., Bagaeva T.S., Konduktorova V.V., Khramova Y.V., Malinova I.V., Komarova E.V., Semenova M.L. Selection of stable expressed reference genes in native and vitrified/thawed human ovarian tissue for analysis by qRT-PCR and Western blot//Journal of Assisted Reproduction and Genetics. - 2018. - Vol. 35, No. 10. P. 1851 - 1860.

16 Vandesompele J., Preter K., Poppe B., Roy N., Paepe A. Accurate normalization of real-time quantitative RT -PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes//Genome Biology. - 2002. - Vol. 3, No. 7. RESEARCH0034.

17 Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T.P. Determination of stable housekeeping genes , differentially regulated target genes and sample integrity : BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations//Biotechnol Letters. - 2004. - Vol. 26, No. 6. P. 509 - 515.

18 Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data : A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization , Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets//Cancer Research. - 2004. - Vol. 64, No. 15. P. 5245 - 5250.

19 Dietrich J., Hiiragi T. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo//Development. - 2007. - Vol. 134, No. 23. P. 4219 - 4231.

20 Шмуклер Ю.Б., Никишин Д.А. Трансмиттерные системы в эмбриогенезе – современное состояние проблемы//Успехи физиологических наук. - 2018. - Vol. 49, No. 4. P. 81 - 92.

21 Бузников Г.А. Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе. - Москва: Наука, 1987.

22 Григорьев Н.Г. Кортикальный слой цитоплазмы – возможное место действия донервных трансмиттеров//Журнал эволюционой биохимии и физиологии. - 1988. - Т. 24, No. 5. - С. 625 - 629.

23 Бузников Г.А., Шмуклер Ю.Б. Влияние препаратов-антимедиаторов на межклеточные связи у ранних зародышей морских ежей//Онтогенез. - 1978. - Т. 9, No. 2. - С. 173 - 178.

24 Шмуклер Ю.Б., Чайлахян Л.М., Карпович А.Л., Харитон В.Ю., Квавилашвили И.Ш. Межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. I. Существование различных типов делений дробления зародышей половинного размера морских ежей//Онтогенез. - 1981. - Т. 12, No. 2., - С. 197 - 201.

25 Sakaguchi K., Itoh M.T., Takahashi N., Tarumi W., Ishizuka B. The rat oocyte synthesises melatonin//Reproduction, Fertility, and Development. - 2013. - Vol. 25, No. 4. P. 674 - 682.

26 Chen Z., Zuo X., Li H., Hong R., Ding B., Liu C., Gao D., Shang H., Cao Z., Huang W., Zhang X., Zhang Y. Effects of melatonin on maturation, histone acetylation, autophagy of porcine oocytes and subsequent embryonic development//Animal science journal. - 2017. - Vol. 88, No. 9. P. 1298 - 1310.

27 Čikoš Š., Fabian D., Makarevich A.V., Chrenek P., Koppel J. Biogenic monoamines in preimplantation development//Human Reproduction. - 2011. - Vol. 26, No. 9. P. 2296 - 2305.

28 Papler T.B., Bokal E.V., Maver A., Kopitar A.N., Lovrečić L. Transcriptomic analysis and meta-analysis of human granulosa and cumulus cells//PLoS ONE. - 2015. - Vol. 10, No. 8. e0136473.

29 Никишин Д.А., Алешина Н.М., Шмуклер Ю.Б. Синтез и мембранный транспорт серотонина в развивающемся овариальном фолликуле мыши//Доклады Академии наук. - 2018. - Т. 478, No. 1., - С. 103 - 106.

30 Nikishin D., Alyoshina N., Shmukler Y. Expression and functional activity of specific membrane transport of serotonin in the mouse ovary//FEBS Open Bio. - 2018. - Vol. 8, No. S1. P. 381.

31 Lister A., Regan C., Van Zwol J., Van Der Kraak G. Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation//Aquatic Toxicology. - 2009. - Vol. 95, No. 4. P. 320 - 329.

32 Moore C.J., DeLong N.E., Chan K.A., Holloway A.C., Petrik J.J., Sloboda D.M. Perinatal Administration of a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Induces Impairments in Reproductive Function and Follicular Dynamics in Female Rat Offspring//Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.). - 2015. - Vol. 22, No. 10. P. 1297 - 1311.

33 Greiner M., Paredes A., Rey-Ares V.V., Saller S., Mayerhofer A., Lara H.E. Catecholamine uptake, storage, and regulated release by ovarian granulosa cells//Endocrinology. - 2008. - Vol. 149, No. 10. P. 4988 - 4996.

34 Tanaka E., Baba N., Toshida K., Suzuki K. Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT2 receptor//Life Sciences. - 1993. - Vol. 53, No. 7. P. 563 - 570.

35 Terranova P.F., Uilenbroek J.T., Saville L., Horst D., Nakamura Y. Serotonin enhances oestradiol production by hamster preovulatory follicles in vitro: effects of experimentally induced atresia//The Journal of Endocrinology. - 1990. - Vol. 125, No. 3. P. 433 - 438.

36 Никишин Д.А., Алешина Н.М., Семенова М.Л., Шмуклер Ю.Б. Влияние серотонина на экспрессию маркеров функционального состояния клеток гранулезы//Фундаментальные аспекты психического здоровья. - 2018. - No. 4., - С. 12 - 17.

РАЗДЕЛ 4. КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОРФОГЕНЕЗА В РАЗВИТИИ ЖИВОТНЫХ

4.1 Введение

За отчетный период работу проводили по нескольким направлениям.

4.1.1Сравнительный анализ клеточных основ морфогенезов многоклеточных животных.

Известно, что хорда, обладающая свойствами региона - организатора, необходима для индукции дна нервной трубки и ее дорзо-вентральной разметки [1]. Насколько универсальна функциональная нагрузка хорды в развитии разных позвоночных животных? Наше исследование помогло ответить на этот вопрос[2].

Для головного и спинного мозга позвоночных характерно наличие функционально и структурно различающихся доменов, расположенных вдоль дорсо-вентральной оси тела. В ходе развития эти области формируются за счет уникальной комбинаторной экспрессии генов в разных доменах формирующейся нервной трубки, что в итоге приводит к развитию в них различных типов нейронов. Предполагается, что уникальный набор генов, экспрессирующихся в разных доменах нервной трубки, является результатом тонкой регулировки работы сигнальных каскадов, обеспечивающих формирование градиентов секретируемых морфогенов [3]. Sonic hedgehog (Shh) образует вентро-дорсальный градиент и экспрессируется в хорде и дне нервной трубки. Градиент Shh, в свою очередь, индуцирует градиент активности факторов транскрипции GliA и GliB, которые вместе с Sox2 участвует в образовании различающихся доменов экспрессии генов. Аналогично, сигнальные каскады Wnt и Bmp активируются в области дорсального полюса нервной трубки и поверхностной эктодермы [4, 5,6].

Формирование нервной трубки всегда служило классическим примером индукционных взаимодействий. Индукция нервной трубки зачатком хорды интерпретировалась как пример активности региона - организатора, способного индуцировать и моделировать соседнюю ткань. Классические исследования эмбрионов амфибий показали, что для формирования морфологически правильной дорсо-вентральной структуры нервной трубки требуется хорда. Было показано, что эмбриону курицы хорда необходима для развития дна нервной трубки. Например, имплантация фрагмента хорды сбоку от нейронной трубки приводит к образованию эктопического дна нервной трубки. Роль хорды может быть связана с экспрессией и секрецией Shh, вызывающей экспрессию этой

молекулы в клетках будущего дна нервной трубки [7, 8]. Согласно этой гипотезе экспрессия shh в хорде должна предшествовать началу его экспрессии в клетках дна нервной трубки. Действительно, это было показано для эмбрионов мыши и крысы.

Однако универсальность роли хорды как региона - организатора вызывала сомнения. Например, у костистой рыбы *Danio rerio* ни механическое удаление зачатка хорды, ни нарушение развития хорды у эмбрионов мутантных линий не приводили к нарушениям в развитии нервной трубки. Более того, hedgehog сигнальный каскад оказался необходимым для развития только боковой части дна нервной трубки.

Дальнейшие исследования привели к созданию модифицированной модели развития нервной трубки, в которой постулируется, что длительный индукционный сигнал хорды требуется для формирования задних областей дна нервной трубки (заднего мозга и спинного мозга), тогда как формирование передних областей обеспечивается миграцией под ними прехордальной мезодермы.

Примечательно, что, несмотря на существование сразу нескольких гипотез, объясняющих процесс индукции дна нервной трубки, пространственно - временной паттерн ранней экспрессии *shh* у эмбриона курицы до настоящего времени не изучался. Как было показано в предварительных исследованиях, в том числе и нашей группы, *shh* начинает экспрессироваться во время гаструляции в области гензеновского узелка, еще до образования нотохорда. Поэтому в данном исследовании [1] была поставлена задача детального исследования паттерна экспрессии *shh* на разных стадиях развития эмбриона курицы в гензеновском узелке, прехордальной мезодерме, хорде и дне нервной пластинки. Кроме того, в целях получения материала для сравнительного анализа, мы изучили динамику экспрессии *shh* у эмбрионов кролика и шпорцевой лягушки [1].

4.1.2 Изучение регуляции развития и морфогенезов нормального развития книдарий.

В 2018 году выполнялись исследования морфогенетических процессов и процессов регуляции развития у представителей типа Cnidaria на разных стадиях жизненного цикла.

Дифференцировка осей тела при формировании плана строения многоклеточных животных (Metazoa) относится к наиболее фундаментальным процессам развития. Среди Metazoa выделяют две группы, различающиеся количеством плоскостей симметрии и осей тела: билатерально симметричные (они имеют две основные оси тела) и радиально симметричные (имеют лишь одну, орально-аборальную ось тела). Это подразделение довольно условно: у представителей “радиально симметричных” идеальная радиальная

симметрия встречается не так уж часто, и у многих из них имеется более чем одна ось тела. Вопрос о том, как в ходе эволюции появились оси тела и как возникли и эволюционировали морфогенетические процессы, вовлеченные в их дифференцировку, имеет огромное значение для понимания происхождения и ранней эволюции царства животных. Особенно интересными в этом плане являются Metazoa, имеющие только одну ось тела, например, Cnidaria. У представителей этой группы морфогенетические процессы неразрывно связаны с особенностями жизненного цикла и способами бесполого размножения. Жизненные циклы и способы бесполого размножения отличаются в этой группе большим разнообразием и высокой эволюционной пластичностью. К сожалению, формирование оси тела в ходе бесполого размножения и смены стадий жизненного цикла не изучено у книдарий надлежащим образом. Изучение морфогенетических процессов в развитии представителей этого типа активно проводилось в конце XIX - первой половине XX века [9]. Однако в современной биологии развития морфогенезам книдарий (особенно немодельных видов) также не уделяется достаточного внимания. Более того, имеющиеся в литературе данные о формировании плана строения в жизненном цикле представителей Cnidaria, не систематизированы, что существенно ограничивает возможности использования сравнительного подхода при работе с этой группой.

Для того, чтобы восполнить этот пробел, мы провели оригинальные экспериментальные исследования [10, 11], а также анализ литературных данных, на основании которого были подготовлены обзорные статьи [12, 13, 14].

4.2 Материалы и методы

4.2.1 Сравнительный анализ клеточных основ морфогенезов многоклеточных животных.

Оплодотворенные куриные яйца инкубировали в условиях увлажнения при 38°C в течение 6-40 часов, пока эмбрионы не достигли необходимой стадии, после чего яичная скорлупа вскрывалась и эмбрионы префиксировались. После вырезания бластодермы эмбрионы переносили в чашку Петри с теплым раствором Локка, промывали для удаления частиц желтка и фиксировали в 4% PFA нафосфатом буфере (PBS) в течение одного часа. Рога матки новозеландских белых кроликов удаляли и переносили в теплый (37°C) фосфатный буфер (PBS). Бластоцисты вырезали из эндометрия, бластодиск выделяли и фиксировали в 4% PFA в течение одного часа. Фиксированные эмбрионы курицы и кролика промывали несколько раз в PBS, дегидратировали возрастающими концентрациями спирта и

хранили в этаноле при -20°C. Для *in situ* гибридизации куриных и кроличьих эмбрионов переносили в контейнеры из нейлона, регидратировали, обрабатывали 10 мг / мл протеиназы K (Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany) в PBT в течение 10 минут, а потом дофиксировали в 0,2% глутаральдегиде / PBT в течение 20 мин. Для предварительной гибридизации и гибридизации контейнеры с эмбриональным диском переносили в стерильные пробирки (Bibby-Sterilin, Staffordshire, UK).Через 1 час прегибридизации при 70°C в нагревательном блоке в буфере для гибридизации [50% формамид, 1,4X SSC, 0,1% 0,5 мМ ЭДТА, 50 мкг / мл t-РНК, 0,2% Tween-20, 0,5% CHAPS, 50 мкг / мл гепарина (AppliChem, Darmstadt, Germany)], эмбрионы гибридизовали в течение ночи при 70°C в буфере для гибридизации с 1 мкг / мл зонда (меченой дигоксигенином cRNA), денатурированной при 95°C. На следующей стадии эмбрионы промывали в предварительно подогретом гибридизационнос буфере с MABT (100 мМ малеиновой кислоты, 150 мМ NaCl, 0,1% Твин 20, pH 7,5). Впоследствии контейнеры с эмбрионами переносили в MABT с 2%ным Roche blocking reagent и 20%-ной инактивированной нагреванием goat serum. Гибридизированную РНК визуализировали антителами к дигоксигенину, связанными с щелочной фосфатазой и субстратом BM-purple (Roche, Mannheim, Germany). Для инициирования цветовой реакции эмбрионы переносили в чашки Петри, заполненные субстратом, и реакции давали возможность протекать при комнатной температуре в темноте в течение 2-5 дней. Эмбрионы *Xenopus leavis* фиксировали в MEMFA и обрабатывали в соответствии с протоколом. Гибридизацию *in situ* проводили с использованием меченых дигоксигенином антисмысловых зондов. Для изготовления тотальных препаратов часть эмбрионов была помещена в среду Mowiol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). Часть эмбрионов была залита в среду Technovit 8100s (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany). Из этих эмбрионов были получены серийные срезы 5-10 микрон. Срезы были сфотографированы в светлом поле с использованием контраста Номарского.

4.2.2 Изучение регуляции развития и морфогенезов нормального развития книдарий.

При изучении морфогенетических процессов, связанных с регуляцией эмбрионального/личиночного развития у актинии *Nematostella vectensis*, а также с развитием колонии морского гидроида *Dynamena pumila,* использовались методы прижизненных наблюдений и видеорегистрации, иммуноцитохимии, конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), молекулярной биологии.

Гистология и трансмиссионная электронная микроскопия (TEM). Образцы фиксировали в 2,5% глутаральдегиде в 0,1 М Na-какодилатном буфере (pH 7,2) и постфиксировали в 1% тетроксиде осмия в том же буфере. Затем образцы дегидратировали с помощью серии концентраций этанола и ацетона, а затем проводили инфильтрацию заливочной средой Epon 812. Образцы были порезаны с использованием алмазного ножа на ультрамикротоме Reichert Ultracut E. Полутонкие срезы окрашивали 1% толуидинового синего в 1% -ном Na-тетраборате и исследовали с помощью микроскопа Carl Zeiss Axiovert 25 CFL с цифровой камерой Zeiss Axio CamHRc. Для TEM ультратонкие срезы контрастировали 1% уранилацетатом и 1% цитратом свинца, и исследовали с помощью микроскопа JEM-1011 с камерой Gatan ES500 W Model 782.Для SEM агрегаты *Nematostella* фиксировали и обрабатывали, как в [15, 16].

Конфокальная микроскопия. Образцы фиксировали в течение ночи в свежем 4% параформальдегиде в профильтрованной морской воде при + 4°C. Фиксированные ткани промывали 5 × в PTw, а затем инкубировали в 10 мкл / мл растворе конъюгированного с BODYPI фаллацидина (200 Ед / мл, MolecularProbes) в PTw в течение 1 часа при комнатной температуре. Окрашивание DAPI проводили одновременно с окрашиванием фаллацидином путем инкубации образцов в 1 мкг / мл раствора DAPI. После окрашивания образцы промывали 5 × в PTw и пропитывали просветляющей средой (80% глицерин / 20% PBS) или ProLong ™ DiamondAntifadeMountatnt (ThermoFisherScientific).

Аморфный хитин окрашивали 0,01%-ным раствором флуоресцентного красителя CalcofluorWhite, который был приготовлен на профильтрованной морской воде. CalcofluorWhite - это неспецифический флуорохром, который связывается с целлюлозой и хитином.

Морфология клеток была охарактеризована с помощью анализа конфокальных z-стеков. Использовался конфокальный микроскоп NikonA1. Обработка изображений выполнялась с использованием программ ImageJ (NIH) или Imaris.

Исследование клеточной пролиферации. Для визуализации пролиферирующих клеток колонии изучаемого гидроида инкубировали в профильтрованной морской воде, содержащей 20 мкМ EdU, в течение 2 часов при 14-16°C. Затем образцы фиксировали 4% параформальдегидом в PBS в течение 1 часа при 4°C. Последующие процедуры были выполнены в соответствии с протоколом производителей (Click-iT ™ EdUAlexaFluor ™ 647 ImagingKit, # C10340, ThermoFisherScientific).

Методы молекулярной биологии. Гибридизацию *in situ* проводили по стандартной для Nematostella методике [17]. При двойной in situ гибридизации, РНК зонды, меченые Dig и FITC, добавляли одновременно, а метки затем визуализировали последовательно.

4.3 Результаты и обсуждение.

4.3.1 Сравнительный анализ клеточных основ морфогенезов многоклеточных животных.

Анализ полученных нами результатов указывает на сильные различия в динамике экспрессии *shh* у представителей разных классов позвоночных, а также на наблюдающуюся у позвоночных эволюционную дивергенцию механизмов индукции дна нервной трубки [1]. Кроме того, полученные результаты требуют пересмотра (по крайней мере, в случае эмбриона курицы) модели, где хорда является первичным источником hedgehog сигнала, необходимого для индукции дна нервной трубки [1]. Об этом говорят следующие данные: у эмбриона курицы экспрессия *shh* в презумптивном дне нервной трубки начинается еще до миграции мезодермы; нет никаких указаний на негативную регуляцию экспрессии *shh* в дне нервной трубки во время раннего сомитогенеза, только что сформированный зачаток нотохорда цыпленка не экспрессирует *shh*. У кролика экспрессия *shh* впервые детектируется в зачатке хорды, и только потом его экспрессия обнаруживается в области дна нервной трубки (рисунок 3.1 B-E).

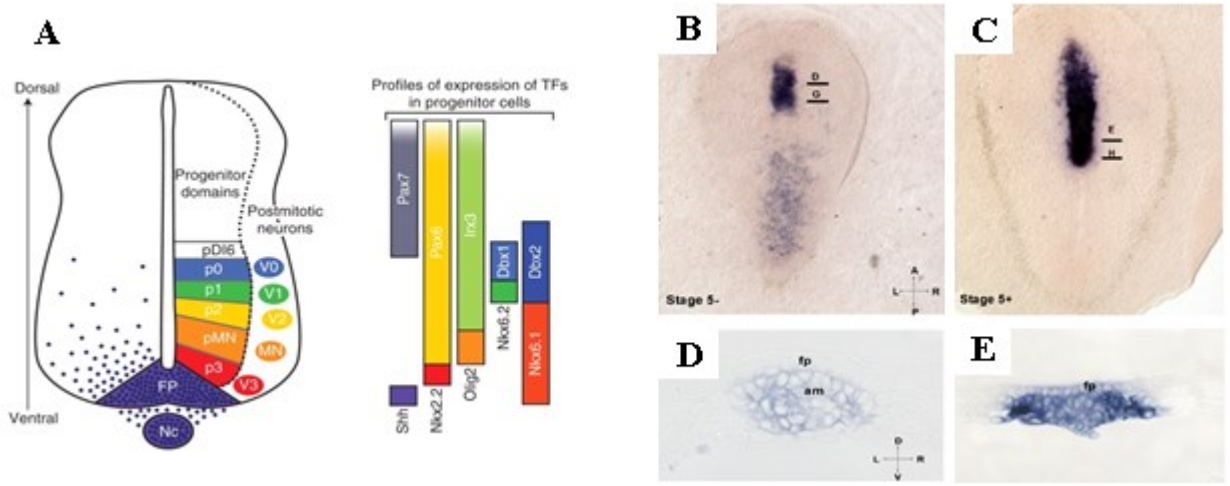

Рисунок 4.1 - (A) Классическая схема дорсовентральной разметки нервной трубки и индукция *shh* в области ее дна [2]. (B-E) Пространственная динамика экспрессии *shh* во время гаструляции кролика. (A) Стадия 5-, (B) Стадия 5+. (D-E) Поперечные срезы. Динамика экспрессии *shh* соответствует представлениям классической модели. fp – дно нервной трубки, am – осевая мезодерма.

У *Xenopus laevis* индукция экспрессии *shh* в ранней нейроэктодерме происходит на стадии поздней гаструлы, причем первоначально в презумптивной вентральной области

переднего мозга. Однако у цыплёнка *shh* экспрессируется в проспективной нейроэктодерме еще до формирования хорды (рисунок 4.2). Ни один из других морфогенов семейства hedgehog не был обнаружен у цыпленка в структурах осевого комплекса. Паттерн экспрессии *shh* у кролика полностью согласуется с классическими взглядами на дорсо-вентральную разметку нервной трубки позвоночных (рисунок 4.1 A), в то время как ранняя экспрессия shh в дне нервной трубки цыпленка ставит под сомнение универсальность данной модели (рисунок 4.2).

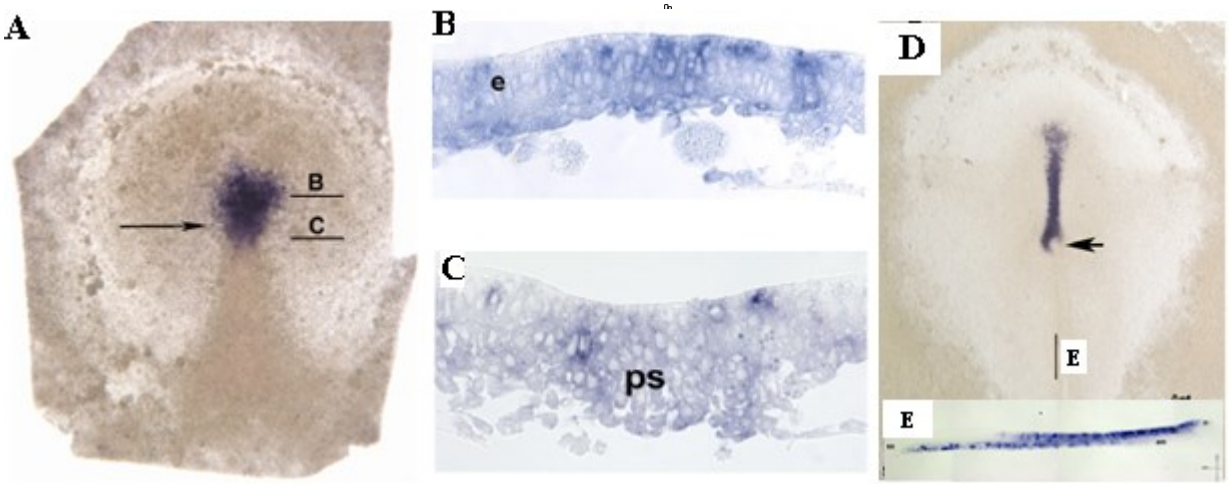

Рисунок 4.2 - (A). Ранняя экспрессия *shh*у эмбриона цыпленка, стадия 2+/3 HH. Стрелкой обозначен край первичной полоски. (B,C) Соответствующие поперечные срезы. (D-E) Экспрессия *shh* на стадии 5 HH. (E) Сагиттальный срез. Обратите внимание на отсутствие экспрессии *shh* в задней осевой мезодерме. (F) поперечный срез через первичную полоску на стадии 8 HH. ps – первичная полоска, fp – дно нервной трубки, am – осевая мезодерма, ec - эктодерма, n - узелок, se - поверхностная эктодерма.

Мы предполагаем, что тип спецификации дна нервной трубки подстраивается под изменяющуюся топографию взаимодействующих тканей в процессе гаструляции и формирования хорды, что свидетельствует об эволюционной пластичности ранней эмбриональной индукции [1].

4.3.2 Изучение регуляции развития и морфогенезов нормального развития книдарий

В экспериментах по диссоциации - реагрегации эмбриональных клеток актинии *Nematostella vectensis* (рисунок 4.3) были получены данные, касающиеся динамики экспрессии генов - регуляторов раннего развития у агрегатов [10].

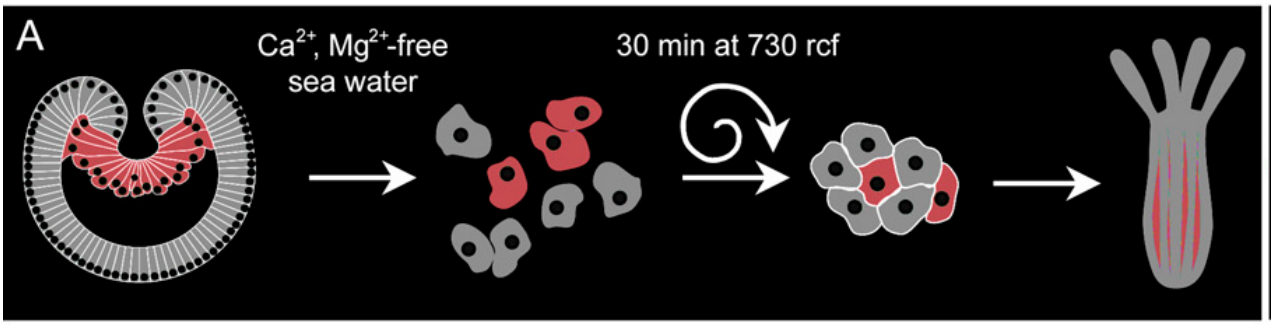

Рисунок 4.3 - Схема эксперимента по диссоциации - реагрегации эмбриональных клеток Nematostella. Обратите внимание, что на основе клеток, агрегировавших случайным образом, происходит формирование нормального первичного полипа.

Использовались гены, которые являются маркерами разных регионов эмбриона во время нормального развития и вовлечены в сигнальные каскады, необходимые для регуляции морфогенетических процессов. Это компоненты канонического Wnt-каскада, *snail*, являющийся регулятором эпителиально-мезенхимального перехода, *fgfA1*- маркер аборального полюса, оральные маркеры *brachyury* и *foxA,* а также компоненты TGF-beta каскада (рисунок 4.4). Наши эксперименты показали, что пространственно - временная динамика экспрессии данных генов практически совпадает при дифференцировке орально-аборальной оси тела у эмбрионов и агрегатов. Таким образом, подтвердилось наше предположение о том, что в основе регуляции развития лежит способность регуляторной генетической сети к самоорганизации. Именно этой ее способностью можно объяснить как высокую пластичность развития, так и его способность подстраиваться под меняющиеся начальные условия.

Кроме того, нами был проведен сравнительный анализ регуляторных способностей разных таксонов книдарий [12]. Анализировались имеющиеся в литературе данные по восстановлению плана строения у агрегатов клеток, диссоциированных в экспериментах. Оказалось, что к подобному восстановлению способны представители всех изученных в этом отношении классов книдарий, но наибольшим регуляторным потенциалом обладают представители класса Hydrozoa. Это, вероятно, связано с активностью, имеющейся у гидроидов системы стволовых клеток, и способностью их соматических клеток к трансдифференцировкам.

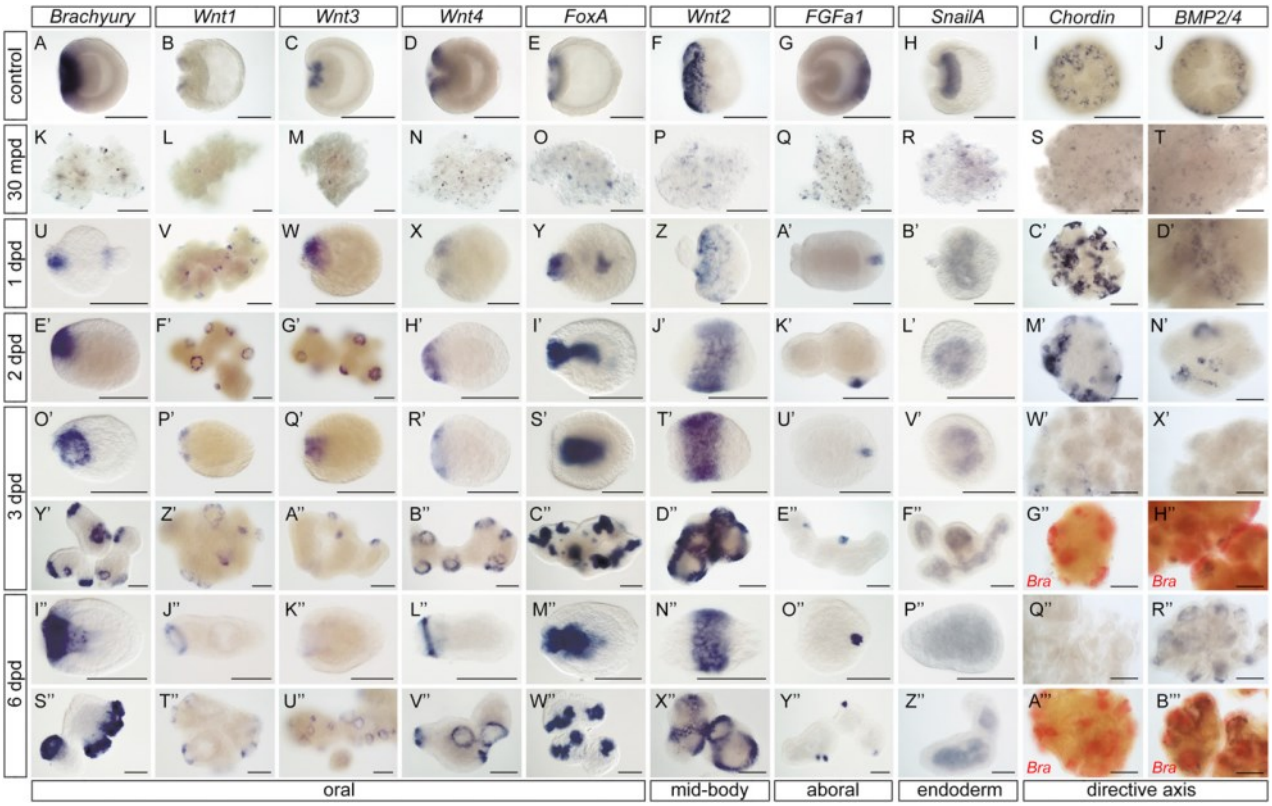

Рисунок 4.4 - Экспрессия маркерных генов при восстановлении орально-аборальной оси и образовании энтодермы в агрегатах *Nematostella*. (A-J) экспрессии маркерных генов в контрольных эмбрионах (гаструлах) на стадии, используемой для диссоциации. Wnt2 экспрессируется на оральном конце в ранних и средних гаструлах; однако его экспрессия смещается позже в область экватора. (K-T) Никаких признаков осевой полярности и закладки энтодермы непосредственно после реагрегации не наблюдается. (U-B ‴) С 1-го дня после диссоциации (dpd) оральные маркеры Bra, Wnt1, Wnt3, Wnt4 и FoxA начинают экспрессироваться на будущих оральных концах; маркер середины тела Wnt2 сначала экспрессируется кольцом вокруг орального полюса, а на 2й dpd смещается в аборальном направлении; аборальный маркер FGFa1 экспрессируется на формирующихся аборальных концах; экспрессия SnailA ограничивается формирующейся энтодермой. Экспрессия Chordin и BMP2 / 4 сначала приурочена к оральным концам агрегатов, а затем, на 3й dpd экспрессия Chordin начинает исчезать, тогда как экспрессия BMP2 / 4 наблюдается в формирующихся мезентериях. Крупные агрегаты образуют несколько оральных концов с ротовыми отверстиями (и соответствующими доменами экспрессии) и гораздо меньшее число аборальных доменов. dpd, дни после диссоциации; mpd, минуты после диссоциации. (Масштабный отрезок: 100 мкм).

В 2018 году были изучены морфогенезы книдарий, связанные с формированием эпителиальных складок (ЭС) [11]. Формирование ЭС является фундаментальным морфогенетическим процессом, который можно наблюдать в развитии многих организмов, от многоклеточных животных до зеленых водорослей. Книдарии, как представители низших Metazoa, являются прекрасными моделями для изучения таких эволюционно консервативных морфогенезов. Особенно это касается представителей класса Hydrozoa, сложно

организованные колонии которых находятся в состоянии непрерывного роста и формообразования. У беломорского гидроида *Dynamena pumila* рост колонии связан с очень разнообразными морфогенетическими процессами. Наша работа была сфокусирована на изучении развития прикрепительного диска, с помощью которого колония прикрепляется к субстрату. Мы обнаружили, что формирование этой структуры сопровождается образованием ЭС в эктодермальнм слое. Мы детально описали последовательные этапы развития прикрепительного диска с помощью световой микроскопии, КЛСМ и ТЭМ. Были выявлены области пролиферации клеток и описана динамика этого процесса. Мы показали, что образование ЭС у *Dynamena* связано с накоплением F-актина в сокращающихся апикальных доменах колбовидных клеток, расположенных на дне ЭС; при этом ядра колбовидных клеток оказались смещены в базальные домены. В совокупности эти признаки указывают на то, что образование ЭС у *Dynamena* протекает как активная инвагинация, хотя этот морфогенез никогда не описывался для гидроидов. По-видимому, развитие прикрепительного диска можно рассматривать как надежную и универсальную модельную систему для изучения эпителиальных морфогенезов, связанных с изменением формы клеток, которую в данной системе можно легко наблюдать и анализировать.

В 2018 году мы проанализировали со сравнительно-анатомической и эволюционной точек зрения жизненные циклы и способы бесполого размножения представителей Scyphozoa в связи с разными вариантами дифференцировки первичной оси и основных морфологических структур их тела [14]. Scyphozoa один из самых больших и интересных классов книдарий. Однако данные о формировании плана строения сцифоидов рассеяны по литературным источникам и практически никак не систематизированы.

В своей работе [14] мы постарались ответить на следующие вопросы. Сохраняется ли четкая преемственность между осями тела материнского и дочерних организмов в ходе бесполого размножения сцифоидов? Существует ли корреляция между особенностями процессов бесполого размножения и таксономической приуроченностью исследуемого организма?

Оказалось, что практически при всех типах бесполого размножения, в ходе которых формируются новые полипы, орально-аборальная ось полипа формируется заново. Заново дифференцируются и ее отделы – стебелек, чашечка и ротовой диск с манубриумом и щупальцами. Имеющиеся данные говорят об отсутствии четкой корреляции между таксономической принадлежностью видов сцифоидов и характерными для них способами

бесполого размножения. При этом прослеживается связь последних с некоторыми особенностями морфологии полипа, прежде всего с характером разделения на стебелек и чашечку. Однако типы бесполого размножения соответствуют морфологии полипа не жестко, и в каждой группе можно обнаружить множество “нетипичных” для нее способов бесполого размножения. Более того, наблюдается внутривидовая изменчивость морфологии полипа. Прямое наследование орально-аборальной оси тела наблюдается при процессах, связанных с переходом между жизненными формами полипа и медузы. Во-первых, при стробиляции (формировании медуз из тканей полипа): орально-аборальная ось каждой эфиры совпадает с осью материнского полипа. Во-вторых, при так называемом обратном развитии, когда только что сформировавшаяся эфира оседает на дно, деградирует и дает начало полипу.

Различные типы бесполого размножения сцифоидов, как типичные, так и редко встречающиеся, имеют много общего с регенерацией организма при его повреждении. В первую очередь мы всегда наблюдаем достраивание у дочерней (а иногда и у материнской) особи “недостающих” структур. В современной литературе широко распространено мнение, что бесполое размножение (агамогенез, агаметическое клонирование) ни по механизмам регуляции, ни по вовлеченным в процесс морфогенезам, неотличимо от регенерации. Единственное отличие состоит в условиях инициации процесса: агамогенез может начинаться спонтанно без повреждения тканей [18, 19]. Действительно, высокий регенерационный потенциал, как правило, коррелирует со способностью к бесполому размножению.

4.4 Заключение

4.4.1Сравнительный анализ клеточных основ морфогенезов многоклеточных животных.

Полученные нами данные впервые поставили под сомнение универсальность классической модели индукции нервной трубки позвоночных, где основным источником индукционного сигнала является хорда. Это заключение сделано на основе результатов экспериментальной работы по особенностям механизмов индукции нервной трубки у представителей разных классов позвоночных животных, а также благодаря проведенному нами сравнительному анализ этих данных [1].

Мы предлагаем следующий сценарий эволюционного изменения индукционных взаимодействий, сопровождающих нейруляцию позвоночных. Эволюция признаков фенотипа (в том числе, эмбриональных) обусловлена пластичностью развития, в основе которой лежит

способность процессов развития к саморегуляции. Роль таких саморегулирующихся процессов в эволюции гаструляции амниот подтверждается результатами изучения экспериментально индуцированных форм гаструляции у кроликов и куриного эмбриона [20]. Изменение гаструляционных морфогенетических движений может привести к изменениям топографии структур осевого комплекса и сдвигу доменов экспрессии. А это, в свою очередь, может способствовать эволюционным изменениям в механизме индукции дна нервной трубки. На следующем этапе эволюции, направленном на стабилизацию доменов экспрессии, может быть задействована генетическая ассимиляция, основанная на реципрокных молекулярных взаимодействиях.

Наши результаты закладывают основу для дальнейших сравнительных исследований механизмов эмбриональной индукции у позвоночных, которые панируется проводить уже с использованием функциональных экспериментов.

4.4.2 Изучение регуляции развития и морфогенезов нормального развития книдарий

Для представителей типа Cnidaria характерны пластичность и многообразие, как процессов раннего развития, так и бесполого размножения [21, 13, 14]. Пластичность развития столь велика, что даже образование оси тела у медуз и полипов не обладает постоянством: при разных типах бесполого размножения ориентация оси тела дочернего организма относительно материнского разная, а одни и те же структуры могут дифференцироваться из разных участков материнского организма [14]. По нашим данным, такая пластичность эволюционно обеспечивается высокой способностью книдарий к регуляции развития. Так, книдарии способны к восстановлению нормального плана строения из агрегата диссоциированных клеток [10, 12]. Вероятно, способность развития книдарий подстраиваться под меняющиеся начальные условия опирается на способность регуляторных генетических сетей к самоорганизации [10]. Интересно, что высокая пластичность развития сочетается у книдарий с присутствием эволюционно консервативных морфогенезов, таких как эпителиальные морфогенезы, основанные на координированном изменении формы клеток [11].

4.5 Список использованных источников

1 Kremnyov S., Henningfeld K., Viebahn C., Tsikolia N. Divergent axial morphogenesis and early shh expression in vertebrate prospective floor plate//EvoDevo. - 2018. - Vol. 9, No 1. P. 4.

2 Ribes V., Briscoe J. Establishing and interpreting graded Sonic Hedgehog signaling during vertebrate neural tube patterning: the role of negative feedback//Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2009. - Vol. 1, No. 2.P. a002014.

3 Cohen M., Briscoe J., Blassberg R. Morphogen interpretation: the transcriptional logic of neural tube patterning//Curr Opin Genet Dev. – 2013. - Vol. 23, No. 4. P. 423 - 428.

4 Liem K.F. Jr., Tremml G., Roelink H., Jessell T.M. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm//Cell. - 1995.- Vol. 82, No. 6. P. 969 - 979.

5 Chizhikov V.V., Millen K.J. Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system//Dev Biol. – 2005. - Vol. 277, No. 2. P. 287 - 295.

6 Megason S.G., McMahon A.P. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS//Development/ - 2009.- Vol. 129, No. 9. P. 2087 - 2098.

7 van Straaten H.W., Hekking J.W., Wiertz-Hoessels E.J., Thors F., Drukker J. Effect of the notochord on the differentiation of a floor plate area in the neural tube of the chick embryo//Anat Embryol (Berl). -1988. - Vol. 177, No. 4. P. 317 - 324.

8 Placzek M., Tessier-Lavigne M., Yamada T., Jessell T., Dodd J. Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the notochord//Science. - 1990.- Vol. 250, No. 4983. P. 985 - 988.

9 Metschnikoff E. Embryologische Studien an Medusen. Ein Beitrag Zur Genealogie der Primitiv Organe.- Wien: Alfred Hölder, 1886. - 159 p.

10 Kirillova A., Genikhovich G., Demilly A., Pukhlyakova E., Kraus Y., Technau U. Germ layer commitment and axis formation in sea anemone embryonic cell aggregates//Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2018 (a). - Vol. 115, No. 8. P. 1813 - 1818.

11 Kupaeva, D.M., Vetrova, A.A., Kraus, Y.A., Kremnyov, S.V. Epithelial folding in the morphogenesis of the colonial marine hydrozoan, Dynamena pumila//BIOSYSTEMS. - 2018. - Vol. 173. P. 157-164.

12 Kirillova, A. O., Kraus, Y. A., & Markov, A. V., Dissociation–Reaggregation Experiments in Cnidarians as a Model System for the Study of the Regulative Capacity of Metazoan Development//Biology Bulletin Reviews. - 2018 (b). - Vol. 8, No. 1. P. 1 - 11.

13 Osadchenko B.V., Kraus Y.A., Trachylina: The Group That Remains Enigmatic Despite 150 Years of Investigations//Russian Journal of Developmental Biology. - 2018.- Vol. 49, No. 3. P.134- 145.

14 Сухопутова А.В., Краус Ю.А., Кириллова А.О., Марков А.В. Дифференцировка орально-аборальной оси и основных морфологических структур тела в жизненном цикле Scyphozoa//Журнал общей биологии. - 2018. - Т. 79,No. 5. С. 342-362.

15 Kraus Y.A. Morphomechanical programming of morphogenesis in cnidarian embryos//Int. J. Dev. Biol. - 2006. - Vol. 50, No. 2-3. P. 267 - 275.

16 Fritzenwanker J.H., Genikhovich G., Kraus Y., Technau U. Early development andaxis specification in the sea anemone Nematostella vectensis//Dev.Biol. - 2007. - Vol. 310, No. 2. P. 264 - 279.

17 Genikhovich G., Technau U. In situ hybridization of starlet sea anemone(Nematostella vectensis) embryos, larvae, and polyps//Cold Spring Harb. Protoc. - 2009.Vol. 2009, No. 9.P. pdb.prot5282.

18 Sköld H. N., Obst M., Sköld M., Akesson B. Stem Cells in Asexual Reproduction of Marine Invertebrates / Stem Cells in Marine Organisms//Dordrecht; Heidelberg; London; New York: Springer. - 2009. P. 109 - 138.

19 Rinkevich Y., Matranga V., Rinkevich B. Stem Cells in Aquatic Invertebrates: Common Premises and Emerging Unique Themes. Stem Cells in Marine Organisms//Dordrecht; Heidelberg; London; New York: Springer. - 2009. P. 61 - 108.

20 Alev C., Wu Y., Nakaya Y., Sheng G. Decoupling of amniote gastrulation and streak formation reveals a morphogenetic unity in vertebrate mesoderm induction//Development. - 2013.- Vol. 140, No. 13. P. 2691 - 2696.

21 Kraus Y.A., Markov A.V. Gastrulation in Cnidaria: The key to an understanding of phylogeny or the chaos of secondary modifications?//Biology Bulletin Reviews. - 2017. - Vol. 7. No. 1.P. 7 - 25.

РАЗДЕЛ 5. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ (ГИПОКСИИ И ТЕМПЕРАТУРЫ) НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РАЗВИВАЮЩИХСЯ ЖИВОТНЫХ. ПОИСК АНТИГИПОКСИЧЕСКИХ СРЕДСТВ.

5.1 Введение

Продолжая исследования механизмов ритмической сократительной активности сердца в эмбриогенезе при гипоксии, исследовали возможную роль кальция, содержащегося в клеточных лизосомах эмбрионального сердца, на ранних стадиях развития. Важным было оценить эффект блокатора двупоровых кальциевых каналов, которые участвуют в регуляции лизосомального кальция, на спонтанную ритмическую сократительную активность изолированного сердца куриного зародыша в раннем эмбриогенезе. Двупоровые кальциевые каналы – эволюционно древнее семейство белков, выявленных у животных, растений и одноклеточных эукариот. У животных эти каналы локализованы в эндолизосомальных везикулах и активируются вторичным мессенджером NAADP (Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate). Ранее было продемонстрировано, что активируемые NAADP-каналы участвуют в электромеханическом сопряжении в миокарде, а их избыточная активация может вызывать экстрасистолию. Недавние исследования показали большую роль, которую играют кальциевая сигнализация в контроле дифференцировки и развития, и, в частности, ту важную роль, которую играет вторичный мессенджер NAADP, являющийся ключевым регулятором сигналов Ca^{2+}, исходящего из эндолизосомального компартмента, посредством действия нового класса ионных каналов, называемых двухпоровыми каналами [1]. Возникает вопрос, может ли лизосомальный кальций, регулируемый через NAADP-сигнальный путь, играть роль в сокращениях эмбрионального сердца на ранних стадиях развития. Задачей нашего исследования было выяснить, как блокировка двупоровых кальциевых каналов повлияет на спонтанную ритмическую сократительную активность эмбрионального сердца куриного зародыша на ранних стадиях развития. Для исследований использовали селективный блокатор двупоровых кальциевых каналов: trans-NED19, который является структурным аналогом NAADP.

5.2 Материалы и методы

Эксперименты проводили на оплодотворенных яйцах породы Белый Леггорн (*White Leghorn*), инкубируемых в лабораторном инкубаторе при оптимальных условиях (37,5 ±0,5ºС и влажности 60–70%). Исследования проводили на изолированном сердце куриного

зародыша на 4 сут эмбрионального развития, когда нервная и гормональная регуляция сердца еще отсутствует. Сердце фиксировали в экспериментальной камере, проводили видеорегистрацию сокращений сердца зародыша и полученные видеофайлы анализировали с помощью компьютерной программы компании DanioScopeNoldus (рисунок 5.1). Регистрацию активности сердца проводили в камеру с раствором Хэнкса в исходных условиях, и затем добавляли trans-NED19 в раствор в разных концентрациях.

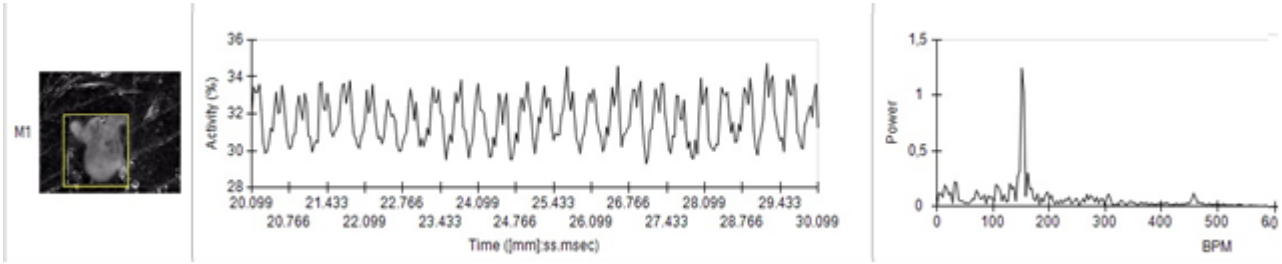

Рисунок 5.1 - Пример графической регистрации сердечного ритма изолированного сердца куриного зародыша в контроле на 4 сут инкубации, используя программу Danio Scope Noldus. Пики на записи соответствуют сокращениями разных отделов сердца. Слева расположено фото изолированного сердца, в центре – пример графической регистрация сократительной активности данного сердца invitro (длительность 10 сек), справа – соответствующий график анализа Фурье.

5.3 Результаты и обсуждение

В контроле (рисунок 5.2) частота сокращений изолированного сердца была стабильной и составляла 111±7 уд/мин. Trans-NED19 (конечная концентрация 10 мкМ) вызывал ингибиторный эффект, и сердечный ритм снижался на 30 ±7%. Увеличение концентрации trans-NED19 до 20 мкМ вызывало снижение сердечного ритма на 42±5% от величины в контроле, что достоверно не отличалось от величины эффекта при 10 мкМ. Сердечный ритм полностью восстанавливался при отмывании в растворе Хэнкса [2].

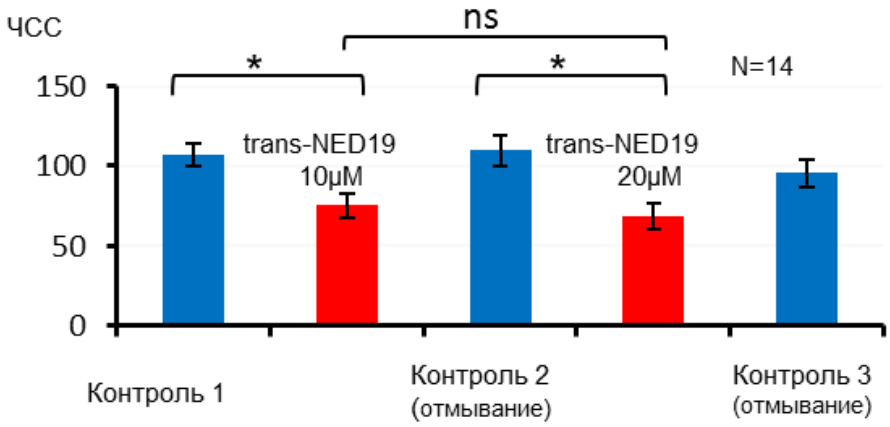

Рисунок 5.2 -Эффект селективный блокатор двупоровых кальциевых каналов trans-NED19 на сердечный ритм (ЧСС) изолированного сердца куриного зародыша на 4 сут инкубации.

Полученные данные показали, что у развивающего сердца куриного зародыша уже на ранних стадиях развития двупоровые каналы участвуют в спонтанной сократительной активности. Отсутствие достоверного различия величин ингибиторного хронотропного эффекта при концентрациях trans-NED19 10мкМ и 20мкМ может указывать на насыщение соответствующих рецепторов. Можно предположить, что около 40% сократительной активности сердца на этой стадии развития связано с мобилизацией кальция из эндолизосом с участием двупоровых кальциевых каналов, активированных NAADP [1]. Полученные данные могут помочь в дальнейшем в поиске антигипоксических средств, эффективных для функционирования сердечно-сосудистой системы в пренатальный период развития.

5.4 Список использованных источников

1 Parrington J., Lear P., Hachem A. Calcium signals regulated by NAADP and two-pore channels - their role in development, differentiation and cancer//The International Journal of Developmental Biology -2015. - Vol. 59. P 341 - 335.

2 Nechaeva M.V., Alekseeva T.A., Avdonin P.V. Effect of TRANS-NED19 on the heart rate of the chick embryo at early stages of development//Neurochemical Journal - 2018. - Vol. 12, No. 4. P. 69.

РАЗДЕЛ 6. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ И ФЕРМЕНТНОЙ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ БИОМОЛЕКУЛ

6.1 Введение

Надёжность онтогенеза подразумевается как вероятность поэтапной реализации всех определяемых геномом морфогенетических и физиологических преобразований организма в полной мере. Успешно завершённым можно считать онтогенез, результат которого вносит полноценный вклад в поддержание численности популяции на стабильном уровне. Прекращение онтогенеза на любой промежуточной стадии означает, что он обладал низкой надёжностью, а величину обратную вероятности прекращения онтогенеза можно считать количественной мерой надёжности текущей стадии развития.

Любой онтогенез надёжно реализуется только в определённом диапазоне параметров внешней и внутренней среды. Кратковременное изменение параметров среды в пределах диапазона толерантности вида вызывает адекватный физиологический ответ, компенсирующий возникшие отклонения производством дополнительной работы внутри организма. Для аэробных гетеротрофов производство дополнительной работы проявляется в повышенном потреблении кислорода.

В пределах диапазона физиологической толерантности величину избыточного потребления энергии можно поставить в соответствие со степенью снижения стабильности онтогенеза и использовать в качестве интегральной характеристики условий обитания [2,8].

Необходимость компенсации возникает вследствие разбаланса скоростей биохимических реакций метаболической сети, то есть снижения сродства к субстрату в одной или нескольких из них. Одной из причин этого является изменение конформации молекулы фермента, нарушающей пространственное соотношение активного центра, центра регуляции и сайтов связывания субстрата, то есть её вторичную и третичную структуру.

Подверженность изменениям вторичной и третичной структур белка определяет диапазон условий, при которых он способен выполнять свои функции в клетке, то есть создаёт основу диапазона толерантности для каждого этапа онтогенеза и вероятность успешного выполнения онтогенеза в целом.

Интерес представляет принцип формирования каркаса молекулы, определяющий её механические свойства, количество и взаимное расположение аминокислот, формирующих внутренние стабилизирующие связи третичной структуры. Поскольку точечные мутации явление нередкое и вероятность из возникновения одинакова для любой позиции первичной

последовательности, представляет интерес также вопрос о минимальном количестве аминокислотных замен вне активного центра и сайтов связывания, которое способно радикально изменить физико-химические свойства белка.

Задачей исследования было изучение структурной устойчивости природных и рекомбинантных ферментов и структурных белков разной физиологической роли, а также влияния точечных замен аминокислот на их термолабильность. методами дифференциальной сканирующей калориметрии.

6.2 Результаты и обсуждение

Лакказы.

Структурную устойчивость экзоферментов — лакказ базидиомицетов *Steccherinum bourdotii* Saliba & A. David и *Junghuhnia nitida* (Pers) изучали методом дифференциальной сканирующей калориметрии [1]. Молекулярный вес обоих ферментов равен 63 kDa а изоэлектрические точки 3.1 и 3.4, соответственно. Редокс потенциал лакказ *J. nitida* (610 mV) и *S. bourdotii* (640 mV) оказался несколько ниже исследованных ранее ферментов этой группы, выделенных из *Trametes hirsuta* и *Coriolopsis caperata*, однако сродство к субстрату выше, чем у последних. ДСК анализ показал, что оба вновь выделенных фермента обладают более высокой термостабильностью (рисунок 6.1).

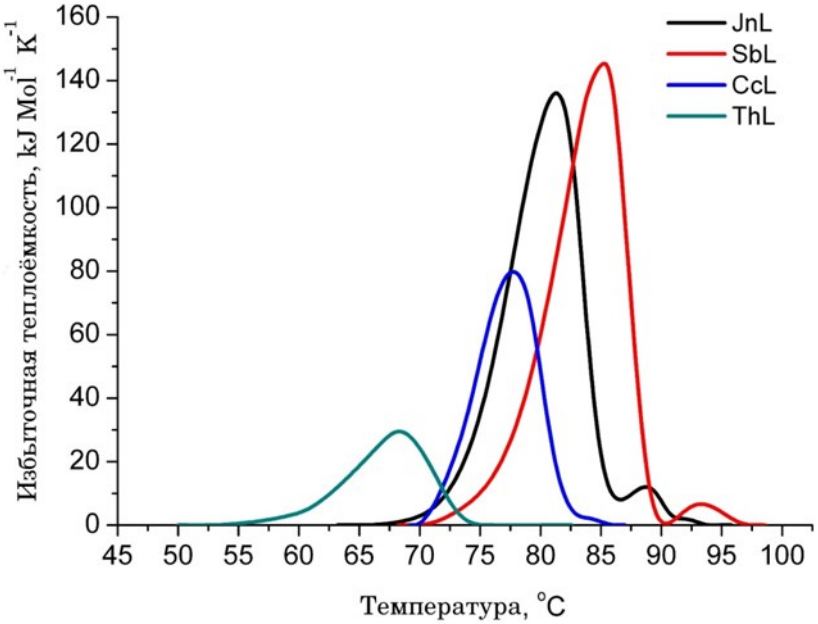

Рисунок 6.1 –Результаты ДСК лакказ *J. nitida* (JnL), *S. bourdotii* (SbL), *T. Hirsuta* (ThL) и *C. Caperata* (CcL).

Характеристики денатурации лакказ, представленные в таблице 6.1, выявляют прямое соответствие температуры максимума пика денатурации и энтальпии денатурации.

Объяснением этого соответствия, которое наблюдается далеко не для всех белков, может быть предположение об уменьшении в ряду SbL->JnL->CcL->ThL количества стабилизирующих молекулу связей внутри одной полипептидной цепи, отстоящих друг от друга примерно на равное количество аминокислотных остатков. То есть размер калориметрического домена уменьшается вместе с количеством стабилизирующих связей и вносит всё меньший вклад в изменение числа степеней свободы при денатурации, уменьшая тем самым скорость изменения теплоёмкости и, следовательно, энтальпии денатурации.

Таблица 6.1 - Характеристики денатурации лакказ

Лакказа	SbL	JnL	CcL	ThL
ΔH, kJ Mol^{-1}	1135.6	1055.8	511.6	287.0
T_{max}, ^{o}C	85.1	81.3	77.0	69.4

Гипотеза о количестве стабилизирующих связей применима также к гистоноподобным (HU) белкам из *Mycoplasma gallisepticum* (HUMgal)и *Spiroplasma melliferum* (HUSpm), которые состоят из двух субъединиц и выполняют функции гистонов эукариот в клетках бактерий [6].

Методом ДСК показаны существенные различия термостабильности исследованных белков (рисунок 6.2).

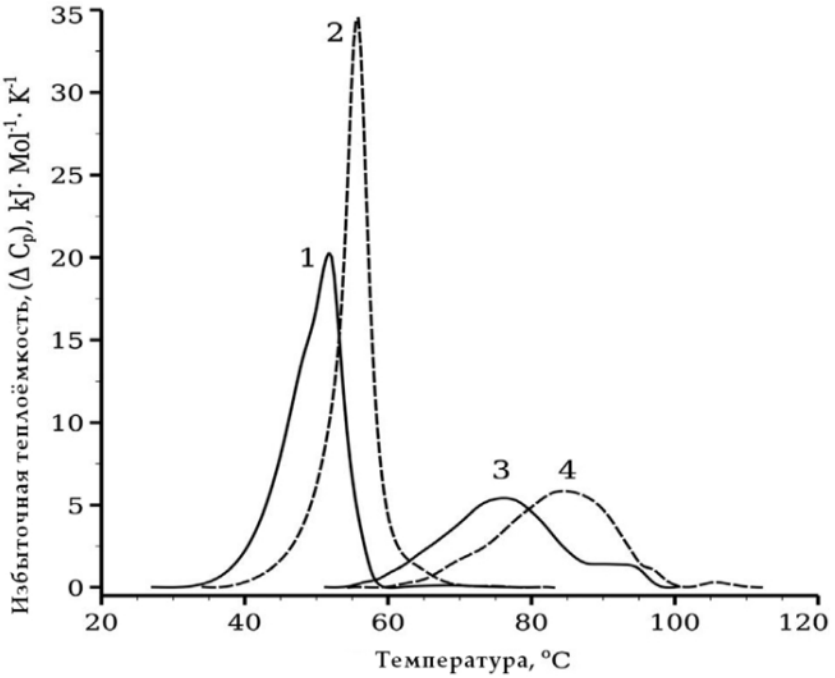

Рисунок 6.2 - Термограммы ДСК HUMgal (1,2) и HUSpm (3,4). Концентрация 5 mg/ml в натрий-фосфатном буфере (10 mM) pH 7,4 с добавлением 0,2 (1,3) и 1 (2,4) молей NaCl.

Температура максимума скорости денатурации HUMgal равна 51,8 и 55,7 ^{o}C при 0,2 и 1,0 моля хлорида натрия соответственно. Аналогичные показатели для HUSpm оказались значительно выше: 76,2 и 84,5 ^{o}C соответственно. Обнаруженное смещение пика денатурации в сторону высоких температур при повышенной концентрации соли указывает на вклад гидрофобных взаимодействий субъединиц в стабилизацию димера в обоих белках.

Известно, что HU-белки состоят из двух субъединиц, дополнительно стабилизированных гидрофобным взаимодействием. В молекуле HUSpm имеется дополнительный кластер, составленный двумя фенилаланинами, который создаёт дополнительную стабилизирующую молекулу силу.

Механизм стабилизации структуры HUSpm предположительно состоит в дополнительной связи между субъединицами, однако энергия активации разрыва связей может быть разной, в пользу чего говорит примерно вдвое меньшая кооперативность денатурации у HUSpm по сравнению с HUMgal.

Тропомиозин.

Стабилизация структуры молекулы посредством взаимодействия между составляющими её субъединицими обнаруживается также у тропомиозина. Это актин-связывающий белок, который играет центральную роль в регуляции сокращения поперечно-полосатых мышц. Молекула тропомиозина представлена димером альфа-спиралей, формирующих левостороннюю спираль, основу которой составляют так называемые гептады, в первой и четвёртой позиции которой находятся гидрофобные остатки, скрепляющие альфа-спирали.

В скелетной мышце присутствуют три изоформы тропомиозина (альфа, бета и гамма), которые являются продуктами трёх генов (TPM1, TPM2, и TPM3).

В быстрых мышцах присутствует альфа-тропомиозин, а в медленных — гамма. Бета изоформа присутствует в обоих типах скелетных мышц. Изоформы тропомиозина формируют альфа-фльфа и гамма-гамма гомодимеры или гетеродимеры альфа-бета и гамма-бета. Бета-бета гомодимеры относительно нестабильны и обычно не обнаруживаются в скелетных мышцах.

Результаты ДСК показали, что термостабильность альфа-бета гетеродимера несколько ниже, чем альфа-альфа гомодимера. В частности, энтальпия денатурации N-концевого участка альфа-бета гетеродимера составляет мене половины от энтальпии аналогичного участка альфа-альфа гомодимера [3].

Это уменьшение энтальпии может быть объяснено двумя заменами аминокислот Leu на Val в N-концевой части тропомиозина. Leu-Leu взаимодействие между двумя альфа-цепями в гидрофобном ядре альфа-альфа гомодимера проявляет большее стабилизирующее действие. Замена Leu на Val в обеих субъединицах бета-бета гомодимера предположительно дестабилизирует связи между цепями в гидрофобном ядре. В альфа-бета гетеродимере Leu альфа-цепи взаимодействует с Val в бета-цепи и это взаимодействие сильнее, чем Val-Val в бета-бета гомодимере, но, несомненно, слабее, чем Leu-Leu в альфа-альфа гомодимере.

В данном случае имеет место стабилизация структуры при взаимодействии субъединиц димера при котором термолабильный мономер приобретает повышенную термостабильность.

6.3 Заключение

Стабилизация вторичной и третичной структуры молекулы белка может быть реализована несколькими способами. Это может быть взаимодействие аминокислотных остатков внутри одной полипептидной цепи, как это предполагается для лакказ. Установлено, что более термостабильные лакказы из *J. nitida*, и *S. Bourdotii* характеризуются и большим сродством к субстрату, чем лакказы *T. Hirsuta* (ThL) и *C. Caperata* (CcL). Все четыре вида базидиомицетов являются мезотермными и обитают примерно в одинаковых условиях. Следовательно, повышенная термостабильность ферментов *J. nitida*, и *S. Bourdotii* не является приспособлением к температуре обитания, а может быть фактором увеличения сродства к субстрату за счёт большей стабильности молекулы.

Анализ распределения возможных стабилизирующих взаимодействий аминокислотных остатков в однодоменной молекуле формиатдегидрогеназы [4,5] позволил увеличить термостабильность этого фермента на основе формиатдегидрогеназы дрожжей на 12 градусов заменой трёх аминокислот [7].

Единственная аминокислотная замена в полипептидной цепи способна существенно изменить стабильность молекулы, как это видно на примере HU-белков, состоящих из двух идентичных субъединиц. В данном случае взаимодействие между субъединицами димера стабилизирует калориметрический домен каждой субъединицы.

Аналогичный механизм обнаруживается у тропомиозина, особенности первичной структуры которого позволяют проследить количественную связь взаимодействия аминокислотных остатков с термостабильностью белка, а также стабилизацию её структуры за счёт взаимодействия субъединиц.

6.4 Список использованных источников

1 Glazunova O.A., Shakhova N.V., Psurtseva N.V., Moiseenko K.V., Kleimenov S.Y., Fedorova T.V. White-rot basidiomycetes Junghuhnia nitida and Steccherinum bourdotii: Oxidative potential and laccase properties in comparison with *Trametes hirsuta* and *Coriolopsis caperata*//PLoS ONE - 2018. - Vol. 13, No 6. - P. e0197667.

2 Клейменов С.Ю. Энергетическая цена онтогенеза как показатель качества среды обитания (тесты на *Daphnia magna* и *Carassius auratus*)//Онтогенез - 2018. - Т. 49. No 1. - С. 22-26.

3 Matyushenko A.M., Kleymenov S.Y., Susorov D.S., Levitsky D.I. Thermal unfolding of homodimers and heterodimers of different skeletal-muscle isoforms of tropomyosin//Biophysical Chemistry. - 2018. - No 243. P. 1-7.

4 Пометун А.А., Клейменов С.Ю., Зарубина С.А., Каргов И.С., Паршин П.Д., Садыхов Э.Г., Савин С.С., Тишков В.И. Сравнение термостабильности новых формиатдегидрогеназ с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии//Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. - 2018. - Т. 59, No 2. С. 164- 169.

5 Pometun A.A., Zarubina S.A., Kargov I.S., Kleimenov S.Y., Sadykhov E.G., Savin S.S., Tishkov V.I. Comparative study of thermal stability of formate dehydrogenases from different sources//FEBS OPEN BIO. - 2018. - Vol. 8. - P. 187.

6 Timofeev V.I., Altukhov D.A., Talyzina A.A., Agapova Y.K., Vlaskina A.V., Korzhenevskiy D.A., Kleymenov S.Y., Bocharov E.V., Rakitina T.V. Structural plasticity and thermal stability of the histone-like protein from *Spiroplasma melliferum* are due to phenylalanine insertions into the conservative scaffold//Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. - 2018. - P. 1- 13.

7 Zarubina S., Pometun A., Kleymenov S., Savin S., Tishkov V. Rational design of formate dehydrogenase from the thermotolerant yeast *Ogataea parapolymorpha*//FEBS OPEN BIO. - 2018. - Vol. 8. - P. 186.

8 Клеймёнов С.Ю. Качество среды обитания и энергетическая цена онтогенеза//Жизнь Земли. - 2018. - Т. 40, No 2. - С. 158- 162.

РАЗДЕЛ 7. ДИНАМИКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА И РОСТА В ОНТОГЕНЕЗЕ ЖИВОТНЫХ И МЕХАНИЗМЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА.

7.1 Введение

За отчетный период работу проводили по нескольким направлениям.

7.1.1 Потепление климата как возможный механизм сокращения популяций моллюсков в реках [1].

В качестве количественного показателя влияния климата на состояние популяций моллюсков используется такой параметр относительного роста как соотношение выпуклости и длины раковины пресноводных жемчужниц *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia).

За последнее столетие распространение и численность *M. margaritifera* резко сократились по всей Европе, особенно в южной части ареала, и большинству его популяций не удавалось успешно размножаться в течение последних 30–50 лет. Причины сокращения численности вида не совсем ясны. С нашей точки зрения наиболее вероятной причина – изменение климата как результат глобального потепления.

Настоящее исследование направлено на разработку серии регрессионных моделей, описывающих влияние климатических переменных на выпуклость раковины, возраст и состояние популяций пресноводных жемчужниц в континентальном масштабе.

7.1.2 Уравнение роста [2]

Подавляющее большинство предложенных ранее уравнений роста животных по существу описывают рост феноменологически без привлечения какого-либо теоретического обоснования. Такая ситуация не дает возможности понять механизмы процесса роста и соответственно создать общую теорию роста.В нашей работе мы показали, что уравнение роста животных может быть получено, исходя из формул и принципов неравновесной термодинамики.

7.1.3 Систематика в семействе Margaritiferidae (Bivalvia) [3-6]

Использование некорректных методов при описании новых видов и родов двустворчатых моллюсков привело к тому, что систематика многих семейств оказалась запутанной. В результате актуальной становится проблема определения валидных видов. В частности, это касается семейства Margaritiferidae. Разные авторы включают в состав семейства от 1 до 35 родов. Число описанных видов превышает 200. В данной работе проведена ревизия видовых названий в этом семействе, составлена синонимия и проведен пересмотр ключевых признаков, позволяющих достоверно определять валидные виды.

7.1.4 Сопоставимый стандартный обмен в эволюции животных [7-9]

Согласно современной термодинамической концепции любая термодинамическая система стремится к стационарному состоянию, в котором все процессы протекают с одинаковой скоростью под действием постоянных сил. Для биологических систем стационарному состоянию соответствует понятие «состояние гомеостаза».

Цель работы - исследование состояний энергетического гомеостаза в биологических системах и закономерностей их формирования.

7.1.5 Индивидуальный рост моллюсков [10-12]

Рост моллюсков принято описывать уравнением Берталанфи. Значения коэффициентов этого уравнения имеют значение при оценке влияния факторов внешней среды на рост и продолжительность жизни животных.Цель работы - определение коэффициентов уравнения Берталанфи у двустворчатого моллюска *Margaritifera margaritifera* и брюхоногого моллюска *Planorbarius corneus*.

7.2 Материалы и методы

7.2.1. Потепление климата как возможный механизм сокращения популяций моллюсков в реках.

В исследовании было использовано 3279 раковин *Margaritifera margaritifera* из 50 рек и шести стран. Раковины получали из различных музейных коллекций или собирали в природных популяциях. Длину (L) и выпуклость (W) раковины измеряли с точностью 0.1 мм. Вычисляли основной морфометрический индекс, а именно индекс выпуклости раковины, SCI (отношение 100 W/L). Средние значения SCI в разных популяциях сравнивали с помощью критерия Стьюдента. Корреляцию морфометрических параметров с климатическими и географическими переменными рассчитывали с использованием коэффициентов Пирсона и Спирмена в зависимости от размера выборки, типа переменных и результатов испытаний на нормальность. Среднемесячные температуры воздуха были получены из климатической базы данных CRU TS v. 3.23 (Отдел климатических исследований, Университет Восточной Англии).

7.2.2 Уравнение роста

Согласно термодинамике неравновесных процессов для скорости изменения удельной энтропии ($s = S/M$) можно записать уравнение:

$$\frac{\mathrm{d}s}{s\mathrm{d}t} + \frac{\mathrm{d}M}{M\mathrm{d}t} = \frac{1}{TS}\left(\frac{\Delta Q}{\Delta t} - \sum_i \Xi_\mathrm{i} \frac{\mathrm{d}\xi_i}{\mathrm{d}t} + \sum_{\alpha=1}^{K} \mu_\alpha \frac{\mathrm{d}N_\alpha}{\mathrm{d}t}\right) \quad (1)$$

S – энтропия; M – масса; $\Delta Q/\Delta t$ – тепловой поток; Ξ_i – термодинамические силы; $\mathrm{d}\xi_i/\mathrm{d}t$ –

термодинамические потоки; μ_α – химические потенциалы; $\mathrm{d}N_\alpha/\mathrm{d}t$ – потоки частиц, поступающих в систему (организм).

Разница между данными прямой и непрямой калориметрии в живых системах, обозначаемая как ψ_u-функция определяется уравнением

$$\psi_u = \frac{1}{M}\left(\frac{\Delta Q}{\Delta t} - \sum_i \Xi_\mathrm{i}\frac{\mathrm{d}\xi_i}{\mathrm{d}t} + \sum_{\alpha=1}^{K}\mu_\alpha\frac{\mathrm{d}N_\alpha}{\mathrm{d}t}\right)$$

Учитывая, что удельная энтропия в живых системах не возрастает и

$$\frac{\mathrm{d}s}{s\mathrm{d}t} = -\sigma,$$

получаем уравнение роста, которое может быть проверено экспериментально:

$$\frac{\mathrm{d}M}{M\mathrm{d}t} = \sigma + k\psi_u. \qquad (2)$$

Для проверки пригодности уравнения роста (2) использовали литературные данные по измерению удельной скорости весового роста и ψ_u-функции в онтогенезе различных организмов [13,14].

7.2.3 Систематика в семействе Margaritiferidae (Bivalvia)

Синонимию родовых и видовых наименований семейства Margaritiferidae составляли, опираясь на базы данных [15-18], а также собственные данные.

7.2.4 Сопоставимый стандартный обмен в эволюции животных

Использовали данные по скорости потребления кислорода животными в состоянии относительного покоя при температуре 20°C (Q, мВт) и массе тела (M г), собранные ранее.

Сопоставимый стандартный обмен (a) вычисляли с помощью уравнения:

$$a = Q/M\ 075.$$

Сведения о наиболее ранних палеонтологических находках представителей таксона получали из базы данных [19].

7.2.5 Индивидуальный рост моллюсков

Двустворчатых моллюсков Margaritifera margaritifera собирали в реках Карелии: Сюскюянйоки и Ливойоки. У этих животных определяли длины последовательных годовых колец на поверхности раковины (параметр линейного роста). Брюхоногих моллюсков *Planorbarius corneus* получали из аквакультуры. У них определяли массу тела (параметр весового роста).

Данные аппроксимировали рекуррентной формой уравнения роста Берталанфи:

$$\Delta L = -aL_t + d,$$

где ΔL – прирост длины раковины за год, следующий за возрастом t; L_t – длина годового кольца в возрасте *t*; *a* – коэффициент, определяющий замедление роста; *d* – коэффициент начальных условий. Сравнение коэффициентов уравнения Берталанфи проводили методом регрессионного анализа.

7.3 Результаты и обсуждение

7.3.1 Потепление климата как возможный механизм сокращения популяций моллюсков в реках

Индекс выпуклости раковины (SCI) в для популяций жемчужниц из низменных рек в прошлом (~ 1840–1940) не обнаруживает зависимости от широты места обитания (ранговая корреляция Спирмена между широтой и SCI: $rs = -0.20$ (не достоверно), $n = 12$ $P = 0.25$ (рисунок 1A). В то же время этот показатель в современных популяциях низменных рек (1984–2013 гг.) увеличивается от высоких к низким широтам (ранговая корреляция Спирмена между широтой и SCI: $rs = -0.80$, $n = 25$, P = 0.000001) (рисунок 7.1A). Таким образом, широта водоема оказывает различное влияние на среднее значение SCI в прошлом и сейчас.

Среднее значение SCI в современных популяциях из горных рек в региональном масштабе (Австрия) тем больше, чем больше высота места обитания (ранговая корреляция Спирмена между широтой и SCI: rs = −0.51, n = 20, P = 0.02) (рисунок 7.1B)). Результаты общих линейных моделей показали, что в современных популяциях относительная выпуклость раковины существенно зависит от статуса популяции: в сокращающихся популяциях среднее значение SCI значительно выше, чем в современных жизнеспособных (рисунок 4.1C; $p<0.0001$) и в популяциях в прошлом (рисунок 7.1C; $p<0.0001$).

Средние значения SCI у *M. margaritifera* напрямую связаны со средней летней температурой воздуха (рисунок 4.1D; $p<0.00001$. (1) Средняя летняя температура водоема положительно коррелирует с SCI (рисунок 7.1D). Кроме того, существует высокая отрицательная корреляция между максимальным возрастом $A_{\max}$ и средним SCI (рисунок 7.1E) и определяется уравнением линейной регрессии:

$$A_{\max} = -19.122\ \mathrm{SCI} + 632.846.$$

Отличие значения коэффициента регрессии (–19.122) от 0 высоко достоверно ($p<$ 0.00001).

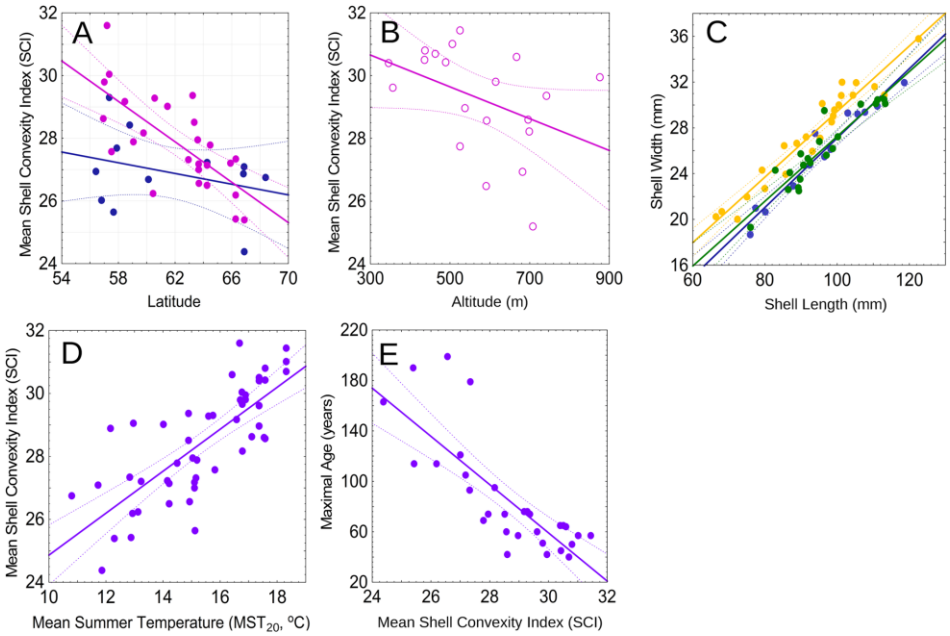

Рисунок 7.1 - Изменчивость относительной выпуклости раковины (SCI) и максимального возраста популяций *Margaritifera margaritifera*. Пунктирные линии – доверительные границы 95% моделей регрессии. (A) Зависимость SCI от широты места обитания популяций низменных рек Европы (<200 м над уровнем моря). Красные точки – современные популяции (1984–2013 гг.), синие точки – популяции прошлого (~ 1840–1940). (B) Зависимость SCI от высоты места обитания над уровнем моря для горных рек Австрии (> 300 м над уровнем моря). (C) Зависимость выпуклости раковины от ее длины. Зеленые точки – современные жизнеспособные популяции (1984–2013 годы, n = 21), желтые точки – современные сокращающиеся популяции (1984–2013 годы, n = 24), синие точки – популяции в прошлом (~1840–1940, n = 13). (D) Зависимость SCI от средней летней температуры водоема (среднее значение за 20 лет до отбора проб). (E) Зависимость максимального возраста от SCI в разных популяциях (n = 49).

7.3.2 Уравнение роста

К сожалению измерений ψ_u-функции в онтогенезе животных проводятся редко из-за технической сложности получения данных. Те немногочисленные экспериментальные данные, которые нам удалось найти в литературе, достаточно хорошо описываются уравнением роста (2) (рисунок 7.2).

Для окончательного решения пригодности этого уравнения для описания роста животных необходимо проводить дополнительные измерения у как можно большего числа видов.

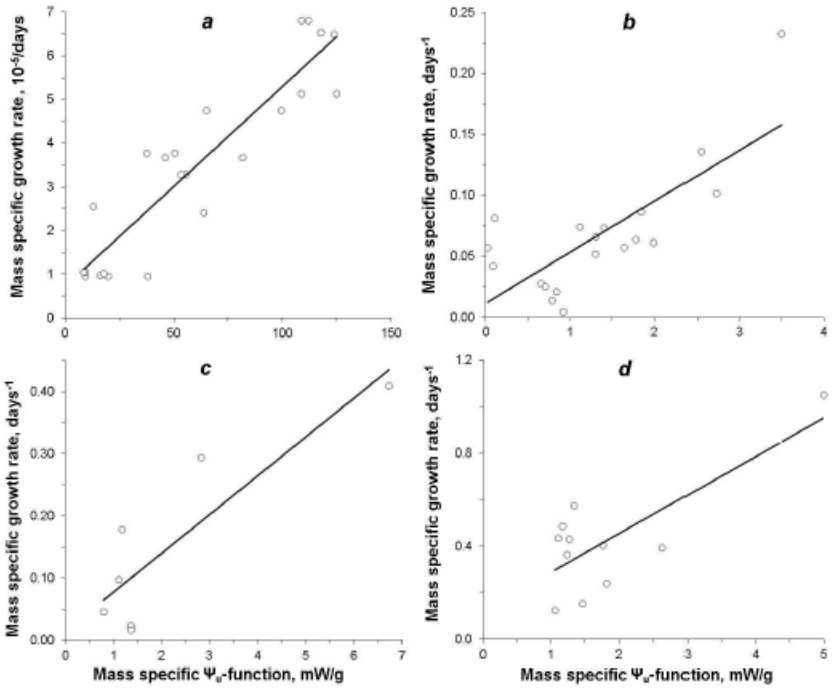

Рисунок 7.2 - Зависимость удельной скорости роста от ψ_u-функции. Виды: a – дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (по Schaarschmidt et al. [1]); b – личинки сверчков *Acheta domestica*; c – эмбрионы ящериц *Lacer taagilis*; d – куриныеэмбрионы*Gallus domesticus* (согласно Клейменову [2]). Зависимости аппроксимируются прямыми согласно уравнению (2).

7.3.3 Систематика в семействе Margaritiferidae (Bivalvia)

Опираясь на современные базы данных и другие источники, в которых упоминаются наименования родов и видов, включаемых в семейство Margaritiferidae, составлена синонимия родов и видов семейства. Всего в синонимию включено 132 родовых наименований, описанных хотя бы одним автором в составе сем. Margaritiferidae. Из них 33 наименования отнесено к сем. Margaritiferidae, 81 — к сем.Unionidae, 6 — к сем. Mycetopodidae, по 3 — к семействам Iridinidae и Pseudocardiniidae, 2 — к сем. Pteriidae, по 1 — к семействам Hyriidae, Malleidae, Plicatounionidae и Myidae.

В результате проведенного анализа предлагается среди современных моллюсков считать валидными 4 рода и 12 видов: *Cumberlandia monodonta*, *Margaritanopsis laosensis*, *Margaritifera dahurica*, *M. falcata*, *M. laevis*, *M. margaritifera*, *M. middendorffi*, *Pseudunio auricularius*, *P. hembeli*, *P. homsensis*, *P. marocanus*, *P. marrianae*.

Предлагаются следующие ключевые признаки для определения видов.

Определение родов.

1(4) Латеральный зуб на каждой створке один или отсутствует.

2(3) На левой створке раковины псевдо-кардинальный зуб отсутствует – *Cumberlandia monodonta*

3(2) Псевдо-кардинальные зубы имеются на обеих створках раковины – *Margaritifera*

4(1) На левой створке раковины 2–3 латеральных зуба.

5(6) На правой створке раковины 1 латеральный зуб – *Pseudunio*.

6(5) На правой створке раковины 2 латеральных зуба – *Margaritanopsis laosensis*

Определение видов рода *Margaritifera*.

1(4) Мантийные отпечатки многочисленны, хорошо различимы.

2(3) Передний выступ псевдо-кардинального зуба левой сворки хорошо развит. Латеральные зубы редуцированы – *M. margaritifera*

3(2) Передний выступ псевдо-кардинального зуба левой сворки редуцирован. Латеральные зубы ясно выражены – *M. laevis*

4(1) Мантийные отпечатки малочисленны или слабо различимы.

5(8) Латеральные зубы редуцированы или отсутствуют.

6(7) Псевдо-кардинальный зуб правой створки узко треугольный – *M. middendorffi*

7(6) Псевдо-кардинальный зуб правой створки пирамидальный – *M. dahurica*

8(5) Латеральные зубы ясно выражены – *M. falcata*

Определение видов рода *Pseudunio*

1(2) Почти вся задняя часть внешней поверхности раковины складчатая от дорзального до вентрального края – *P. marrianae*

2(1) Внешняя поверхность раковины гладкая или складки присутствуют только в дорзальной области задней части раковины.

3(6) Передний выступ псевдо-кардинальных зубов не соприкасается с дорзальным краем раковины.

4(5) Передний выступ псевдо-кардинального зуба левой створки редуцирован – *P. hembeli*

5(6) Передний выступ псевдо-кардинального зуба левой створки хорошо выражен – *P. marocanus*

6(5) Передний выступ псевдо-кардинальных зубов соприкасается с дорзальным краем раковины

7(8) Мантийные отпечатки многочисленны, хорошо различимы – *P. auricularius*

8(7) Мантийные отпечатки малочисленны, плохо различимы – *P. homsensis*

7.3.4 Сопоставимый стандартный обмен в эволюции животных

Показано, что средние для отрядов значения сопоставимого стандартного обмена группируются вокруг определенных значений, предположительно соответствующих стационарным состояниям, к которым стремятся организмы в процессе эволюции. Обнаружено значительное различие по сопоставимому стандартному обмену у пойкилотермных и гомойотермных животных, связанное, по-видимому, с существованием теплового барьера, который преодолевается путем возникновения терморегуляции. Всего для животных выделено 12 уровней стационарных состояний. Установлено, соотношение значений сопоставимого стандартного обмена для соседних уровней составляет ~2.2, что свидетельствует об определенной закономерности формирования последовательных стационарных уровней в прогрессивной макроэволюции. Отмечено, что в процессе макроэволюции типов и классов входящие в их состав отряды занимают все более высокие стационарные уровни (рисунок 7.3).

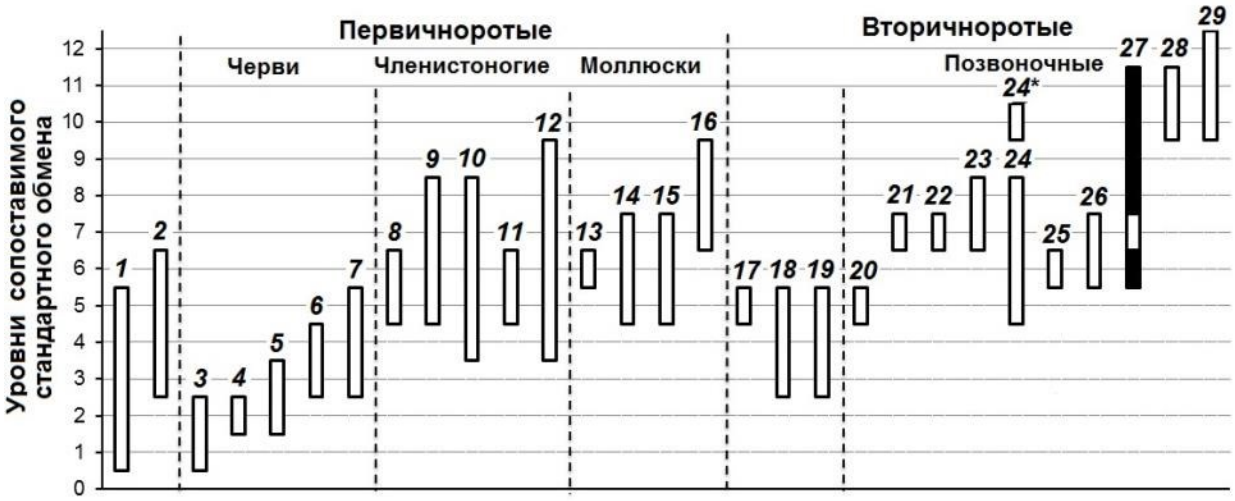

Рисунок 7.3 - Распределение таксонов по уровням сопоставимого стандартного обмена. По оси ординат – номер энергетического стационарного уровня. Таксоны: 1 – Protozoa, 2 – Ctenophora, Cnidaria, 3 – Gnathostomulida, 4 – Sipuncula, 5 – Nematoda, 6 – Plathelminthes, 7 – Annelida, 8 – Myriapoda, 9 – Crustacea, 10 – Arachnida, 11 – Collembola, 12 – Insecta, 13 – Polyplacophora, 14 – Bivalvia, 15 – Gastropoda, 16 – Cephalopoda, 17 – Chaetognatha, 18 – Echinodermata, 19 – Tunicata, 20 – Leptocardii, 21 – Cephalaspidomorphi, 22 – Myxini, 23 – Elasmobranchii, 24 – Actinopterygii (* – Scombridae), 25 – Sarcopterygii, 26 – Amphibia, 27 – Reptilia (не закрашено – современные, закрашено – вымершие), 28 – Aves, 29 – Mammalia.

7.3.5 Индивидуальный рост моллюсков

Оценка коэффициентов уравнения Берталанфи дает следующие значения:

Margaritifera margaritifera (р. Сюскюянйоки) - a = 0.114 ± 0.003 год$^{-1}$; d = 13.1 ± 0.3 мм/год.

Margaritifera margaritifera (р. Ливойоки) - $a = 0.060 \pm 0.006$ год$^{-1}$; $d = 7.2 \pm 0.3$ мм/год.

Planorbarius corneus - $a = 0.049 \pm 0.004$ нед$^{-1}$; $d = 0.27 \pm 0.02$ мг/год.

7.4 Список использованных источников

1 Bolotov I.N., Makhrov A.A., Gofarov M.Yu., Aksenova O.V., Aspholm P.E., Bespalaya Yu.V., Kabakov M.B., Kolosova Yu.S., Kondakov A.V., Ofenböck T., Ostrovsky A.N., Popov I.Yu., von Proschwitz T., Rudzīte M., Rudzītis M., Sokolova S.E., Valovirta I., Vikhrev I.V., Vinarski M.V., Zotin A.A. Climate warming as a possible trigger of keystone mussel population decline in oligotrophic rivers at the continental scale//Sci. Rtp. UK.- 2018. - Vol. 8, No 35. - P. 1 - 9.

2 Zotin A.A., Pokrovskii V. The growth and development of living organisms from the thermodynamic point of view//Physica A: Statistical Mechanics and its Applications. - 2018. - P. 1 - 19.

3 ЗотинА.А. Синонимиявсемействе Margaritiferidae (Bivalvia, Unionida)//Invertebrate Zoology. - 2018. - Vol. 15, No 1. - P. 131 - 152.

4 Болотов И.Н., МахровА.А., Вихрев И.В., Беспалая Ю.В., Зотин А.А., Клишко О.К. Научное наследие В.И. Жадина и современная малакология: определитель пресноводных жемчужниц (Bivalvia: Unionoida: Margaritiferidae) фауныРоссии//ТрудыКарНЦРАН. - 2018. - No 8. - P. 3 - 14.

5 Зотин А.А. Определение родов и видов семейства Margaritiferidae (Bivalvia, Unionida)//Актуальные вопросы современной малакологии: сборник научных трудов всероссийской научной конференции с международным участием. - Белгород: ИД "Белгород" НИУ "БелГУ", - 2017. - С. 38 - 42.

6 Zotin A.A. Definition of genera and species of the family Margaritiferidae (Bivalvia, Unionida)//East Eur. Sci. J. - 2017. - Vol. 1, No 10(26), Part 1. - P. 4 - 10.

7 Зотин А.А. Энергетическая макроэволюция беспозвоночных животных//Изв. РАН. Сер.биол. - 2018. - No 1. - С. 5 - 15.

8 Зотин А.А. Энергетическая макроэволюция позвоночных животных//Изв. РАН. Сер.биол. - 2018. - No 4. - С. 341 - 351.

9 Зотин А.А. Энергетический гомеостаз в биологической и социальной эволюции//Жизнь Земли. - 2018. - Т. 40,No 3. - С. 324 - 334.

10. Зотин А.А., Иешко Е.П. Биоритмы роста пресноводной жемчужницы Margaritifera margaritifera (Bivalvia, Margaritiferidae). Популяция р. Сюскюянйоки (Карелия)//Онтогенез. - 2018. - Т. 49,No 4. - С. 233 - 241.

11. Зотин А.А. Индивидуальный рост Planorbarius corneus (Planorbidae, Gastropoda) в постличиночном онтогенезе//Онтогенез. - 2018. - Т. 49,No 6. - С. 371 - 378.

12. ZotinA.A., MurzinaS.A., IeshkoE.P. Growth biorhythms in the fresh water pearl mussel Margaritifera margaritifera (Bivalvia, Margaritiferidae). Livojoki river population (Karelia)//Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst. - 2018. - Vol. 419. - P. 44 - 51.

13. Schaarschmidt B., Zotin A.I., Brettel R., Lamprecht I. Experimental investigation of the bound dissipation function: change of the ψ_u-function during growth of yeast//Arch. Microbiol. - 1975. - Vol. 105. -P. 13 - 16.

14. Клейменов С.Ю. Интенсивность энергетического обмена в раннем онтогенезе животных по данным прямой и непрямой калориметрии. Дис. канд. биол. наук. М.: ИБР АН СССР. 1996.

15. Database of palaentological fossils. China. - 2005. http://159.226.74.248:8000

16. Graf D., Cummings K. The MUSSEL Project: MUSSELp. - 2018. http://mussel-project.uwsp.edu/

17. Galli C. Family: Margaritiferidae // WMSDB - Worldwide Mollusc Species Data Base by Bagni Liggia. - 2015. http://www.bagniliggia.it/WMSD/HtmFamily/ MARGARITIFERIDAEL.htm

18. Global Names Index. Scientific Names Exchange.- 2016. http://gni.globalnames.org/

19. Paleobiology Database. Fossilworks. - 2017. http://fossilworks.org.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ регуляции различных этапов индивидуального развития представляет несомненный интерес для понимания целостности онтогенетических процессов, а также специфических механизмов контроля дифференцировки и формообразования различных тканей и органов.

В ходе гаметогенза (сперматогенеза и оогенеза) происходит формирование половых клеток и регуляция этих основополагающих процессов на молекулярном и клеточном уровнях предопределяет последующее эмбриональное развития. При изучении дифференцировки клеток Сертоли семенников мыши было показано, что ростовые факторы LIF, IGF-1, FGF2 и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) снижают экспрессию транскрипционного фактора Dmrt1. Важный результат был получен при использовании ингибитора YAC, которыйне влияет на экспрессию Dmrt в культуре, но меняет морфологию клеток в сторону эпителизации. Поскольку клетки Сертоли играют принципиальную роль в регуляции сперматогенеза, полученные данные дополняют представления о механизмах действия факторов роста и ФСГ на процессы формирования сперматозоидов.

Существенные результаты были получены при изучении метаболизма серотонина в фолликулах мыши. В овариальном фолликуле экспрессируется специфический мембранный транспортер серотонина Sert. Получены доказательства важной роли материнского серотонина в фолликулах этих животных. Была построена также корреляционная матрица для анализа экспрессии референсных генов (RPLPO, RPS18 и RPL4) в тканях яичника человека.

Особенности морфогенезов в раннем развитии книдарий, дифференцировка первичной оси тела с участием Wnt-каскада у этих организмов - первый этап эволюции онтогенезов животных, лежащий в основе последующих эволюционных преобразований. На представителе актиний Nematostella было установлено, что агрегат их эмбриональных клеток способен формировать нормальный план строения, используя для этого нетипичные для этих организмов траектории онтогенеза.

Становление первичной оси тела основано на активности Wnt-каскада. Известно, что формирование нервной трубки у позвоночных происходит в результате индукционного воздействия зачатка хорды,который секретирует сигнальные молекулы Shh (Sonichedgehog), кодируемые геном *shh*. Было показано, что у кролика экспрессия *shh* впервые выявляется в

зачатке хорды, и только потом детектируется в области нервной трубки, что соответствует общепринятой модели. Однако у курицы ген *shh* экспрессируется в проспективной нейроэктодерме еще до формирования хорды, что является важным дополнением к существующей модели индукции нервной трубки. Эти различия указывают на эволюционную дивергенцию механизмов индукции для нервной трубки. Предполагается, что эта пластичность связана с изменением гаструляционных морфогенезов.

При изучении влияния климата на рост пресноводных жемчужниц *Margaritifera margaritifera* из 50 рек Европы было показано, что основным индикатором роста изученного вида двустворчатых моллюсков в условиях глобального потепления является выпуклость раковины. Эти данные можно использовать в качестве тест-системы для оценки воздействия климата. На основании ревизии семейства Margaritiferidae (Bivalvia) составлен новый определитель видов, принадлежащих к данному семейству, а также предложена филогения этой группы моллюсков.

При анализе влияния гипоксии на энергетический метаболизм и некоторые физиологические параметры развивающегося сердца в эмбриогенезе кур были получены новые данные о ролиионов кальция в этих процессах. Было установлено, что кальций оказывает влияние на ритмическую сократительную активность сердца. Показано, в частности, участие двупоровых кальциевых каналов в спонтанной сократительной активности сердца. Кроме того, эти каналы участвуют в мобилизации ионов кальция из эндолизисом при активации этого процесса при помощи NAADP.

Для диагностики патологических изменений трофобласта плаценты у женщин, больных преэклампсией, был проведен анализ общей и фетальной ДНК, а также ряда цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10). У больных наиболее заметными были изменения общей и фетальной внеклеточной ДНК, а также цитокинов - макрофагальных факторов ИЛ-10 и ИЛ-6. Предполагается, что развитие этой патологии протекает при повышенной макрофагальной активности, которая приводит к разрушению клеток трофобласта плаценты.

Для понимания молекулярных механизмов термостабильности белков необходимо исследование этих молекул, выделенных из различных источников (базидиомицеты, термофильные бактерии, млекопитающие – кролики). Установлено, что повышенная термостабильность ферментов J. nitida, и S. bourdotii не является приспособлением к температуре обитания, а может быть фактором увеличения сродства к субстрату за счёт

большей стабильности молекулы. Анализ распределения возможных стабилизирующих взаимодействий аминокислотных остатков позволил увеличить термостабильность формиатдегидрогеназы дрожжей на 12 градусов заменой трёх аминокислот.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГОСЗАДАНИЯ ЗА 2018 ГОД

*отчетные публикации

1 *Mudzhiri N.M., Zakhidov S.T., Rudoy V.M., Dement'eva O.V., Makarov A.A., Makarova I.V., Zelenina I.A., Andreeva L.E., **Marshak T.L.** Cytogenetic Activity of Gold Nanoparticles in Germ and Somatic Cells of 129 Mice with a Nonsense Mutation in the DNA Polymerase Iota Gene//Biology Bulletin - 2018. - Vol. 45. Is. 2. P. 119-125. DOI: 10.1134/S1062359018020085. (WoS, Scopus) – Муджири Н.М., Захидов С.Т., Рудой В.М., Дементьева О.В., Макаров А.А., Макарова И.В., Зеленина И.А., Андреева Л.Е., Маршак Т.Л. Цитогенетическая активность наночастиц золота в половых и соматических клетках мышей линии 129/IMG, мутантных по генуДНК-полимеразы йота//ИзвестияРАН. Сер.биол. - 2018. № 2. С. 137 - 143. DOI: 10.7868/S0002332918020017. (РИНЦ)

2 *Krasnyi A.M., Gracheva M.I., Sadekova A.A., Vtorushina V.V., Balashov I.S., Kan N.E., Borovikov P.I., Krechetova L.V., Tyutyunnik V.L. Complex Analysis of Total and Fetal DNA and Cytokines in Blood Plasma of Pregnant Women with Preeclampsia//Bulletin of Experimental Biology and Medicine - 2018. P. 721 - 725. DOI: 10.1007/s10517-018-4066-1. (WoS, Scopus)

3 Karapetyan A.O., Baev O.R., Krasnyi A.M., Sadekova A.A., Mullabaeva S.M. Extracellular DNA in the Dynamics of Uncomplicated Pregnancy//Bulletin of Experimental Biology and Medicine - 2018. DOI: 10.1007/s10517-018-4295-3. (WoS, Scopus).

4 Krasnyi A.M.,Khachaturyan A.A., Kan N.E., Khachatryan Z.V., Tyutyunnik V.L., Volgina N.E., Ganichkina M.B., Mantrova D.A., Sadekova A.A. The role e-kadherin in the formation of intrauterine growth restriction//Akusherstvo i Ginekologiya (Russian Federation). - 2018. - V. 6. P. 38-43. DOI: 10.18565/aig.2018.6.38-43). (Scopus). - Красный А.М., Хачатурян А.А., Кан Н.Е., Хачатрян З.В., Тютюнник В.Л., Волгина Н.Е., Ганичкина М.Б., Мантрова Д.А., Садекова А.А. Роль е-кадгерина в формировании задержки роста плода//Акушерство и гинекология - 2018. - № 6. С. 38 - 43. DOI: 10.18565/AIG.2018.6.38-43. (РИНЦ)

5 ***Nikishin D.A.,** Filatov M.A., Kiseleva M.V., Bagaeva T.S., Konduktorova V.V., Khramova Y.V., Malinova I.V., Komarova E.V., Semenova M.L. Selection of stable expressed reference genes in native and vitrified/thawed human ovarian tissue for analysis by qRT-PCR and Western blot//Journal of Assisted Reproduction and Genetics - 2018. - Vol. 35. Is.10. P. 1851 - 1860. DOI: 10.1007/s10815-018-1263-9**.**

6 *Шмуклер Ю.Б., Никишин Д.А. Трансмиттерные системы в эмбриогенезе – современное состояние проблемы//Успехи физиологических наук. - 2018. - Vol. 49, No. 4. P. 81 - 92. DOI: 10.7868/S0301179818040069.

7 *Nikishin D.A.,Khramova Y.V., Bagayeva T.S., Semenova M.L., Shmukler Y.B. Expression of Components of the Serotonergic System in Folliculogenesis and Preimplantation Development in Mice//Russian Journal of Developmental Biology - 2018. - V. 49.N 3.P. 184 - 192. DOI: 10.1134/S1062360418030062. (WoS, Scopus) - Никишин Д.А., Храмова Ю.В., Багаева Т.С., Семёнова М.Л., Шмуклер Ю.Б. Экспрессия компонентов серотонинергической системы в фолликулогенезе и доимплантационном развитии мыши//Онтогенез - 2018. - Т. 49. No 3. С. 208 – 216. DOI: 10.7868/S0475145018030072. (РИНЦ)

8 *Никишин Д.А., Алешина Н.М., Шмуклер Ю.Б. Синтез и мембранный транспорт серотонина в развивающемся овариальном фолликуле мыши//Доклады Академии наук. - 2018. - Т. 478, No. 1., - С. 103 - 106

9 ***Kremnyov S.,** Henningfeld K., Viebahn C., Tsikolia N. Divergent axial morphogenesis and early shh expression in vertebrate prospective floor plate//EvoDevo - 2018. - Vol. 9. N 1. P. 4. DOI: 10.1186/s13227-017-0090-x. (WoS, Scopus)

10 *Kirillova A., Genikhovich G., Demilly A., Pukhlyakova E., **Kraus Y**., Technau U. Germ layer commitment and axis formation in sea anemone embryonic cell aggregates//Proceedings of the National Academy of Sciences - 2018. - Vol. 115. N 8. P. 1813 – 1818. DOI: 10.1073/pnas.1711516115. (WoS, Scopus)

11 ***Сухопутова А.В., Краус Ю.А.,** Кириллова А.О., Марков А.В. Дифференцировка орально-аборальной оси и основных морфологических структур тела в жизненном цикле Scyphozoa//Журнал общей биологии - 2018. - Т. 79. № 5. С. 342 - 362. DOI: 10.1134/S0044459618050093. (РИНЦ)

12 *Kleimenov S.Yu. Energy cost of ontogenesis as a marker of the quality of the habitat (Tests on Daphnia magna and Carassiusauratus)//Russian Journal of Developmental Biology - Vol. 49. N. 1. P. 18 - 22. DOI: 10.1134/S1062360418010022. (WoS) - Клейменов С.Ю. Энергетическая цена онтогенеза как показатель качества среды обитания (тесты на Daphnia magna и Carassius auratus)//Онтогенез. - 2018. - Т. 49. № 1. С. 22 - 26. DOI: 10.7868/S0475145018010032. (РИНЦ)

13 *Matyushenko A.M., **Kleymenov S.Y**., Susorov D.S., Levitsky D.I. Thermal unfolding of homodimers and heterodimers of different skeletal-muscle isoforms of tropomyosin//Biophysical Chemistry - 2018. - Vol. 243. P. 1 - 7. DOI: 10.1016/j.bpc.2018.09.002. (Scopus).

14 *Timofeev V.I., Altukhov D.A., Talyzina A.A., Agapova Y.K., Vlaskina A.V., Korzhenevskiy D.A., **Kleymenov S.Y.,** Bocharov E.V., Rakitina T.V. Structural plasticity and thermal stability of the histone-like protein from Spiroplasmamelliferum are due to phenylalanine insertions into the conservative scaffold//Journal of Biomolecular Structure and Dynamics - 2018. P. 1 - 13. DOI: 10.1080/07391102.2017.1417162. (WoS, Scopus)

15 Pometun A.A., Kleymenov S.Y., Zarubina S.A., Kargov I.S., Parshin P.D., Sadykhov E.G., Savin S.S., Tishkov V.I. Comparison of Thermal Stability of New Formate Dehydrogenases by Differential Scanning Calorimetry//Moscow University Chemistry Bulletin - 2018. - Vol. 73. N 2. P. 80 - 84. DOI: 10.3103/S002713141802013X. (WoS, Scopus) - Пометун А.А., Клейменов С.Ю., Зарубина С.А., Каргов И.С., Паршин П.Д., Садыхов Э.Г., Савин С.С., Тишков В.И. Сравнение термостабильности новых формиат дегидрогеназ с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии//Вестник Московского университета. Серия 2: Химия - 2018. - Т. 59. № 2. - С. 164 - 169. (РИНЦ)

16 Pometun A.A., Zarubina S.A., Kargov I.S., Kleimenov S.Y., Sadykhov E.G., Savin S.S., Tishkov V.I. Comparative study of thermal stability of formate dehydrogenases from different sources//FEBS OPEN BIO. - 2018. - Vol. 8. P. 187 - 187. WOS:000437674102256. (WoS, Scopus)

17 Zarubina S., Pometun A., Kleymenov S., Savin S., Tishkov V. Rational design of formate dehydrogenase from the thermotolerant yeast Ogataeaparapoly morpha//FEBS OPEN BIO. - 2018. - Vol. 8. P. 186 - 186. WOS:000437674102252. (WoS, Scopus)

18 Клеймёнов С.Ю. Качество среды обитания и энергетическая цена онтогенеза//Жизнь Земли - 2018. - Т. 40. № 2. С. 158 - 162. (РИНЦ)

19 Glazunova O.A., Shakhova N.V., Psurtseva N.V., Moiseenko K.V., Kleimenov S.Y., Fedorova T.V. White-rot basidiomycetes Junghuhnia nitida and Steccherinum bourdotii: Oxidative potential and laccase properties in comparison with Trametes hirsuta and Coriolopsis caperata//PLoS ONE. - 2018. - Vol. 13. N 6. e0197667. DOI: 10.1371/journal.pone.0197667. (WoS, Scopus) Q1 - И

20 *Bolotov I.N., Makhrov A.A., Gofarov M.Yu., Aksenova O.V., Aspholm P.E., Bespalaya Yu.V., Kabakov M.B., Kolosova Yu.S., Kondakov A.V., Ofenböck T., Ostrovsky A.N., Popov I.Yu., von Proschwitz T., Rudzīte M., Rudzītis M., Sokolova S.E., Valovirta I., Vikhrev I.V.,

Vinarski M.V., Zotin A.A. Climate warming as a possible trigger of keystone mussel population decline in oligotrophic rivers at the continental scale//Sci. Rtp. UK.- 2018. - V. 8. N 35. - P. 1 - 9. - DOI: 10.1038/s41598-017-18873-y. (WoS, Scopus)

21 *Zotin A.A., Pokrovskii V. The growth and development of living organisms from the thermodynamic point of view//Physica A: Statistical Mechanics and its Applications - 2018. - P. 1 - 19. - DOI: 10.1016/j.physa.2018.08.094. (WoS, Scopus)

22 *Зотин А.А. Синонимия в семействе Margaritiferidae (Bivalvia, Unionida)//Invertebrate Zoology - 2018. - V. 15. N 1. - P. 131 - 152. Zotin A.A. Synonymy in the family margaritifera (Bivalvia: Unionidae)//Invertebrate Zoology – 2018. - Vol. 15, N 1. P. 131 - 152. DOI: 10.15298/invertzool.15.1.10. (Scopus)

23 *Болотов И.Н., Махров А.А., Вихрев И.В., Беспалая Ю.В., Зотин А.А., Клишко О.К. Научное наследие В.И. Жадина и современная малакология: определитель пресноводных жемчужниц (Bivalvia: Unionoida: Margaritiferidae) фауны России//Труды КарНЦ РАН - 2018. - N 8. - P. 3 - 14. . (РИНЦ)

24 Зотин А.А. Энергетическая макроэволюция беспозвоночных животных//Изв. РАН. Сер. биол. - 2018. - N 1. - С. 5 - 15. - DOI: 10.7868/S0002332918010010. (РИНЦ) - Zotin A.A. Energetic Macroevolution of Invertebrates // Biology Bulletin 2018 V. 45 N 1 DOI: 10.1134/S1062359018010156). (WoS, Scopus)

25 Зотин А.А. Энергетическая макроэволюция позвоночных животных//Изв. РАН. Сер. биол. - 2018. - N 4. - С. 341 - 351. DOI: 10.1134/S000233291804015X. (РИНЦ). - Zotin A.A. Energetic Macroevolution of Vertebrates//Biology Bulletin - 2018. - Vol. 45(4). P. 299 - 309. DOI: 10.1134/S1062359018040155). (WoS, Scopus)

26 Зотин А.А., Иешко Е.П. Биоритмы роста пресноводной жемчужницы Margaritifera margaritifera (Bivalvia, Margaritiferidae). Популяция р. Сюскюянйоки (Карелия)//Онтогенез - 2018. - Т. 49. - N 4. - С. 233 - 241. DOI: 10.1134/S047514501801007X - Zotin A.A., Ieshko E.P. Biorhythms of Margaritifera margaritifera (Bivalvia, Margaritiferidae) Freshwater Pearl Mussel Growth: Population of Syuskyuyanioki River (Karelia)//Russian Journal of Developmental Biology - V. 49. N 4. P. 206 - 213. DOI: 10.1134/S1062360418040082. (WoS)

27 Zotin A.A., Murzina S.A., Ieshko E.P. Growth biorhythms in the freshwater pearl mussel Margaritifera margaritifera (Bivalvia, Margaritiferidae). Livojoki river population (Karelia)//Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst. - 2018. - V. 419. - P. 44 - 51. - DOI: 10.1051/kmae/2018033

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