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

УДК 577.25
Рег. № ГЗ 0108-2019-0002
Рег. № НИОКТР АААА-А19-119040290080-6

УТВЕРЖДАЮ
Врио директора ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

_____ А.В. Васильев

«29» декабря 2020 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

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

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

(заключительный отчет)

Руководитель НИР,
заместитель директора по научной работе,
доктор биологических наук — Н.П. Шарова
29.12.2020
подпись, дата

Руководитель НИР,
главный научный сотрудник,
доктор биологических наук — И.С. Захаров
29.12.2020
подпись, дата

Москва 2020

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, заместитель директора по научной работе, доктор биологических наук	29.12.2020 подпись, дата	Н.П. Шарова (раздел 1)
Руководитель, главный научный сотрудник, доктор биологических наук	29.12.2020 подпись, дата	И.С. Захаров (раздел 4)
Исполнители: Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор	29.12.2020 подпись, дата	Л.А. Захарова (раздел 1)
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	29.12.2020 подпись, дата	Т.М. Астахова (раздел 1)
Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор	29.12.2020 подпись, дата	В.С. Михайлов (раздел 3)
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук	29.12.2020 подпись, дата	Ю.В. Люпина (раздел 3)
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор РАН	29.12.2020 подпись, дата	В.Е. Дьяконова (раздел 4)
Старший научный сотрудник, кандидат философских наук	29.12.2020 подпись, дата	К.С. Шаров (раздел 2)
Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор	29.12.2020 подпись, дата	П.В. Авдонин (раздел 5)
Нормоконтроль, руководитель информационно-аналитического отдела, кандидат биологических наук	29.12.2020 подпись, дата	Е.Б. Абрамова

РЕФЕРАТ

Отчет 92 с., 1 кн., 5 разделов, 29 рис., 4 табл., 115 источн., 14 отчетных публикаций

РАННИЙ ОНТОГЕНЕЗ, ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ ВЫБОР, РАЗВИТИЕ ОПУХОЛЕЙ, МОРСКИЕ ГУБКИ, МОЛЛЮСКИ, НАСЕКОМЫЕ, ГРЫЗУНЫ, ВИРУСЫ, ПРОТЕАСОМЫ, ЭСТРОГЕНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, ФАКТОР ВИЛЛЕБРАНДА, НЕЙРОЭНДОКРИННАЯ СИСТЕМА, ИММУННАЯ СИСТЕМА

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

Выявлено значительное увеличение экспрессии субъединицы LMP2 протеасом в спонтанно возникающих опухолях молочной железы инбредных мышей BLRB/BYRB, что совпадает с данными по раку молочной железы человека в отсутствие эстрогеновых рецепторов. Результаты указывают на перспективы применения субъединицы LMP2 в качестве новой мишени для терапии данного типа рака. Показано, что иммуноглобулин G коррегирует репродуктивные расстройства (через цАМФ-зависимый путь), вызванные липополисахаридом в эмбриогенезе, что важно для разработки подходов к коррекции нарушений в развивающейся репродуктивной системе уже на ранних стадиях.

Создана уникальная модель формирования популяционного иммунитета к новому коронавирусу SARS-CoV-2 на основании баз данных результатов RT-PCR диагностики и иммунологического тестирования населения в разных странах в различных экологических средах. Спрогнозирован 3-6%-ный уровень популяционного иммунитета для России. Введение «локдаунов» в некоторых странах в настоящее время идет вразрез с данными о поведении вируса.

Выявлены молекулярные механизмы устойчивости к гипоксии холодноводных морских губок *Halichondria panicea* и *Halisarca dujardinii* акватории Белого моря и установлено сходство и отличия факторов обмена железа с таковыми у других животных, в том числе млекопитающих. Получены данные, подтверждающие координирующую роль нейроактивного состава межклеточной среды, обеспечивающей адаптацию к изменяющимся окружающим условиям. Показана активация ориентировочно-исследовательского поведения при усилении локомоторной нагрузки в условиях неопределенности у филогенетически удаленных видов беспозвоночных.

Разработан метод оценки экспрессии фактора Виллебранда в эндотелиальных клетках с помощью флуоресцентно меченого аптамера, что принципиально важно для его исследования, в том числе при патологических состояниях.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ…….....5
ВВЕДЕНИЕ……...…….....6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ…….....9
РАЗДЕЛ 1 РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ ИНТЕГРИРУЮЩИХ СИСТЕМ В ОНТОГЕНЕЗЕ: РОЛЬ ПРОТЕАСОМ, ГОРМОНОВ И ЦИТОКИНОВ В АДАПТАЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ……..9
Подраздел 1.1 Протеасомные механизмы раннего онтогенеза иммунной системы и развития опухолей. Поиск приложения к медицинской практике……..…..9
Подраздел 1.2 Механизмы взаиморегуляции развития нейроэндокринной и иммунной систем ……..…..21
РАЗДЕЛ 2 МОДЕЛИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСОВ И АДАПТАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПОПУЛЯЦИИ……35
РАДЕЛ 3 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ У БЕСПОЗВОНОЧНЫХ……..52
РАЗДЕЛ 4 МЕХАНИЗМЫ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ВЫБОРА И РАЗВИТИЯ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ……...65
РАЗДЕЛ 5 РЕЦЕПТОРЫ И СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ В КЛЕТКАХ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ…….....80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ…….88
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ……..90

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

АПФ2 – ангиотензин превращающий фермент 2;

в/в, в/б – внутривенно, внутрибрюшинно;

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота;

ЛДГ – лактатдегидрогеназа;

ЛПС – липополисахарид;

мРНК – матричная РНК;

ПААГ – полиакриламидный гель;

ПНД – постнатальный день;

по – пары оснований;

ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени;

ТТП – тромботическая тромбоцитопеническая пурпура;

ФВ – Фактор Виллебранда;

ХТП активность – химотрипсинподобная активность;

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат;

ЦГП – центральные генераторы паттернов;

ЭД – эмбриональный день;

ЭК – эндотелиальные клетки;

ALA – 5-аминолевулинат;

CTA – conditioned taste aversion;

ER – эстрогеновый рецептор (Подраздел 1.1);

ER – группа животных с отдыхом (Раздел 4);

GFP - зеленый флуоресцентный белок;

IgG – иммуноглобулин G;

L-ДОФА – L-3,4-дигидроксифенилаланин;

LTM – долговременная память;

MG-132 – ингибитор протеасом;

MHC – major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости;

MIR – miRNA;

PIR – population infection rate, уровень зараженности населения;

SIR – “susceptible – infected – recovered”, модель «восприимчивые – инфицированные – выздоровевшие»;

19S RC – регуляторный комплекс 19S;

TLR - Toll-рецепторы.

ВВЕДЕНИЕ

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

Одна из задач работы (Подраздел 1.1) – выявление субтипов протеасом, участвующих в развитии рака молочной железы. Для решения этой задачи выбрана уникальная модель инбредных мышей BLRB/BYRB, характеризующихся высокой вероятностью спонтанного развития этого типа рака. Модель хороша тем, что позволяет исследовать истинный контроль – молочные железы здоровых мышей – в отличие от условно контрольных послеоперационных образцов ткани, прилежащей к опухоли, доступных для изучения этого заболевания у человека. Вместе с тем, нужно учитывать большую гетерогенность и более сложную регуляцию развития рака молочной железа у человека. Существенным фактором, влияющим на рост опухолей молочной железы человека, является наличие/отсутствие эстрогеновых рецепторов, функции которых, в свою очередь, контролируются убиквитин-протеасомной системой. Поэтому вторая задача подраздела связана с анализом литературных и собственных данных о взаимодействии убиквитин-протеасомной системы и эстрогеновых рецепторов, в том числе в опухолях молочной железы. Выполнение работ по Подразделу 1.1 может выявить новые мишени для терапии рака молочной железы.

В рамках Подраздела 1.2, затрагивающего изучение взаиморегуляции развития нейроэндокринной и иммунной систем, поставлено несколько задач. К их числу относятся исследование негативного влияния бактериального липополисахарида, который вводили самке крысы на ранних сроках беременности, на половое созревание потомства самцов мышей; поиск способов устранения/ослабления этого влияния, в том числе с помощью иммуноглобулина G; исследование возможного механизма действия последнего на цАМФ-зависимый регуляторный путь. Результаты этой работы могут быть полезными для разработки рекомендаций по коррекции наруший у потомства, вызванных воспалением у матери во время беременности.

Раздел 2 посвящен созданию моделей распространения нового коронавируса SARS-CoV-2. Эффективность практически повсеместного введения «локдаунов» и отключения экономик, предпринятых весной 2020 года и продолжающихся в настоящее время в некоторых странах, например, в Германии, Франции, Австрии или Великобритании для остановки пандемии нового коронавируса, является по большей

части непроверенной. Это диктует необходимость разработки моделей, которые позволили бы прояснить данный вопрос. В настоящее время создано несколько типов математических моделей распространения SARS-CoV-2, как теоретических, так и вычислительных. Цель нашей работы – разработать оригинальную вычислительную модель, которая дала бы возможность сравнивать данные по разным странам, экосистемам и типам популяционного окружения и оценивать эффективность карантинных мер.

Раздел 3 касается исследования регуляции протеома клеток насекомых при инфекции бакуловирусами и роли метаболизма железа в пластичности губок. Способность реагировать на гипоксию развивалась у предковых форм беспозвоночных и связана с регуляцией гомеостаза железа. Морские губки (тип Porifera) - наиболее древние из существующих Metazoa, развиваются только в присутствии ионов железа, устойчивы к гипоксии и являются уникальной природной моделью для исследования закономерностей метаболизма железа. В работе была поставлена задача исследования молекулярных механизмов устойчивости к гипоксии холодноводных морских губок *Halichondria panicea* и *Halisarca dujardinii* акватории Белого моря.

Изучение инфекционного цикла бакуловирусов представляет интерес для фундаментальной биологии и имеет важность для практического применения вирусов: в биотехнологии для продукции белков, сельском хозяйстве для борьбы с насекомыми вредителями и в медицине для создания вакцин. В отчетный период нами начато исследование поздних стадий вирусной инфекции, приводящих к формированию белковых тел включения правильной формы (полиэдров) и второго типа зрелых вирусов, которые обеспечивают сохранение вируса в окружающей среде и инфицирование популяций насекомых.

Работа коллектива по Разделу 4 направлена на решение фундаментальной проблемы клеточных и молекулярных механизмов формирования поведенческих программ в онтогенезе и адаптивной перестройки таких программ у зрелых организмов. В основе, как запуска, так и реализации поведенческих программ лежит активность химически разнородных нейронов. Беспозвоночные животные (моллюски и насекомые), выбранные для исследований, являются классическими модельными объектами для решения проблем нейробиологии. Одно из основных направлений исследований в настоящем разделе связано с определением роли химических факторов в механизмах организации поведения. Выполнение работ по Разделу 4 позволит изучить роль нейромедиаторов как регуляторов, действующих на протяжении всего онтогенеза.

В Разделе 5 продолжено исследование фактора Виллебранда (ФВ), который играет ключевую роль в первичном гемостазе. Основное внимание было обращено на регуляцию

секреции ФВ эндотелиальными клетками (ЭК). Для успешной работы в данной области требовалось преодоление ограничений используемых моделей и методов. Поэтому важной задачей работы стал поиск подхода для окрашивания ФВ в живой культуре эндотелиальных клеток. Нарушение обмена ФВ вызывает развитие особой формы тромботической микроангиопатии – тромботической тромбоцитопенической пурпуры. Часть работы посвящена поиску препаратов, применение которых позволило бы вывести пациента с данным заболеванием в состояние устойчивой ремиссии.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

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

Подраздел 1.1 Протеасомные механизмы раннего онтогенеза иммунной системы и развития опухолей. Поиск приложения к медицинской практике

1.1.1 Введение

Выявление молекулярных механизмов возникновения и роста злокачественных опухолей различной этиологии является одной из наиболее актуальных задач современной биологии. В этой связи представляется перспективным исследование протеасом – «вездесущих» мультисубъединичных протеаз, осуществляющих важнейший метаболический путь и теоретически способных расщепить любой клеточный белок. Клетки млекопитающих обладают самым многочисленным набором множественных форм протеасом, различающихся структурой и способами распознавания и гидролиза тех или иных белковых субстратов. Особое место в пуле протеасом млекопитающих принадлежит иммунным протеасомам, содержащим протеолитические субъединицы LMP2 (β1i), LMP10 (MECL1, β2i) и LMP7 (β5i) соответственно вместо субъединиц β1, β2 и β5 конститутивных протеасом [1]. Иммунные протеасомы эффективно образуют антигенные эпитопы для молекул главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса I и благодаря этому являются важными участниками развития иммунных реакций. Однако функции иммунных протеасом в иммунных процессах не ограничиваются образованием антигенных эпитопов. Недавно обнаружено, что форма иммунных протеасом с субъединицей LMP2 (но не LMP7), экспрессирующаяся в клетках аллотрансплантата у крыс, связана с развитием иммунологической толерантности независимо от донор-реципиентных различий [2]. Множественные формы протеасом отличаются не только набором протеолитических субъединиц, но и присутствием или отсутствием различных регуляторов. Так, регуляторный комплекс19S (19S RC или активатор PA700) распознает убиквитинированные полноразмерные белки и осуществляет их продвижение в протеолитическую камеру протеасомы. Напротив, активаторы PA28αβ и PA200 способствуют утилизации небольших полипептидов независимо от убиквитина. Для нормального функционирования организма необходимо поддержание соотношения множественных форм протеасом, строго определенного для каждого типа клеток.

Неудивительно, что для ряда злокачественных опухолей человека показано изменение субъединичного состава протеасом. Вместе с тем, следует учитывать, что

исследование злокачественных опухолей человека имеет серьезное ограничение – отсутствие корректного контроля. В качестве контроля, как правило, используется прилежащая к опухоли ткань, которую можно рассматривать только как условно нормальную. Поэтому в дополнение к образцам злокачественных тканей пациентов полезно изучение модельных опухолей животных, позволяющих использовать более адекватный контроль.

Задача настоящей работы – исследовать особенности пула протеасом злокачественных опухолей молочной железы на уникальной модели инбредных мышей BLRB/BYRB, характеризующихся высокой вероятностью спонтанного развития этого типа рака [3, 4]. Следует подчеркнуть, что злокачественные опухоли молочной железы человека – гораздо более сложные гетерогенные новообразования, чем опухоли инбредных мышей. Одним из факторов, влияющих на развитие рака молочной железы человека, является наличие/отсутствие эстрогеновых рецепторов (ER), которые, в свою очередь, могут быть субстратами убиквитин-протеасомной системы. Вторая задача работы связана с анализом литературных и своих собственных данных о взаимодействии между убиквитин-протеасомной системой и ER, в том числе в клетках опухолей молочной железы.

Подобные исследования важны для детального анализа и сравнения тонких различий в экспрессии отдельных субъединиц и/или субкомплексов протеасом в злокачественных опухолях животных и человека, что может быть перспективно для разработки новых способов терапии и диагностики онкологических заболеваний.

1.1.2 Материалы и методы

Животные. Работу выполняли на опухолях молочной железы самок инбредных мышей близкородственных линий BLRB-Rb(8.17)1Iem и BYRB-Rb(8.17)1Iem (далее BLRB и BYRB соответственно) [3, 5], характеризующихся высокой частотой спонтанно проявляющегося рака молочной железы у рожавших самок [4]. Мыши поддерживались в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук в стандартных тщательно контролируемых условиях вивария, еженедельно в колонии стареющих самок выявляли вновь появляющиеся опухоли молочной железы. Экспериментальные манипуляции с животными проводили в соответствии с международными нормами (US Department of Health and Human Services, National Institute of Health Publication No 93–23, revised 1985), протоколы исследования №№ 155/2014 и 24 от 27.12.2018 были одобрены Комиссиями по биоэтике соответственно ИБХ РАН и ИБР РАН. Использовали опухоли молочной железы самок мышей в возрасте

14–19 месяцев (таблица 1.1 и таблица 1.2). Контролем служили интактные ткани молочных желез самок мышей в возрасте 3 и 18 месяцев, не имеющих опухоли, а также непораженные опухолью молочные железы самки-опухоленосителя (таблица 1.1 и таблица 1.2). Каждый образец был разделен на четыре порции/фрагмента, которые исследовали в независимых экспериментах.

Таблица 1.1 - Описание самок мышей, взятых в эксперимент

№№	Линия	Возраст, месяцы	Размеры опухоли молочной железы, мм × мм × мм
1	BLRB	3	Нет
2	BLRB	18	Нет
3	BLRB	19	12 × 16 × 9
4	BLRB	14	12 × 16 × 8
5	BYRB	18	18 × 24 × 10

Таблица 1.2 - Описание образцов, взятых в эксперимент

Обозначение образца	Номер мыши	Ткань
I	1	Молочные железы нерожавшей самки
II	2	Молочные железы нерожавшей самки
III	5	Молочные железы без признаков рака самки-опухоленосителя
IV	3	Рак молочной железы
V	4	Рак молочной железы
VI	5	Рак молочной железы

Антитела. Для Вестерн-блоттинга использовали моноклональные антитела мыши к субъединицам α1,2,3,5,6,7 протеасом, субъединице Rpt6 регулятора 19S RC, поликлональные антитела кролика к иммунным субъединицам LMP2 и LMP7 протеасом, субъединице PA28α активатора PA28αβ (Enzo Life Sciences, США), моноклональные антитела мыши к β-актину (Santa Cruz Biotechnology, США), антитела козы к IgG мыши и кролика, конъюгированные с пероксидазой (Amersham Biosciences, Великобритания).

Определение химотрипсинподобной активности протеасом. Осветленные гомогенаты тканей получали в соответствии с опубликованным протоколом [6]. Химотрипсинподобную (ХТП) активность протеасом определяли в 1, 1,5 и 2 мкл осветленных гомогенатов тканей по гидролизу флуорогенного субстрата Suc-LLVY-AMC

(Sigma, США) в соответствии с методикой, описанной Ероховым П.А. с соавторами [7]. Реакцию проводили в течение 20 минут при 37°С. В этих условиях значения ХТП активности соответствовали прямолинейному отрезку графика зависимости количества гидролизуемого субстрата от времени реакции [7], что позволило сравнивать активность в разных пробах. Специфичность подтверждали с помощью ингибитора ХТП активности протеасом Z-leucyl-leucyl-leucinal (MG-132) (Sigma, США). Остаточная ХТП активность в пробах в присутствии 5 мкМ MG-132 составляла не более 10%. Увеличение концентрации ингибитора не изменяло значений остаточной активности. ХТП активность протеасом определяли как разницу между полной активностью в отсутствие MG-132 и остаточной активностью в присутствии 5 мкМ MG-132, выражали в количестве гидролизованного субстрата и нормализовали на 100 мкл осветленных гомогенатов.

Вестерн-блоттинг. После электрофореза осветленных гомогенатов в 13%-ном ПААГ в присутствии SDS (5 мкл на дорожку) полипептиды переносили с помощью мокрого блоттинга на нитроцеллюлозную мембрану. Обработку мембраны антителами к β актину (1:1000), субъединицам протеасом (1:1000) и активаторов протеасом (1:1500) осуществляли стандартным методом [7]. Для выявления неспецифического мечения белков проводили дополнительно обработку мембраны после переноса полипептидов антителами к IgG мыши. Оптическую плотность полос на рентгеновской пленке анализировали с помощью стандартной программы ImageJ.

Статистический анализ. Результаты представлены как среднее значений, полученных в четырех аналогичных экспериментах (исследовали четыре разных образца ткани каждой мыши, учитывая их возможную гетерогенность) и измеренных в трех параллельных пробах ± стандартная ошибка. Статистическую достоверность оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, достоверными считали различия при $p < 0{,}05$.

1.1.3 Результаты и обсуждение

Активность протеасом в злокачественных опухолях молочной железы мышей. В таблице 1.1 и таблице 1.2 приведено описание мышей и тканей, взятых в эксперимент. ХТП активность пула протеасом опухолей молочной железы достоверно не отличалась у исследованных самок мышей BLRB/BYRB, но в три раза превышала ХТП активность контрольных тканей молочной железы (рисунок 1.1) [8]. Примечательно, что активность протеасом была одинакова в молочных железах, взятых в качестве контрольных, несмотря

на то, что в это исследование вошли, во-первых, мыши разных возрастов и, во-вторых, мыши, не имеющие опухоли, и самка-опухоленоситель.

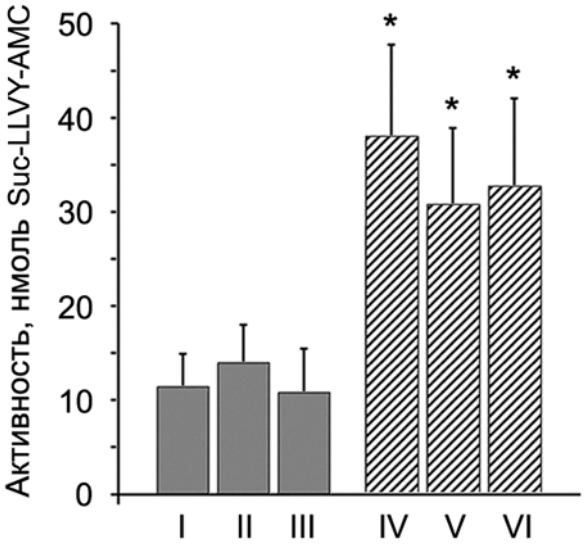

Рисунок 1.1 - Химотрипсинподобная активность протеасом в контрольных (I–III) и опухолевых тканях (IV–VI) молочных желез мышей

Активность приведена для 100 мкл осветленных гомогенатов тканей как среднее ± стандартная ошибка. *Достоверное отличие от образцов I, II и III ($p < 0{,}05$, n = 4).

Таким образом, ХТП активность пула протеасом поддерживается в устойчивом состоянии в молочных железах у мышей с указанными физиологическими различиями, но значительно нарушается при образовании патологической опухолевой ткани. Трехкратное повышение активности в опухоли могло быть связано как с аномально высокой экспрессией протеолитических субчастиц протеасом и/или изменением их субъединичного состава, так и с увеличением экспрессии регуляторов активности протеасом. Следующая часть настоящей работы посвящена выяснению этого вопроса.

Особенности экспрессии субъединиц протеасом и регуляторов активности протеасом в злокачественных опухолях молочной железы мышей. Тотальный пул протеасом изучали Вестерн-блоттингом с использованием антител к субъединицам α1,2,3,5,6,7, входящим в состав всех форм протеасом. Тем же методом с использованием соответствующих антител исследовали экспрессию протеолитических иммунных субъединиц LMP2 и LMP7, вызывающих наибольший интерес в связи с их функцией образования регуляторных пептидов. Кроме того, анализировали содержание активатора 19S RC с помощью антител к одной из его субъединиц – белку Rpt6, а также активатора PA28αβ с помощью антител к субъединице PA28α (рисунок 1.2). Предварительное исследование неспецифического связывания белков на мембране антителами к IgG мыши

выявило наличие меченых полипептидов с молекулярной массой более 50 кДа, локализация которых не совпадала с локализацией изучаемых субъединиц.

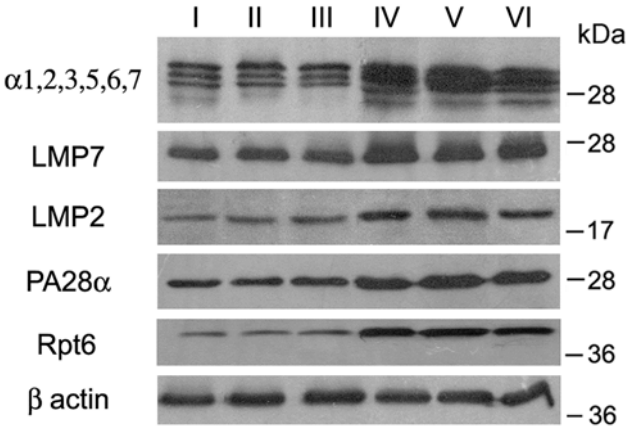

Рисунок 1.2 - Вестерн-блоты субъединиц протеасом и активаторов протеасом молочных желез мышей с использованием соответствующих антител
Осветленные гомогенаты контрольных (I–III) и опухолевых тканей (IV–VI). Указаны молекулярные массы белков-маркеров.

Обнаружено, что не только ХТП активность, но и содержание каждого из указанных компонентов пула протеасом одинаково в контрольных тканях молочной железы независимо от физиологического состояния мышей (рисунок 1.2, таблица 1.3), что свидетельствует об устойчивости пула протеасом в целом.

Таблица 1.3 - Содержание субъединиц протеасом и регуляторов активности протеасом в осветленных гомогенатах контрольных и опухолевых тканей молочных желез

Субъединицы	Относительное содержание субъединиц в образцах , % ([a])				
	Молочные железы		Рак молочной железы		
	II	III	IV	V	VI
α1,2,3,5,6,7	96 ± 20	89 ± 19	153 ± 24*	159 ± 18*	151 ± 22*
LMP7	107 ± 11	104 ± 20	174 ± 32*	139 ± 12*	155 ± 15*
LMP2	98 ± 27	101 ± 11	265 ± 64*	295 ±75*	230 ± 26*
PA28α	102 ± 14	106 ± 12	166 ± 30*	197 ± 43*	167 ± 36*
Rpt6	94 ± 31	117 ± 23	426 ± 42*	491 ± 99*	414 ± 87*

([a]) За 100% принято содержание субъединиц в контрольном образце I. Содержание субъединиц нормализовано на содержание β актина. Приведена стандартная ошибка

среднего. *Достоверное отличие от соответствующих значений в образцах I, II и III ($p < 0,05$, n = 4).

В опухолевых образцах все исследуемые параметры протеасом были достоверно увеличены, но по-разному [8]. Так, тотальный пул протеасом оказался увеличенным только в 1,6 раз при трехкратном повышении его ХТП активности, что свидетельствует о сложной регуляции активности протеасом дополнительными факторами при образовании злокачественных опухолей молочной железы.

Большой интерес представляет существенная разница в изменении экспрессии иммунных субъединиц LMP2 и LMP7. Если экспрессия субъединицы LMP2 увеличена в 2,6 раз, то субъединицы LMP7 – всего лишь в 1,5 раза. Этот результат указывает на разные функции субтипов протеасом, содержащих субъединицы LMP2 и LMP7. Похожая закономерность была выявлена нами ранее при исследовании злокачественной трансформации клеток печени под действием дипина у мышей [9] и процесса роста папиллярной карциномы щитовидной железы человека [10]. Понять разницу в функциях данных субтипов иммунных протеасом удалось лишь при изучении процесса развития толерантности к аллотрансплантату на модели индукции донорспецифической толерантности у крыс. Оказалось, что увеличение экспрессии протеасом с иммунной субъединицей LMP2 в клетках трансплантата сопровождает развитие толерантности, а высокое содержание протеасом с субъединицей LMP7 в лимфоцитарно-макрофагальном инфильтрате связано с процессом отторжения трансплантата [2, 6]. Мы полагаем, что в опухолевых клетках так же, как и в клетках трансплантата, протеасомы с субъединицей LMP2 продуцируют пептиды, которые, минуя молекулы МНС класса I, выделяются в межклеточное пространство и подавляют активность инфильтрованных цитотоксических лимфоцитов. По-видимому, данную функцию протеасомы, содержащие субъединицу LMP2, выполняют совместно с активатором PA28αβ, экспрессия которого также повышена в опухолях молочных желез (рисунок 1.2, таблица 1.3). Подтверждением этому предположению служат результаты, указывающие на преимущественное “нарезание” пептидов малой длины, не пригодных для молекул МНС класса I, под действием активатора PA28αβ по сравнению с 19S RC [11].

Следует подчеркнуть, что во всех исследованных опухолевых тканях экспрессия 19S RC увеличена наиболее значительно по сравнению с другими компонентами. Это объяснимо, поскольку активно делящиеся злокачественные клетки требуют интенсивного белкового обмена, в осуществлении которого важную роль играет 19S RC, обеспечивая распознавание и утилизацию убиквитинированных белков. В той или иной степени экспрессия этого регулятора увеличена в разных опухолевых клетках [9, 10].

Неудивительно, что соединения, повреждающие функции 19S RC, проявляют противоопухолевую активность, в том числе по отношению к злокачественным клеткам молочной железы мыши [12].

Взаиморегуляция убиквитин-протеасомной системы и эстрогеновых рецепторов. Опухоли молочной железы человека отличаются от модельных опухолей молочной железы мыши большей гетерогенностью и более сложной регуляцией их роста. Одним из существенных факторов, влияющих на развитие рака молочной железы человека, является наличие/отсутствие ER. Мы провели анализ литературных и своих собственных данных о взаимодействии убиквитин-протеасомной системы и ER, в том числе в клетках опухолей молочной железы, и выявили многомерность этого взаимодействия (рисунок 1.3) [13].

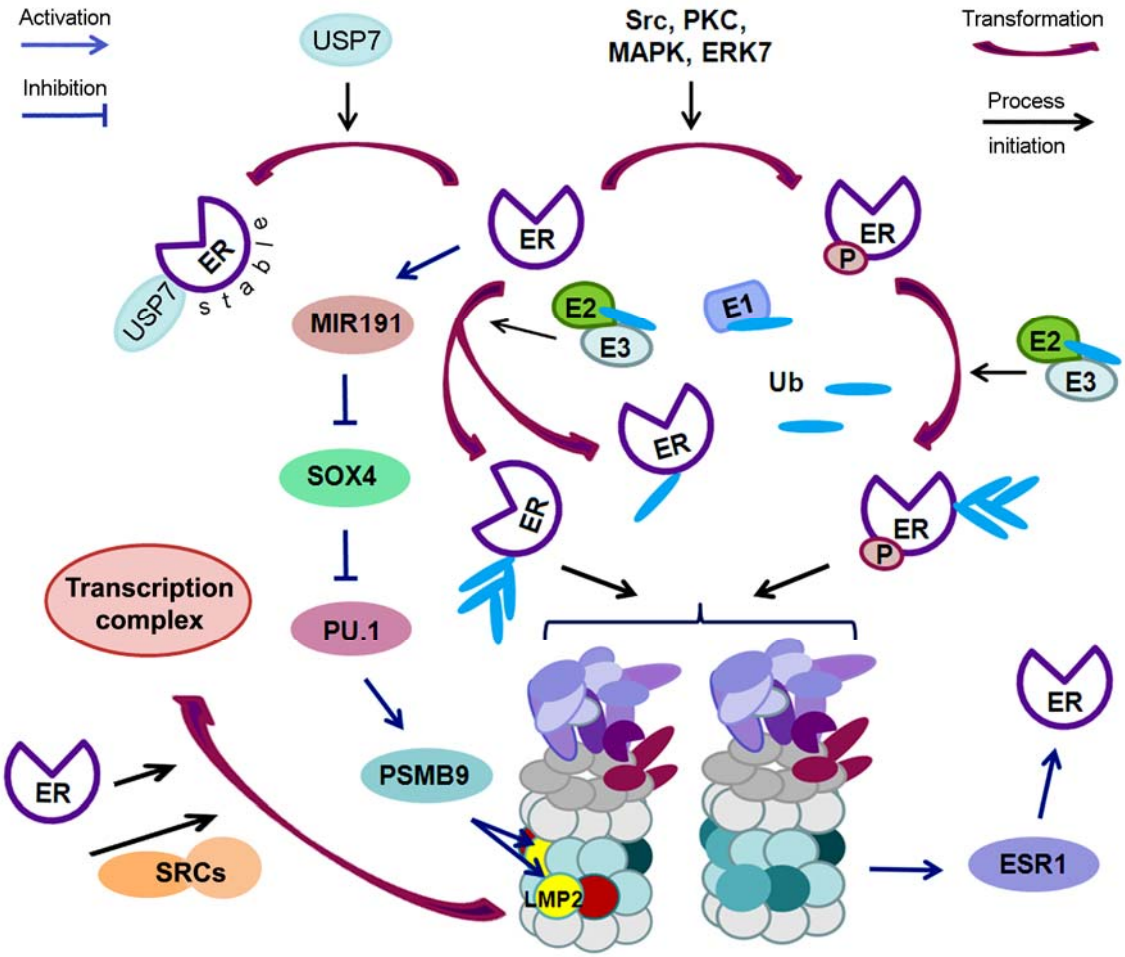

Рисунок 1.3 - Взаиморегуляция убиквитин-протеасомной системы и эстрогеновых рецепторов [13]

ER подвергается убиквитинированию в последовательных процессах, осуществляемых убиквитин-протеинлигазами E1, E2 и E3, после чего расщепляется в протеасомах, содержащих 19S RC [14]. В ряде случаев процессу убиквитинирования

предшествует фосфорилирование ER [15]. Деубиквитиназа USP7 способна взаимодействовать с ER, защищая его от убиквитинирования и повышая его стабильность [16].

Вместе с тем, роль убиквитин-протеасомной системы выходит за рамки контролирования содержания белка ER. Так, ХТП активность протеасом вовлечена в регуляцию экспрессии гена ESR1, кодирующего ERα. Ингибирование ХТП активности бортезомибом приводит к уменьшению уровня ERα mRNA, что обусловлено нарушением связывания РНК-полимеразы II с промотором гена ERα. В свою очередь, эти события ведут к уменьшению уровня ERα [17].

Кроме того, протеасомы с субъединицей LMP2 требуются для ER-зависимой транскрипции и на стадии инициации, и на стадии элонгации. В этих процессах LMP2 напрямую взаимодействует с транскрипционным комплексом белков для осуществления цикличности связывания с генами-мишенями [18].

Обратное влияние ERα на пул протеасом обнаружено нами в клетках рака молочной железы пациенток. Только в присутствии ERα происходило уменьшение экспрессии протеасом, содержащих субъединицу LMP2, при росте опухоли [19]. В этом случае ERα, по-видимому, оказывает непрямое влияние на экспрессию гена PSMB9, кодирующего LMP2, через регуляторную цепочку с участием miRNAs (MIR) и факторов транскрипции [13].

1.1.4 Заключение

В данной работе впервые проведено детальное исследование пула протеасом злокачественных опухолей молочной железы по сравнению с контрольными образцами на уникальной модели мышей BLRB/BYRB. Обнаружен ряд важных фактов. Во-первых, пул протеасом ткани молочной железы характеризуется относительной устойчивостью и не изменяется у мышей различного физиологического состояния. Во-вторых, при спонтанном образовании злокачественных опухолей молочной железы пул протеасом «выбивается» из равновесия и становится подчиненным нуждам раковых клеток, что сопровождается его комплексным изменением. В целом, пул протеасом увеличивается по количеству протеолитических субчастиц. При этом непропорционально сильнее возрастает его ХТП активность, что указывает на дополнительные механизмы ее регуляции. К таким механизмам можно отнести выявленную повышенную экспрессию активаторов PA28αβ и 19S RC, а также изменение субъединичного состава протеасом, обусловленное увеличением экспрессии иммунных субъединиц LMP2 и LMP7.

Количество каждого из исследованных компонентов пула протеасом увеличивается до необходимого для опухоли уровня. Наиболее сильно увеличено количество двух компонентов – активатора 19S RC и иммунной субъединицы LMP2, что указывает на перспективность их использования в качестве мишеней для терапии рака молочной железы в некоторыйх случаях. Вместе с тем, нельзя забывать о том, что это важные компоненты и здоровых клеток. Например, активность субъединицы LMP2 связана с передачей сигнала между нейронами [7]. Поэтому при создании новых лекарственных препаратов следует учитывать необходимость разработки приемов их адресной доставки к опухоли или иных способов безопасного применения.

Необходимо отметить, что данный подход к разработке противоопухолевой терапии правомочен только для рака молочной железы с повышенным содержанием субъединицы LMP2. Как показали наши исследования, у человека к таким типам рака относятся опухоли, не экспрессирующие ER [13, 19]. Опухоли, экспрессирующие ER, содержат сниженное количество LMP2-субъединицы. Следовательно, против них неэффективно применение терапии, подавляющей функции LMP2. Таким образом, проведенные нами исследования уазывают на возможность разработки индивидуальных подходов к терапии рака молочной железы, связанных с воздействием на протеасомы.

1.1.5 Список использованных источников

1. Tanaka K., Kasahara M. The MHC class I ligand-generating system: Roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28//Immunol. Rev. - 1998. - Vol. 163. - P. 161–176.

2. Astakhova T.M., Bozhok G.A., Alabedal’karim N.M., Karpova Y.D., Lyupina Yu.V., Ushakova E.M., Legach E.I., Bondarenko T.P., Sharova N.P. Proteasome expression in ovarian heterotopic allografts of Wistar and August rats under induction of donor specific tolerance//Russ. J. Dev. Biol. - 2019. - Vol. 50. - P. 261–267.

3. Moiseeva E. Anti-breast cancer drug testing. Original approaches. Novel set of mouse models//Saarbrucken: Lambert Academic Publishing. - 2009. - 225 p.

4. Aronov D.A., Zhukov V.V., Semushina S.G., Moiseeva E.V. Imbalances in cellular immunological parameters in blood predetermine tumor onset in a natural mouse model of breast cancer//Cancer Immunol. Immunother. - 2019. - Vol. 68. - P. 721–729.

5. Festing M. Inbred strains of mice: BLRB//In: Mouse genome informatics. - 1998. http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/BLRB.shtml.

6. Karpova Ya.D., Bozhok G.A., Lyupina Yu.V., Legach E.I., Astakhova T.M., Stepanova A.A., Bondarenko T.P., Sharova, N.P. Changes in the proteasome function after

induction of donor-specific tolerance in rats with ovarian allograft//Biol. Bull. (Moscow). - 2012. - Vol. 39. - P. 244–249.

7. Erokhov P.A., Lyupina Yu.V., Radchenko A.S., Kolacheva A.A., Nikishina Yu.O., Sharova N.P. Detection of active proteasome structures in brain extracts: Proteasome features of August rat brain with violations in monoamine metabolism//Oncotarget. - 2017. - Vol. 8. - P. 70941–70957.

8. Астахова Т.М., Моисеева Е.В., Шарова Н.П. Особенности пула протеасом в спонтанно возникающих злокачественных опухолях молочной железы мышей//Онтогенез. - 2020. - Т. 51. - С. 379–385. DOI: 10.31857/S047514502005002X. - Англ.: Astakhova T.M., Moiseeva E.V., Sharova N.P. Features of the Proteasome Pool in Spontaneously Occurring Malignant Tumors of the Mammary Gland in Mice//Russ. J. Dev. Biol. - 2020. - Vol. 51. - P. 317–322. DOI: 10.1134/S1062360420050021.

9. Astakhova T.M., Delone G.V., Lyupina Yu.V., Abramova E.B., Uryvaeva I.V., Sharova N.P. Changes in the proteasome pool during malignant transformation of mouse liver cells//Acta Naturae. - 2010. - Vol. 2. - P. 68–73.

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

11. Raule M., Cerruti F., Benaroudj N., Migotti R., Kikuchi J., Bachi A., Navon A., Dittmar G., Cascio P. PA28αβ reduces size and increases hydrophilicity of 20S immunoproteasome peptide products//Chem. Biol. - 2014. - Vol. 21. - P. 470–480.

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

13. Kondakova I.V., Shashova E.E., Sidenko E.A., Astakhova T.M., Zakharova L.A., Sharova N.P. Estrogen receptors and ubiquitin proteasome system: mutual regulation//Biomolecules. - 2020. - Vol. 10. - pii: E500.

14. Helzer K.T., Hooper C., Miyamoto S., Alarid E.T. Ubiquitylation of nuclear receptors: New linkages and therapeutic implications//J. Mol. Endocrinol. - 2015. - Vol. 54. - R151–R167.

15. Rajbhandari P., Schalper K.A., Solodin N.M., Ellison-Zelski S.J., Ping Lu K., Rimm D.L., Alarid E.T. Pin1 modulates ERα levels in breast cancer through inhibition of

phosphorylation-dependent ubiquitination and degradation//Oncogene. - 2014. - Vol. 33. - P. 1438–1447.

16. Xia X., Liao Y., Huang C., Liu Y., He J., Shao Z., Jiang L., Dou Q.P., Liu J., Huang H. Deubiquitination and stabilization of estrogen receptor α by ubiquitin-specific protease 7 promotes breast tumorigenesis//Cancer Lett. - 2019. - Vol. 465. - P. 118–128.

17. Powers G.L., Ellison-Zelski S.J., Casa A.J., Lee A.V., Alarid E.T. Proteasome inhibition represses ERα gene expression in ER+ cells – A new link between proteasome activity and estrogen signaling in breast cancer//Oncogene. - 2010. - Vol. 29. - P. 1509–1518.

18. Zhang H., Sun L., Liang J., Yu W., Zhang Y., Wang Y., Chen Y., Li R., Sun X., ShangY. The catalytic subunit of the proteasome is engaged in the entire process of estrogen receptor-regulated transcription//EMBO J. - 2006. - Vol. 25. - P. 4223–4233.

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

Подраздел 1.2 Механизмы взаиморегуляции развития нейроэндокринной и иммунной систем

1.2.1 Введение

Регуляция развития и функционирования репродуктивной системы млекопитающих осуществляется в тесном взаимодействии с нейроэндокринной и иммунной системами в разные периоды онтогенеза [20]. Взаимодействия этих систем, начиная с эмбриогенеза, приводят к развитию половых признаков и становлению половозрелости. Репродуктивное здоровье потомства зависит от того, как закладываются и развиваются эти взаимодействия в раннем онтогенезе.

Одним из факторов риска для развивающегося организма является бактериальное инфицирование, вызывающее воспаление, как в организме родителей, так и плода [21, 22]. В связи с этим бактериальные вагинозы у женщин, часто протекающие бессимптомно, особенно опасны в период вынашивания плода и могут вызывать повреждения центральной нервной системы и прерывание беременности [23]. В экспериментальных моделях для имитации бактериального инфицирования без заражения животных потенциально опасными инфекциями часто используют липополисахарид (ЛПС), основной компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий и, прежде всего, энтеробактерий [24]. ЛПС является одним из наиболее мощных естественных индукторов воспаления, вызывающего повышенный синтез и секрецию цитокинов, ферментов, эйкозаноидов, адгезивных молекул и продукцию свободных радикалов [24]. В раннем онтогенезе ЛПС, активируя иммунную систему матери, усиливает синтез провоспалительных цитокинов, как у матери, так и плодов, оказывающих негативное влияние на развивающийся организм [21]. Введение ЛПС (100 мкг/кг) самкам мышей или крыс на ранних сроках беременности приводит к снижению числа клеток Сертоли и сперматид, ухудшению качества и подвижности сперматозоидов, и как следствие, к снижению репродуктивной способности у самцов-потомков [25, 26].

Известно, что ЛПС является одним из факторов, индуцирующих синтез провоспалительных цитокинов макрофагами [27] и передающих сигналы, изменяющие внутриклеточные уровни циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) [28]. В свою очередь, цАМФ-зависимый путь может участвовать в регуляции системы Toll-рецепторов (TLR) после их связывания с ЛПС, запускающих синтез цитокинов [29].

Поскольку последствия негативного воздействия инфекции на плод не всегда прослеживаются после рождения ребенка, проводимая терапия в половозрелом возрасте часто не позволяет устранить выявленные нарушения фертильности. Нами была продемонстрирована возможность коррекции нарушений функций репродуктивной

системы у самцов- и самок-потомков антагонистами половых стероидов в раннем постнатальном периоде [26, 30]. В настоящее время предпринимаются попытки нейтрализовать бактериальные инфекции внутривенным введением иммуноглобулина G (IgG) человека [31, 32]. Улучшение исхода беременности после проведения терапии IgG наблюдалось у женщин с рецидивирующими потерями беременности, сопровождающейся иммунологическими нарушениями [33].

В экспериментальных моделях на грызунах с эндотоксемией, индуцированной ЛПС, сопровождающейся повышенным содержанием провоспалительных цитокинов и иммуносупрессией, IgG и IgM подавляли синтез этих цитокинов и развитие иммуносупрессии [34].

Механизм действия иммуноглобулинов при бактериальном инфицировании еще до конца не понятен. Предполагается, что иммуноглобулины, связываясь с Fc-гамма рецепторами (FcγR) на макрофагах [35], снижают их чувствительность к сигналам через TLR, в том числе и к ЛПС. В результате снижается синтез провоспалительных цитокинов и смертность животных [31].

Ранее нами было показано, что введение ЛПС (*E. coli*) самкам мышей или крыс на 12-й день беременности вызывает нарушения развития и функционирования репродуктивной системы у потомства [21, 22].

Целью настоящей работы было исследовать иммуномодулирующее (противовоспалительное) влияние IgG в пренатальный период на половое созревание самцов-потомков мышей после воздействия ЛПС (*E. coli*) на ранних сроках беременности матери, а также возможный механизм действия IgG на цАМФ-зависимый путь.

1.2.2 Материалы и методы

В экспериментах были использованы мыши линии Balb/c массой 18-20 г (Столбовая) с датированной беременностью (день зачатия обозначен как эмбриональный день 1 [ЭД1]). Животных содержали в стандартных условиях. Беременные мыши (20 самок) были разделены на 4 группы (по 5 самок в группе). На 12-й день беременности (ЭД12) животным 1-й группы внутрибрюшинно (в/б) вводили фосфатно-солевой буфер (PBS). Самкам 2-ой группы внутривенно (в/в) вводили IgG (20 мкг|мышь, Sigma, каталожный номер I5381, США) через 40 мин после в/б введения PBS. Самкам 3-й группы в/б вводили ЛПС *E. coli* (Sigma, США) в PBS (100 мкг/кг массы тела). Самкам 4-й группы внутривенно (в/в) вводили IgG (20 мкг/мышь, Sigma, США) через 40 мин после в/б введения ЛПС (100 мкг/кг). Доза IgG была выбрана на основании данных литературы [34].

После рождения у самцов-потомков (7-10 животных на группу) определяли следующие параметры: массу тела, аногенитальное расстояние (АГДкор), скорректированное с учетом их массы тела (АГД/массы тела$^{1/3}$), половое поведение, морфологию гонад, содержание каспазы 3 в сперматоцитах (иммуногистохимичеки), содержание половых стероидов в крови и цАМФ в перитонеальных макрофагах (иммуноферментным анализом).

Морфологию гонад самцов анализировали на 30-й день постнатального развития (ПНД30). Для количественной оценки клеток Сертоли использовали метод оптического детектора. Из каждой экспериментальной группы (по 5 самцов в каждой группе) было выбрано 50 концентрических семенных канальцев. Каждый 10-й серийный срез помещали на предметные стекла, покрытые желатином, и сушили при комнатной температуре. Серийные срезы (n = 5) из каждой группы помещали на отдельное стекло каждый и затем окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) с использованием стандартных процедур для морфологического анализа. Клетки Сертоли идентифицировали по их неправильной форме (треугольной) и их расположению в нижней трети семенного канальца. Клетки Сертоли представлены нами в семенных канальцах диаметром 100-150 мкм.

Половое поведение у самцов-потомков оценивали на ПНД45. Самцов каждой группы (n = 7 на группу) помещали в отдельные клетки. Первый тест на половое поведение проводили через 3-5 дней (эти результаты не учитывались), а в дальнейшем через 3-4 дня. Для каждого самца было проведено 5 тестов. Интактную самку помещали к самцам на 15 мин. Если самец предпринимал попытки контакта с самкой, ее оставляли, если нет, самку заменяли. За половым поведением наблюдали в течение 30 минут и оценивали (1) общее количество попыток, (2) количество длительных попыток и (3) количество успешных попыток, которые определяли наличием вагинальной пробки у самки.

Оценку содержания цАМФ в перитонеальных макрофагах проводили в модели *in vitro.* Для получения макрофагов самцам (10 животных) в/б вводили раствор ЭДТА (10 мл), затем собирали шприцом перитонеальную жидкость, центрифугировали (1000 x g в течение 7 мин) при комнатной температуре. Супернатант удаляли и клеточную массу ресуспендировали в 300 мкл среды RPMI-1640 (Sigma, США) с 10% фетальной сывороткой теленка (FBS, Gibco, UK). Жизнеспособность клеток составляла более 95%. Клетки (2,0 x 10^6 клеток/мл) высевали по 500 мкл/лунку в 12-луночные планшеты (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Австрия) и инкубировали при 37°C, 95: 5 воздух / CO_2 в течение 2 часов. Неприкрепленные клетки удаляли тщательной промывкой лунок 1

мл RPMI-1640, содержащей 10% FBS. Оставшиеся культивируемые клетки составляли не менее 97% жизнеспособных макрофагов.

Содержание цАМФ определяли: (1) после культивирования макрофагов в RPMI-1640, содержащей 10% FBS (500 мкл, 8 лунок на группу) в течение 40 мин; (2) после культивирования макрофагов с IgG (100 мкг/мл) в течение 40 мин; (3) после культивирования макрофагов с ЛПС (0,5 мкг/мл) в течение 40 мин; (4) после культивирования макрофагов с ЛПС в течение 20 минут и последующего совместного культивирования ЛПС с IgG в течение еще 20 минут; (5) после совместного культивирования макрофагов с ЛПС и IgG в течение 40 мин.

После инкубации лунки промывали 1 мл RPMI-1640, затем в лунки добавляли 200 мл 0,1 М HCl для лизиса клеток примерно на 15 мин при комнатной температуре и центрифугировали непосредственно в планшетах (600 x g, 15 мин). Супернатант собирали и замораживали при -80 ^{o}C. Были получены следующие группы образцов: (1) культуральная среда - контроль, (2) культуральная среда + ЛПС (40 минут), (3) культуральная среда + ЛПС (20 минут) + IgG (20 минут) и (4) культуральная среда + ЛПС + IgG (40 мин). Содержание цАМФ в образцах определяли с помощью иммуноферментного анализа (Sigma-Aldrich, США). Коэффициенты вариации между образцами были менее 14%. Низкая измеренная концентрация составляла 0,037 пмоль / мл, высокая измеренная концентрация составляла 3,41 пмоль / мл.

Статистическую обработку данных проводили с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA). Данные теста на репродуктивное поведение обрабатывали с помощью непараметрического двустороннего критерия Манна-Уитни (U-тест).

1.2.3 Результаты и обсуждение

Исследования были направлены на изучение иммуномодулирующего действия мышиного IgG в пренатальный период на половое созревание самцов-потомков мышей с репродуктивными нарушениями, индуцированными ЛПС после его введения самкам на 12-ый день беременности. Были изучены отдаленные последствия пренатального воздействия ЛПС и IgG на созревание и функционирование репродуктивной системы самцов-потомков. Половое созревание включает комплекс морфологических, физиологических и поведенческих процессов развития. Время полового созревания зависит от интеграции внешних и внутренних сигналов: массы тела и его жировой композиции, концентрации половых стероидов, развития нейроэндокринных механизмов.

Масса тела у самцов-потомков во всех исследованных группах достоверно увеличивалась после пренатального воздействия ЛПС в дозе 100 мкг/кг, по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 1.4).

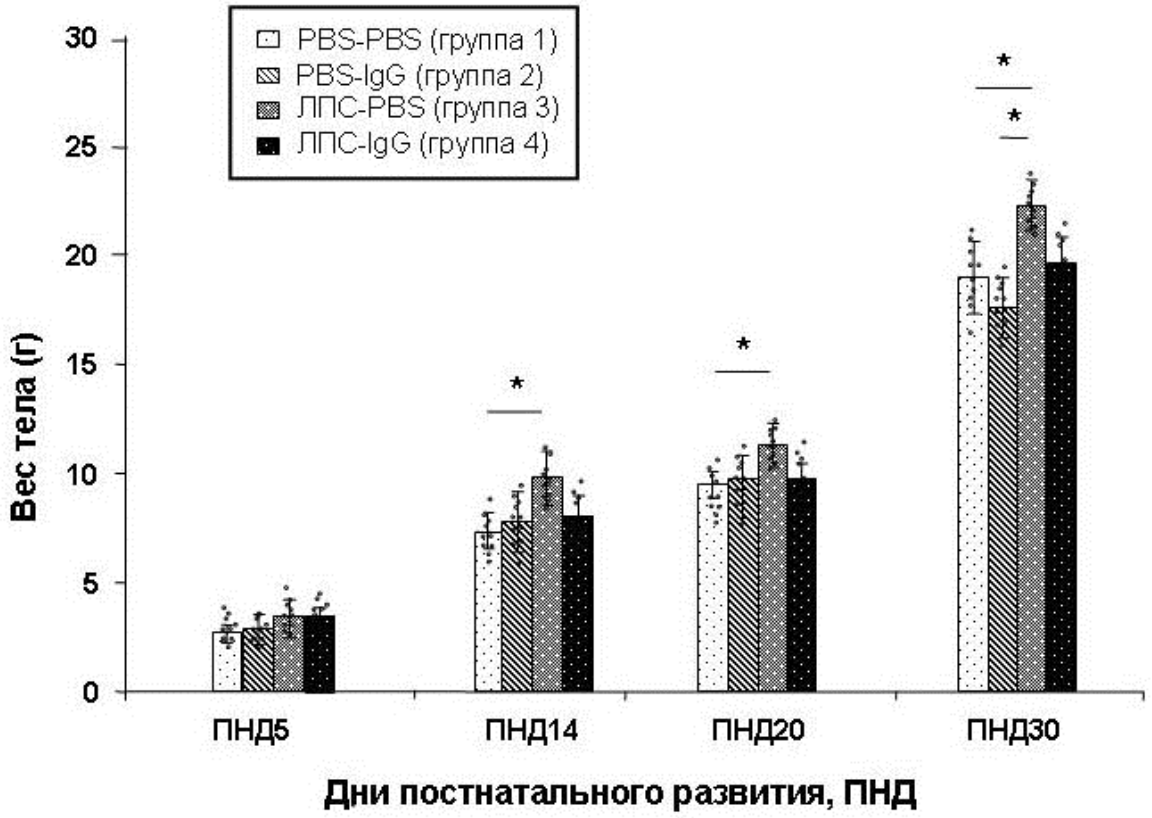

Рисунок 1.4 – Влияние пренатального воздействия ЛПС на массу тела самцов-потомков
Воздействие ЛПС (100 мкг/кг, в/б на 12-й день беременности, n = 5 беременных самок на группу) и IgG (20 мкг/мышь в/в, через 40 минут после инъекции ЛПС) на массу тела самцов на 5, 14, 20 и 30-й дни постнатального периода (n = 10 самцов на группу). Данные выражены как Mean ± SEM; ANOVA; * P <0,01 между группами одного возраста.

Под действием IgG наблюдалось снижение массы тела с ПНД14 (постнатального дня 14) по сравнению с группой животных, получавших ЛПС, и на ПНД30 масса тела соответствовала массе тела контрольных животных, получавших PBS. Величина массы тела самцов-потомков практически не отличалась от контрольной после введения IgG без ЛПС.

К настоящему времени накапливаются данные, доказывающие, что ЛПС в разных дозах и на разных сроках беременности вызывает нарушения метаболизма у самцов-потомков в отдаленные периоды [36, 37]. Снижение массы тела самцов мышей в разные периоды постнатального развития наблюдалось при 3-х кратном введении ЛПС (50 мкг/кг) самке на 15-17 дни беременности [37]. В то же время в печени взрослых самцов-потомков была увеличена экспрессия ароматазы, фермента, трансформирующего

андрогены в эстрогены. Увеличение ароматазы сопровождалось снижением соотношения тестостерона и эстрадиола и изменением активности рецепторов половых гормонов [37]. Однако в исследованиях Qin с соавторами [36] показано, что воздействие ЛПС (75 мкг/кг) на ЭД11 приводит не только к увлечению массы тела у половозрелых самцов-потомков мышей, но и к значительному увеличению в адипозной ткани содержания белка острой фазы пентраксина-3, индуцирующего пролиферацию адипоцитов, и, как следствие, к развитию ожирения.

Под действием IgG у самцов-потомков на разных стадиях постнатального развития масса тела приближалась к норме (рисунок 1.4), что служит предпосылкой пренатальной коррекции развития ожирения, вызванного осложненной беременностью.

У самцов-потомков (ПНД20 и ПНД30) АГРкор, скорректированное с учетом их массы тела, также приближалось к норме под действием IgG, тогда как после воздействия ЛПС эта величина была ниже нормы. АГД у самцов зависит от воздействия андрогена на плод при маскулинизации и развитии мужского репродуктивного тракта и связано с количеством вырабатываемой спермы и подвижностью сперматозоидов.

В группах животных (группы 1, 2), получавших PBS или IgG, структура семенников соответствовала норме. На различных стадиях сперматогенеза были выявлены правильно организованные семенные канальцы. Сперматозоиды и другие половые клетки располагались концентрическими слоями, в каждом семенном канальце четко определялся просвет (рис. 1,5 А, Б, В). Клетки Сертоли были идентифицированы по их неправильным тройным ядрам (Рис. 3 Г). После пренатального воздействия ЛПС во всех исследуемых образцах группы 3 было обнаружено большое количество симпластных сперматид на разных стадиях деградации (рис. 1.5 Д, Е, Ж, З). Симпласты имели 2-6 ядер и представляли собой сферические образования 15-20 мкм в диаметре (1.5 Д, Ж). В каждом случае деградацию определяли окрашиванием на каспазу-3 (рис.1.6 В, Г. Д). Каспаза-3 была обнаружена также в семенных канальцах с развивающимися сперматогониями в контрольной группе 1 (рис. 1.6 А), что указывает на нормальные процессы деградации развивающихся сперматогоний. Каспаза-3 не была выявлена при отсутствии первичных анти-каспаза-3 антител (отрицательный контроль, рис. 1.6 Б). Деградирующие семенные канальцы были выявлены после воздействия ЛПС в группе 3 (рис. 1.5 Е, Ж, З), а также после воздействия ЛПС-IgG в группе 4 (рис.1.5 И, К. и 1.6. З). Деградирующие сперматогонии были выявлены и после воздействия ЛПС-IgG (рис. 1.6. Е, Ж). Количество симпластных сперматид снижалось после последующего введения беременной самке IgG, не достигая, однако, нормы (рис. 1.5 Л).

Число клеток Сертоли на один извитой каналец было снижено после пренатального воздействия ЛПС по сравнению с контролем. Под действием IgG численность клеток Сертоли у самцов-потомков увеличивалась и достигала численности контрольных животных (таблица 1.4).

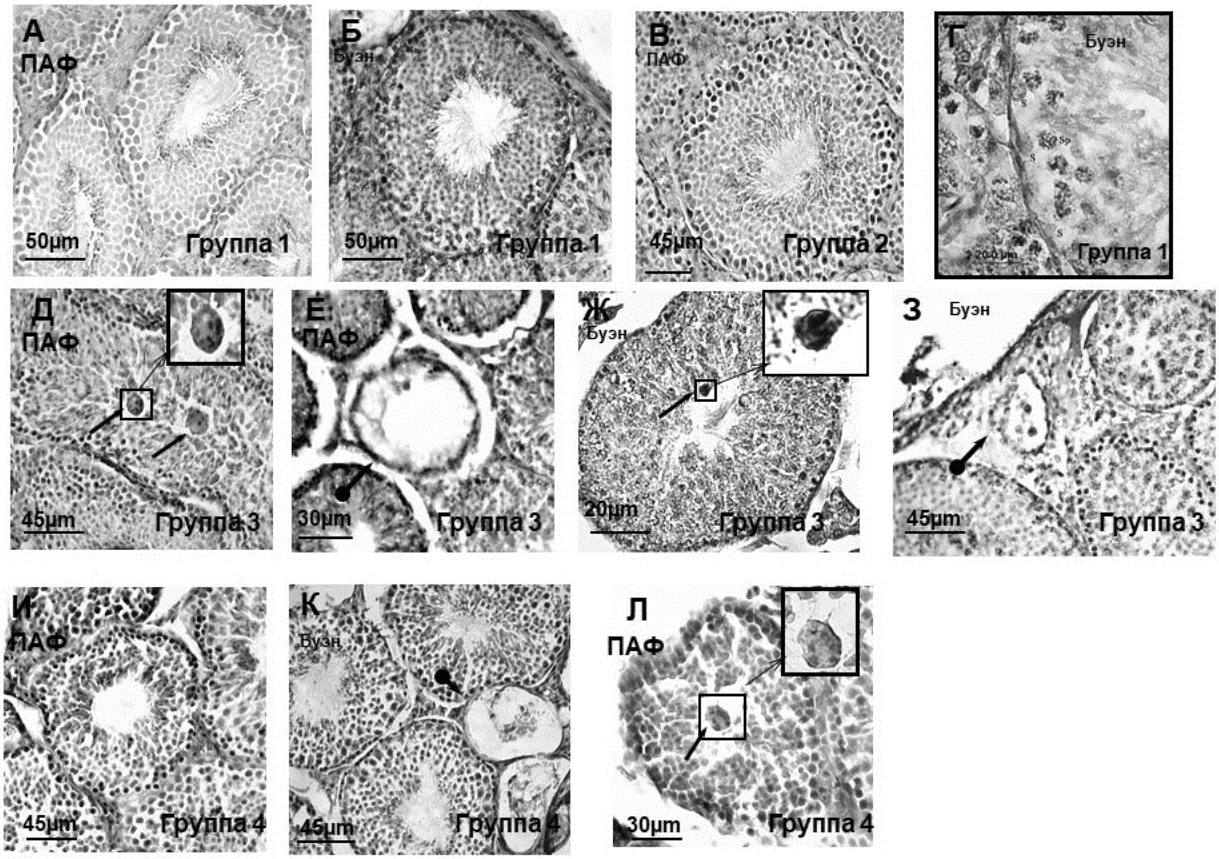

Рисунок 1.5 - Морфология семенников потомства самцов мышей

После пренатального воздействия PBS-группа 1 (фиксация в параформальдегиде-ПАФ) (А) или в Буэне (Б, Г), IgG-группа 2 (В) (20 мкг/мышь), ЛПС-группа 3 (Д, Е, Ж, З) (100 мкг/кг, в/б на 12-й день беременности) и воздействия IgG-группа 4 (И, К, Л) (20 мкг/мышь, в/в через 40 мин после инъекции ЛПС) на 30-й постнатальный день. Клетки Сертоли были идентифицированы по их неправильной форме (Г). Окрашивание гематоксилином и эозином (Н & Е). Масштаб: 15-30 мкм. Простыми стрелками обозначены симпластные сперматиды на различных стадиях деградации. Стрелками с кружочками обозначены деградирующие семенные канальцы.

Таблица 1.4 - Количество клеток Сертоли в семенных канальцах у потомков-самцов мышей на 30-й постнатальный день в контрольной (PBS) группе, после введения IgG (20 мкг/мышь), ЛПС (100 мкг/кг) и IgG через 40 мин после введения ЛПС. * P <0,05 по сравнению с группой 1 (PBS), ** P <0,05 по сравнению с группой 3 (ЛПС), n = 50 семенных канальцев, по 5 самцов в каждой группе.

PBS-PBS	PBS-IgG	ЛПС PBS	ЛПС + IgG
15,46 ± 1,42	15,51 ± 1,60	12,17 ± 1,51 *	14,93 ± 1.64**

Образование симпластных сперматид приводит к бесплодию самцов в результате нарушения сперматогенеза и развития азооспермии. Основное нарушение сперматогенеза происходит, когда межклеточные мостики, соединяющие круглые сперматиды, преждевременно открываются, что приводит к образованию симпластов. При этом разрушаются адгезионные соединения между сперматидами и клетками Сертоли. Нарушения сперматогенеза и клеточной адгезии в гонадах самцов половозрелых грызунов было выявлено также после воздействия агонистами эстрадиола и при низком уровне андрогенов [38].

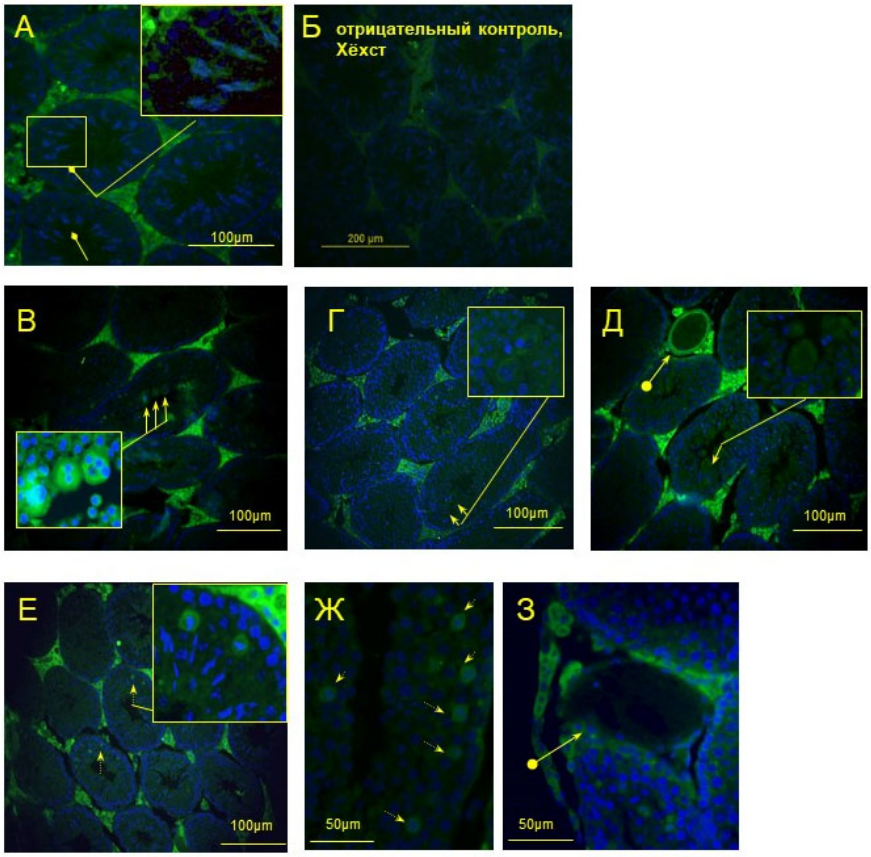

Рисунок 1.6 - Наличие каспазы-3 в семенниках самцов-потомков мышей
После пренатального воздействия PBS (А) или ЛПС (В, Г, Д) (100 мкг/кг, в/б на 12-й день беременности), или воздействия IgG (Е, Ж, З) (20 мкг/мышь, в/в через 40 мин после в/б инъекции ЛПС) на 30-й постнатальный день. Иммуногистохимическое окрашивание на каспазу-3 с окрашиванием ядер клеток красителем Hoechst (гонады фиксированы ПАФ). Отрицательный контроль – отсутствие первичных анти-каспаза-3- антител (Б). Масштаб: 100 мкм. Простыми стрелками обозначены симпластные сперматиды на различных стадиях деградации. Стрелками с кружочком обозначены деградирующие семенные канальцы. Короткие стрелки указывают на каспазу-3 в сперматоцитах.

После пренатального воздействия ЛПС у половозрелых самцов-потомков мышей наблюдалось достоверное снижение числа клеток Сертоли, тогда как под действием IgG их численность практически соответствовала норме (таблица 1.4). Эти данные можно соотнести с данными, демонстрирующими повышение содержания эстрадиола у самцов в

препубертатный период и снижении содержания тестостерона в постпубертатном периоде (рисунок 1.7). После введения IgG беременным самкам, подвергавшимся воздействию ЛПС, содержание эстрадиола на ПНД5 и ПНД14 было снижено, а тестостерона на ПНД30 увеличивалось по сравнению с животными, получавшими только ЛПС, но было ниже контрольного уровня (рисунок 1.7).

Дисбаланс половых стероидов, индуцированный ЛПС, негативно отражался и на половом поведении самцов. Количество спариваний у них было значительно ниже, чем у контрольных животных. В то же время после обработки IgG общее количество спариваний достоверно увеличивалось не только по сравнению с группой животных, обработанных ЛПС, но и с контрольной группой. Снижение копулятивной способности у самцов было выявлено также после однократного введения им ЛПС в дозе 100 мкг/кг на ЭД10 [39].

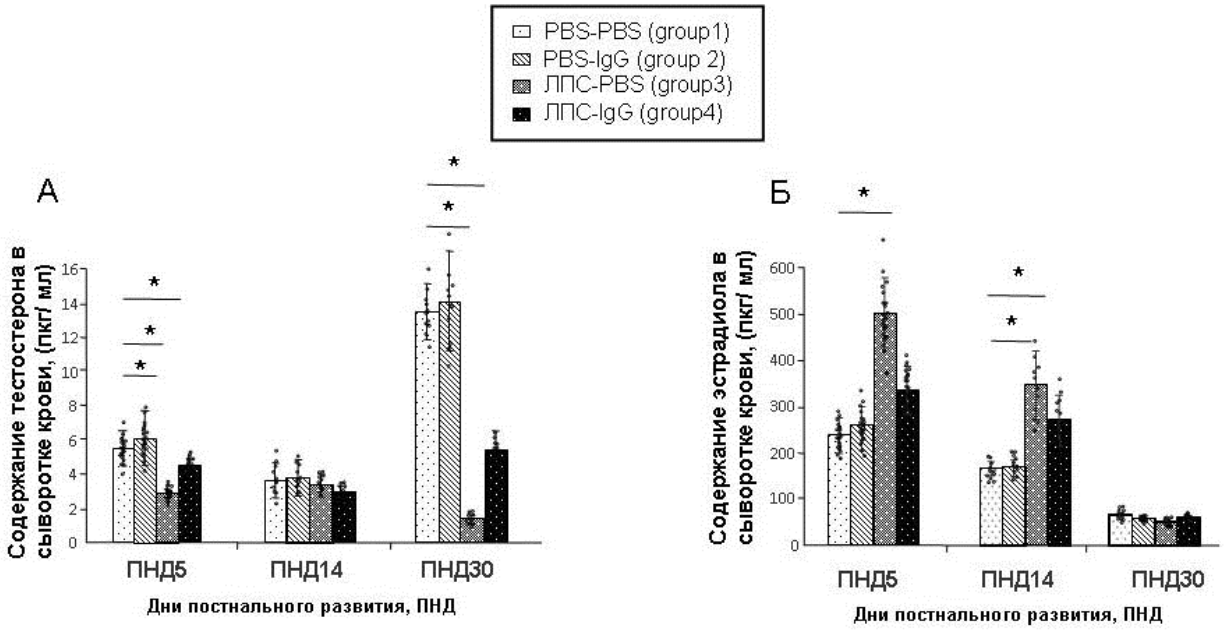

Рисунок 1.7 – Содержание эстрадиола и тестостерона у самцов в препубертатный и в постпубертатный периоды

Концентрация тестостерона (А) и эстрадиола (Б) (пг/мл) в сыворотке крови у самцов-потомков мышей на 5, 14 и 30-й дни постнатального развития после пренатального воздействия ЛПС (100 мкг/кг, на 12-й день беременности) и IgG (20 мкг/мышь в/в, через 40 минут после в/б инъекции ЛПС) (n = 10 самцов на группу). Данные выражены как Mean ± SEM; ANOVA; * P <0,01 между группами одного возраста.

Известно, что микроорганизмы и их основной мембранный компонент ЛПС реализуют свои эффекты через TLR2 и TLR4. После воздействия ЛПС в антиген-представляющих клетках, в частности макрофагах, TLR запускает каскад внутриклеточных реакций с участием различных киназ и ядерного фактора NF-kB, основных регуляторов транскрипции цитокинов. Кроме того, ЛПС может запускать

сигналы, приводящие к увеличению содержания внутриклеточного цАМФ [28], а цАМФ-зависимый путь может участвовать в регуляции TLR-системы [29].

Нами было исследовано влияние IgG на содержание цАМФ в мышиных перитонеальных макрофагах, активированных *in vitro* ЛПС. Содержание цАМФ определяли после одновременного совместного культивирования макрофагов с ЛПС (0.5 мкг/мл) и IgG (100 мкг/мл) в течение 40 мин, или после добавления IgG в культуру через 20 мин после культивирования ЛПС с макрофагами и их совместного культивирования в течение последующих 20 мин. При одновременном совместном культивировании перитонеальных макрофагов с ЛПС и IgG в течение 40 мин содержание цАМФ не изменялось по сравнению с культурой макрофагов, активированных ЛПС (рисунок 1.8).

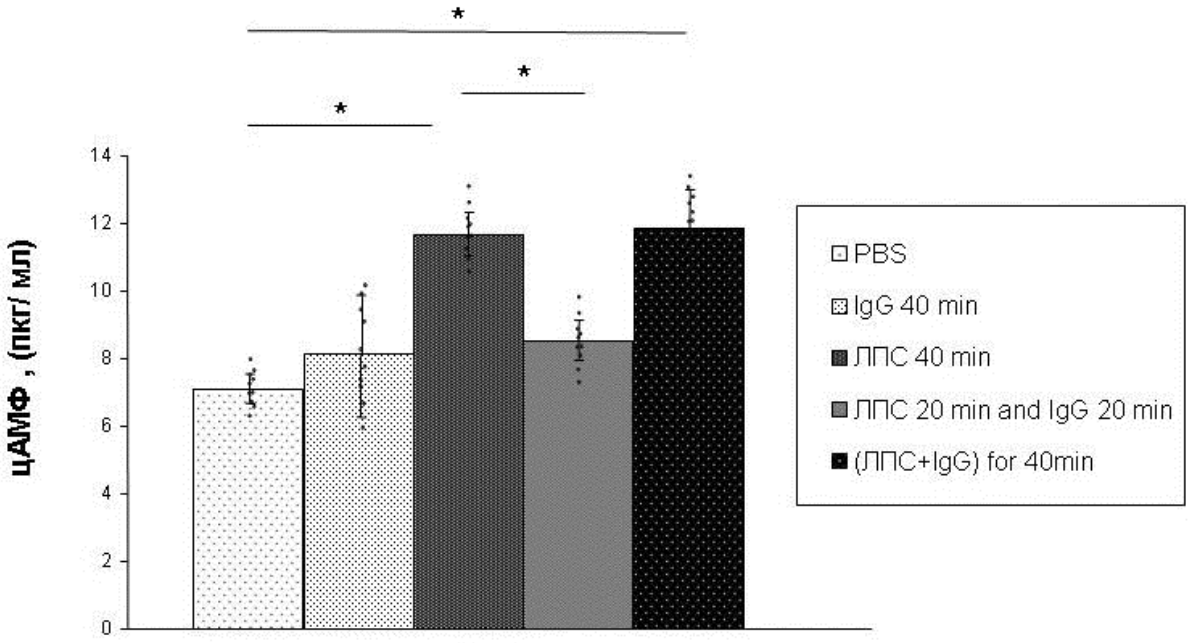

Рисунок 1.8 - Влияние мышиного IgG на содержание цАМФ в перитонеальных макрофагах мышей (n = 10), активированных ЛПС (*E.coli*) *in vitro*
Содержание цАМФ определяли после добавления IgG (100 мкг / мл) через 20 мин после культивирования ЛПС (0,5 мкг / мл) с макрофагами и их дальнейшего совместного культивирования в течение последующих 20 мин, или после одновременного совместного культивирования макрофагов с ЛПС и IgG в течение 40 мин. Данные выражены как Mean ± SEM; ANOVA; * P <0,01 между группами одного возраста.

Введение IgG в культуру после 20-минутного культивирования макрофагов с ЛПС, и их дальнейшее совместное культивирование в течение 20 мин, приводило к достоверному снижению содержания цАМФ по сравнению с группами без добавления IgG или при одновременном совместном культивировании с ЛПС. В то же время один IgG подобное влияние не оказывал.

Иммуномодулирующий эффект IgG был выявлен нами во всех тестах, представленных в настоящей работе. Ранее были предложены различные молекулярные и клеточные механизмы иммуномодулирующей активности IgG [35]. Однако точный механизм его действия остается неясным. В зависимости от концентрации IgG может оказывать как про-, так и противовоспалительный эффекты. Его провоспалительная активность связана с низкими концентрациями (10-14 мг/мл) и требует активации комплемента или связывания Fc-фрагмента IgG с Fcγ рецепторами (FcγRs), экспрессированными на эффекторных клетках врожденного иммунитета, в частности на макрофагах [40]. В результате происходит кластеризация рецепторов, рекрутирование вторичных эффекторных функций с последующей активацией сигнальных путей, приводящих к увеличению внутриклеточного уровня кальция и активации клеток. В то же время в высоких концентрациях (25-35 мг/мл) IgG обладает противовоспалительными свойствами. Было предложено несколько взаимоисключающих механизмов его противовоспалительного действия [41], включающих модуляцию экспрессии и функции FcγRs, интерференцию с активацией каскада комплемента и цитокиновой сети, нейтрализацию аутоантител и регуляцию клеточной пролиферации.

Одним из цитокинов, индуцированных IgG, является активин А, член суперсемейства трансформирующего фактора роста (TGF)-бета, который модулирует воспалительные процессы и подобно IgG способен оказывать про- и противовоспалительный эффекты. В эмбриогенезе активин А влияет на пролиферацию клеток Сертоли [42]. Его недостаток вызывает дисгенез гонад у эмбрионов мышей, что приводит к низкой выработке сперматозоидов и их аномальной морфологии в зрелом возрасте. Повышение уровня активина А в крови после введения IgG может способствовать благоприятному воздействию IgG на женщин с рецидивирующей репродуктивной недостаточностью. Предполагается, что активин А вносит существенный вклад в эффекты IgG [31].

1.2.4 Заключение

Представленные в работе данные свидетельствуют о негативном влиянии ЛПС на половое созревание самцов мышей. Системное воспаление, индуцированное ЛПС на 12-й день беременности, приводит к нарушениям морфологии гонад, дисбалансу половых стероидов и угнетению полового поведения у самцов-потомков. Воздействие ЛПС на ранних сроках беременности вызывает нарушения развития репродуктивной системы плодов, что приводит в дальнейшем к нарушениям ее функций. Именно в раннем развитии реализуются эпигенетические механизмы, обеспечивающие адаптационную

пластичность систем. Процессы становления физиологических систем не строго детерминированы генетически. Они характеризуются функциональной лабильностью и чувствительностью ко многим регуляторным факторам, что открывает возможности для коррекции нарушений процессов развития. IgG, хотя и не обладает выраженной специфичностью, может модулировать процессы воспаления. Эффект IgG наиболее выражен, когда синтез провоспалительных цитокинов, индуцированный ЛПС, еще не достиг своего пика, т.е. через 40-60 мин после введения ЛПС [21]. Эти исследования могут послужить основой для разработки подходов к коррекции нарушений в развивающейся репродуктивной системе под действием неблагоприятных факторов уже в раннем онтогенезе.

1.2.5 Список использованных источников

20. Zakharova L.A., Izvolskaia M.S. Interactions between the reproductive and immune systems during ontogenesis: the role of GnRH, sex steroids and immunomediators. In: Kahn SM, editor. ‘‘Sex steroids’’ Zagreb:InTech. - 2012. - P. 341–370.

21. Sharova V.S., Izvolskaia M.S., Zakharova L.A. Lipopolysaccharide-induced maternal inflammation affects the GnRH neuron development in fetal mice//Neuroimmunomodulation. - 2015. - Vol. 22. - P. 222–232.

22. Izvolskaia M., Sharova V., Zakharova L. Perinatal inflammation reprograms neuroendocrine, immune, and reproductive functions: Profile of cytokine biomarkers//Inflammation. - 2020. - Vol. 43. - P. 1175–1183.

23. Wang H.L., Pei D.E., Yang R.D., Wan C.L., Ye Y.M., Peng S.S., Zeng Q.Q.,Yu Y. Prenatal maternal vaginal inflammation increases anxiety and alters HPA axis signalling in adult male mice//Int. J. Dev. Neurosci. - 2019. - Vol. 75. - P. 27–35.

24. Izvolskaia M., Sharova V., Zakharova L. Prenatal Programming of Neuroendocrine System Development by Lipopolysaccharide: Long-Term Effects//Int. J. Mol. Sci. - 2018. - Vol. 19. - P. 3695.

25. Wang H., Yang L.L., Hu Y.F., Wang B.W., Huang Y.Y., Zhang C., Chen Y.H., Xu D.X. Maternal LPS exposure during pregnancy impairs testicular development, steroidogenesis and spermatogenesis in male offspring//PLoS One. - 2014. - Vol. 9. - e106786.

26. Izvolskaia M.S., Sharova V.S., Ignatiuk V.M., Voronova S.N.., Zakharova L.A. Abolition of prenatal lipopolysaccharide-induced reproductive disorders in rat male offspring by fulvestrant//Andrologia. - 2019. - Vol. 51. - e13204.

27. Rossol M., Heine H., Meusch U., Quandt D., Klein C., Sweet M.J., Hauschildt S. LPS- induced cytokine production in human monocytes and macrophages//Crit. Rev. Immunol. - 2011. - Vol. 31. - P. 379–446.

28. Risøe P.K., Wang Y., Stuestøl J.F., Aasen A.O., Wang J.E., Dahle M.K. Lipopolysaccharide attenuates mRNA levels of several adenylyl cyclase isoforms in vivo//Biochim. Biophys. Acta. - 2007. - Vol. 1772. - P. 32–39.

29. Feng W., Wang Y., Zhang J., Wang X., Li C., Chang Z. Effects of CTx and 8-bromo cAMP on LPS-induced gene expression of cytokines in murine peritoneal macrophages//Biochemical and biophysical research communications. - 2000. - Vol. 269. - P. 570–573.

30. Ignatiuk V.M., Izvolskaya M.S., Sharova V.S., Voronova S.N.., Zakharova LA. Disruptions in the reproductive system of female rats after prenatal lipopolysaccharide-induced immunological stress: role of sex steroids//Stress. - 2019. - Vol. 22. - P. 133–141.

31. Domínguez-Soto Á., Simón-Fuentes M., de Las Casas-Engel M., Cuevas V.D., López-Bravo M., Domínguez-Andrés., Saz-Leal P.., Sancho D, Ardavín C, Ochoa-Grullón J. et al. IVIg promote cross-tolerance against inflammatory stimuli in vitro and in vivo//J. Immunol. - 2018. - Vol. 201. - P. 41–52.

32. Sawa T., Kinoshita M., Inoue K., Ohara J., Moriyama K. Immunoglobulin for treating bacterial infections: one more mechanism of action//Antibodies. - 2019. - Vol. 8. - P. 52.

33. Han A.R., Lee S.K. Immune modulation of i.v. immunoglobulin in women with reproductive failure//Reprod. Med. Biol. - 2018. - Vol. 17. - P. 115–124.

34. Kyvelidou C., Sotiriou D., Zerva I., Athanassakis I. Protection against lipopolysaccharide-induced immunosuppression by IgG and IgM//Shock. - 2018. - Vol. 49. - P. 474–482.

35. Chaigne B., Mouthon L. Mechanisms of action of intravenous immunoglobulin. Transfus Apher Sci. - 2017. - Vol. 56. - P. 45–49.

36. Qin S., Chen X., Gao M., Zhou J., Li X. Prenatal exposure to lipopolysaccharide induces PTX3 expression and results in obesity in mouse offspring//Inflammation. - 2017. - Vol. 40. - P. 1847–1861.

37. Zhao M., Yuan L., Yuan M.M., Huang L.L., Su C., Chen Y.H., Yang Y.Y., Hu Y., Xu D.X. Maternal lipopolysaccharide exposure results in glucose metabolism disorders and sex hormone imbalance in male offspring//Mol. Cel. Endocrinol. - 2018. - Vol. 474. - P. 272–283.

38. Zhang J., Wong C.H., Xia W., Mruk D.D., Lee N.P., Lee W.M., Cheng C.Y. Regulation of Sertoli-germ cell adherens junction dynamics via changes in protein-protein interactions of the N-cadherin-beta-catenin protein complex which are possibly mediated by c-

Src and myotubularin-related protein 2: an in vivo study using an androgen suppression model//Endocrinology. - 2005. - Vol. 146. - P. 1268–1284.

39. Solati J., Hajikhani R., Rashidieh B., Jalilian M.F. Effects of prenatal lipopolysaccharide exposure on reproductive activities and serum concentrations of pituitary-gonadal hormones in mice offspring//Int. J. Fertil. - 2012. - Vol. 6. - P. 51–58.

40. Kaveri S.V., Maddur M.S., Hegde P., Lacroix-Desmazes S., Bayry J. Intravenous immunoglobulins in immunodeficiencies: more than mere replacement therapy//Clin. Exp. Immunol. - 2011. - Vol. 164. - (Suppl. 2). - P. 2–5.

41. Durandy A., Kaveri S.V., Kuijpers T.W., Basta M., Miescher S., Ravetch J.V., Rieben R. Intravenous immunoglobulins–understanding properties and mechanisms//Clin. Exp. Imunol. - 2009. - Vol. 158. - (Suppl. 1) - P. 2–13.

42. Archambeault D.R., Yao H. Activin A, a product of fetal Leydig cells, is a unique paracrine regulator of Sertoli cell proliferation and fetal testis cord expansion//PNAS. - 2010. - Vol. 107. - P. 10526–1053.

РАЗДЕЛ 2 МОДЕЛИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСОВ И АДАПТАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПОПУЛЯЦИИ

2.1 Введение

Вспышка нового коронавируса SARS-CoV-2 в Ухане в ноябре-декабре 2019 года переросла в пандемию, затронувшую все страны мира. Эпидемиологические меры противодействия данному вирусу, рекомендованные Всемирной Организацией Здравоохранения и примененные во многих странах мира, включают карантин / «самоизоляцию» / «локдаун» (добровольное или принудительное помещение людей в домашние условия, сопровождающееся запретом на свободное перемещение и прерыванием рабочего процесса). Эффективность карантинных мер для остановки пандемии нового коронавируса является по большей части непроверенной, а необходимость введения подобных мер до сих пор вызывает много споров [1-3]. Представляется необходимым оценить эффективность карантина, учитывая специфику распространения SARS-CoV-2 среди населения России и ряда стран Европы, а также Дальнего Востока. На основании эпидемиологических данных, полученных в пятнадцати странах, мы разработали математическую модель распространения нового коронавируса применительно к ситуации карантина и его отсутствия, а результаты сравнили между собой. Основу модели составляет формирование коллективного иммунитета к коронавирусу. При отсутствии массового медицинского вакцинирования коллективный иммунитет остается важным способом стабилизировать эпидемиологическую ситуацию.

В литературе подчеркивается, что создание так называемого коллективного иммунитета, иначе называемого популяционным, блокирующим, стадным или естественным, важно для замедления скорости распространения вируса в популяции и, фактически, для остановки пандемии [4-10]. Однако по состоянию на 5 декабря 2020 года было проведено не так много межстрановых сравнительных исследований распространения SARS-CoV-2 в различных типах экосистем, которые пролили бы достаточный свет на наше понимание того, насколько быстро или медленно формируется коллективный иммунитет к SARS-CoV-2.

В настоящее время разработано несколько типов математических моделей распространения SARS-CoV-2, как теоретических, так и вычислительных. Однако мы создали оригинальную модель, главным достоинством и отличительной особенностью которой является ее сравнительный характер, позволяющий сопоставлять данные по разным странам, экосистемам и типам популяционного окружения.

Помимо того, что формирование коллективного иммунитета является удобным средством оценки эффективности карантинных мер, модель, направленная на расчет

параметров такого иммунитета, важна и по ряду других причин. Во-первых, данные, которые она даст на выходе, помогут избежать чрезмерной нагрузки на систему здравоохранения путем дифференциации случаев COVID / не-COVID. С «перегревом» системы здравоохранения, вызванным несбалансированным ответом на пандемию, уже столкнулся ряд стран [11, 12]. Во-вторых, модель предоставит более реалистичную картину распространения COVID-19 среди населения. И, в-третьих, впоследствии модель можно использовать для разработки эффективных правил идентификации COVID-19 среди населения, общих для евразийского пространства: для расчета необходимого количества тестов в случае той или иной угрозы (выбора оптимального соотношения затрат/эффективности), выявления репрезентативных выборок среди различных групп населения и факторов, на основании которых можно устанавливать частоту «срезов» эпидемиологического контроля и т. п.

2.2 Материалы и методы

Методология. Наша модель представляет собой разновидность модели «восприимчивые – инфицированные – выздоровевшие» (SIR). Используя эпидемиологические данные в качестве входных параметров для модели, мы рассчитали время и уровень формирования коллективного иммунитета для различных режимов борьбы с вирусом (карантин и его отсутствие).

Первичные эпидемиологические данные из открытых источников. Использованы следующие статистические данные о тестировании на COVID-19: данные по круизному лайнеру *Diamond Princess*, данные об эвакуационных рейсах японских подданных, данные массового тестирования населения Японии, Республики Корея, Тайваня, Австрии, Германии, Исландии, Италии; Португалии; России и Великобритании. Использованы следующие источники:

- Тайвань Taiwan Centers for Disease Control. 21 April 2020. Available from: https://www.cdc.gov.tw/En.
- Япония Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. 21 April 2020. Available from: https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/newpage_00032.html.
- Республика Корея KCDC. The updates on COVID-19 in Korea. 21 April 2020. Available from: https://www.cdc.go.kr.
- Данные по «Diamond Princess» National Institute of Infectious Diseases. Field Briefing: Diamond Princess COVID-19 Cases; Tokyo, Japan: 2020. Available from: https://www.niid.go.jp/niid/en/2019-ncov-e/9407-covid-dp-fe-01.html.

- Список программ тестирований ПЦР и на антитела Jarlov H. Anti-SARS-CoV-2 screening. Available from: https://docs.google.com/spreadsheets/d/17Tf1Ln9VuE5ovpnhLRBJH-33L5KRaiB3NhvaiF3hWC0/edit#gid=0.

- Австрия Amtliches Dashboard COVID19 öffentlich zugängliche Informationen. Available from: https://info.gesundheitsministerium.at/dashboard_Hosp.html?l=de.

- Германия RKI. Aktueller Lage-/Situationsbericht des RKI zu COVID-19. Available online: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Situationsberichte/Gesamt.html.

- Исландия Government of Iceland. Large scale testing of general population in Iceland underway. Available from: https://www.government.is/news/article/2020/03/15/Large-scale-testing-of-general-population-in-Iceland-underway.

- Италия Italian doctors doubt testing is Italy's route out of coronavirus lockdown. The Local.it. Available from: https://www.thelocal.it/20200415/will-mass-testing-help-italy-out-of-coronavirus-lockdown.

- Португалия DGS, Direção-Geral da Saúde. Available from: https://covid19.min-saude.pt/ponto-de-situacao-atual-em-portugal.

- Великобритания UK PHE. Number of coronavirus (COVID-19) cases and risk in the UK. Available from: https://www.gov.uk/guidance/coronavirus-covid-19-information-for-the-public.

- Россия Stopcoronavirus. Available from: https://xn--80aesfpebagmfblc0a.xn--p1ai.

Первичные эпидемиологические данные, собранные в частном порядке. Первичные статистические данные по COVID-19 были собраны во временной интервал со 2 марта по 21 апреля 2020 года. В мае-августе 2020 года были собраны дополнительные данные, которые существенно изменили наше понимание распространения SARS-CoV-2.

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка проводилась с использованием программного обеспечения *Origin 8.1 Pro* и *Statistica 10.*

2.3 Результаты и обсуждение

Моделирование распространения SARS-CoV-2 в популяции. Мы предположили, что распространение COVID-19 можно объяснить с помощью модели марковского процесса с непрерывным распределением. Этот процесс в целом можно описать с помощью SIR.

Относительно карантинных мер мы рассмотрели две ситуации: а) полный карантин (данный подход применялся в России и большинстве европейских стран весной-летом 2020 года) и б) отсутствие карантина («шведский» сценарий). Помимо Швеции, второй сценарий также использовался Исландией, Республикой Беларусь, Японией, Тайванем, Республикой Кореей. Шведская модель более сложна, в нашем моделировании

соответствующий марковский процесс включает 13 узлов. Узлы (состояния) марковских процессов перемещения людей в сообществе показаны на рисунке 2.1.

На рисунке 2.2 продемонстрирована наша эпидемиологическая модель SIR как непрерывный марковский процесс, в рамках которого передается инфекция, с узлами (состояниями), соответствующими различным возможным ситуациям отдельно взятого человека в отношении заражения или болезни.

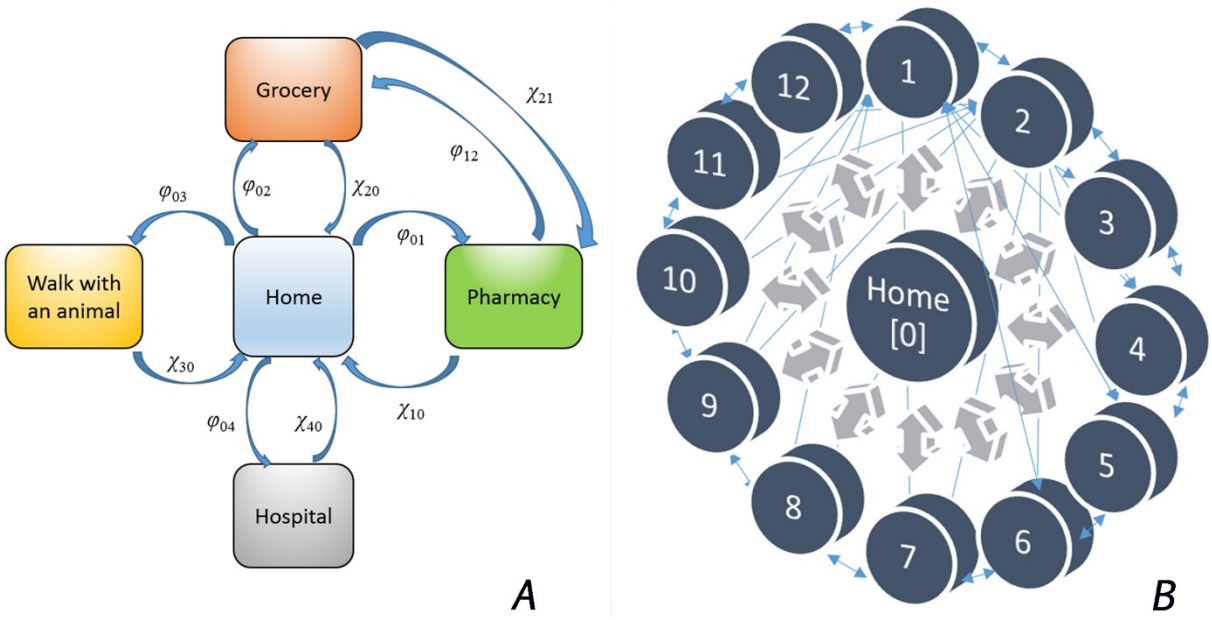

Рисунок 2.1 - Два сценария сдерживания SARS-CoV-2

Полный карантин (A) и отсутствие карантина (B). Последний сценарий представляет собой «велосипедное колесо», в котором каждый узел (состояние) связан со всеми другими узлами (состояниями) с коэффициентами интенсивности потоков λ_{ij}, где индексы i и j изменяются от 0 до 12: Дом {0} - Аптека {1} - Продуктовый магазин {2} - Прогулка с животным {3} – Прогулка где угодно с несколькими людьми {4} - Общественный транспорт {5} - Общественные собрания, за исключением массовых собраний {6} - Кафе, рестораны {7} - Больницы, медицинские учреждения {8} - Офисы, рабочие места {9} - Приюты, детские дома, хосписы {10} - Собрания «выходного дня», пребывание в оздоровительных лагерях на природе (например, школьных, университетских, корпоративных и т. п.) {11} - Образовательные учреждения (школы, университеты, курсы повышения квалификации и др.) {12}. Для простоты рисунка B полный набор стрелок показан только для узлов 1 и 2.

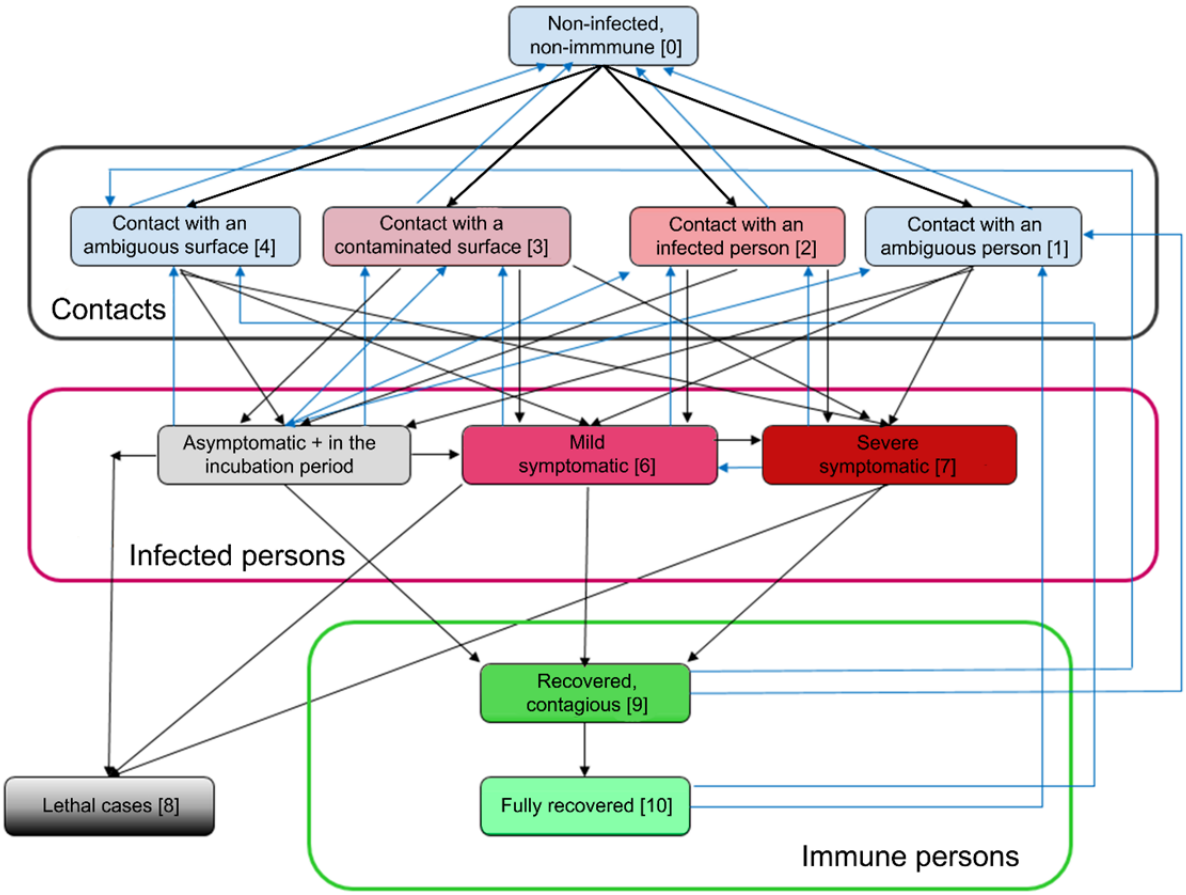

Рисунок 2.2 - Схема непрерывного марковского процесса, описывающего передачу SARS-CoV-2 (наша оригинальная эпидемиологическая модель SIR)

Узлы (состояния): неинфицирован, не обладает иммунитетом {0}; контактирует с подозрительным лицом {1}; контактирует с инфицированным лицом {2}; контактирует с зараженной поверхностью {3}; контактирует с непонятной поверхностью {4}; бессимптомное течение или находится в инкубационном периоде {5}; слабые симптомы {6}; серьезные симптомы {7}; умер {8}; практически выздоровел, но заразность сохраняется {9}; выздоровел полностью {10}.

Распределение народонаселения в пространстве-времени для двух сценариев. Рассмотрим человека, который может находиться в любом из пяти состояний в режиме полной изоляции. Тогда вероятности его / ее пребывания в этих пяти местах равны $p0$ (дом), $p1$ (аптека), $p2$ (продуктовый магазин), $p3$ (прогулка по улице с животным, чаще всего с собакой), $p4$ (больница / любое другое медицинское учреждение со стационарным / амбулаторным режимом лечения). Очевидно, что

$$\sum_{i=0}^{4} p_i(t) = 1 \qquad (1)$$

Для начала напишем систему линейных дифференциальных уравнений Колмогорова для пространственно-временного состояния человека в сценарии А (в стране с режимом полного карантина). Из соображений простоты мы предполагаем, что госпитализация может быть произведена только из его дома, а интенсивность потока не зависит от t:

$$\begin{cases} \frac{dp_0(t)}{dt}(Home) = \chi_{10}p_1(t) + \chi_{20}p_2(t) + \chi_{30}p_3(t) + \chi_{40}p_4(t) - \\ \qquad -(\varphi_{01} + \varphi_{02} + \varphi_{03} + \varphi_{04})p_0(t), \qquad (2) \\ \frac{dp_1(t)}{dt}(Pharmacy) = \varphi_{01}p_0(t) + \chi_{21}p_2(t) - (\chi_{10} + \varphi_{12})p_1(t), \quad (3) \\ \frac{dp_2(t)}{dt}(Grocery) = \varphi_{02}p_0(t) + \varphi_{12}p_1(t) - (\chi_{20} + \chi_{21})p_2(t), \qquad (4) \\ \frac{dp_3(t)}{dt}(Saunter) = \varphi_{03}p_0(t) - \chi_{30}p_3(t), \qquad (5) \\ \frac{dp_4(t)}{dt}(Hospital) = \varphi_{04}p_0(t) - \chi_{40}p_4(t). \qquad (6) \end{cases}$$

Для сценария В (шведского) у нас будет уже четырнадцать уравнений Колмогорова. Учитывая, что марковский процесс в «шведской» модели эргодичен по сравнению с марковским процессом с полным карантином, получаем следующую систему уравнений Колмогорова:

$$\frac{dp_i(t)}{dt} = \sum_{\substack{j=0 \\ j\neq i}}^{13} \varphi_{ji}p_j\,(t) - p_i(t)\sum_{\substack{j=0 \\ j\neq i}}^{13} \varphi_{ij}\,, \qquad i\ =\ \overline{(0;12)} \qquad (7)$$

Чтобы оценить уровень коллективного иммунитета на текущий момент, мы исследовали, как ведут себя системы уравнений Колмогорова 2–6 и 7 и соответствующие основные уравнения (как меняются решения $p_i\,(t)$) от варьирования эпидемиологических и демографических параметров. Подразумевалось, что в мире наличествует только один штамм коронавируса – уханьский. На начало 2021 года это уже не так. Решения, то есть функции вероятности $p_i\,(t)$, являются сложными функциями от t, и они имеют следующие параметры в качестве переменных:

$$p_i = p_i\big(t, r_0, c_{drop.}, c_{surf.}, N_{imm}(t)\big), \qquad (8)$$

где r_0 – базовое репродуктивное число, c_{drop} – коэффициент заразности при воздушно-капельном пути передачи вируса, c_{surf} – коэффициент заразности при тактильной передаче при прикосновении к поверхности, N - общее количество людей в группе, N_{imm} - количество людей в группе, которые уже имеют иммунитет к SARS-CoV-2.

Использование коэффициентов заразности – довольно новая концепция в

эпидемиологии. Фактически, эти коэффициенты представляют вероятность заражения человека, не имеющего иммунитета, в результате прямого контакта с уже инфицированным человеком или с зараженной поверхностью: $c = \frac{N_{infected\ after\ contact}}{N_{total\ contacts}}$, и следовательно, $0 \leq c_{drop.} + c_{surf.} \leq 1$. В более широком смысле, $0 \leq c_{drop.} + c_{surf.} \leq 2$, но значение 2 для суммы недостижимо даже для самых заразных болезней, известных человечеству на данный момент (например, корь или ветряная оспа для передачи капельным путем, либо геморрагическая лихорадка Эбола для передачи через биологические жидкости).

Базовое репродуктивное число r_0 оценивается разными исследователями по-разному: от 1,6 до почти 15. В своем отчете от 17 апреля 2020 года Институт Роберта Коха оценил r_0 как 0,5–0,6. Такая огромная разница в оценке базового репродуктивного числа является прямым следствием того факта, что различные исследователи изучали разные выборки, несопоставимые друг с другом с точки зрения плотности людей в группе, размера группы и частоты человеческих контактов. Мы использовали r_0 = 1,6 и 5,6 в качестве двух альтернатив.

Изменение процента инфицированных с течением времени. Помимо абсолютного значения среднего процента инфицирования населения (PIR), важно его изменение во времени. На рисунке 2.3 временная зависимость мгновенного PIR показана для Великобритании, России, Нидерландов (режим карантина) и Швеции (без карантина). Мгновенный процент PIR рассчитывается как $PIR_{inst.} = \frac{\Delta N_{new\ pos.\ cases}}{\Delta N_{new\ tests\ made}}$, т.е. как отношение ежедневного увеличения числа положительных случаев к ежедневному увеличению количества выполненных тестов.

Как видим, на рисунке 2.3 наблюдается смешанная зависимость от времени. К 21 апреля 2020 года симбатная динамика мгновенного процента PIR и суточного прироста положительных случаев наблюдается только для России. Для Великобритании существует максимум мгновенного PIR, который не совпадает с максимумом подтвержденных положительных случаев. Для Нидерландов аппроксимация очень близка к константе. Для Швеции мы можем выделить спад, низкое плато и рост. В целом для четырех рассматриваемых стран мгновенный PIR как функция времени не коррелирует с динамикой подтвержденных случаев.

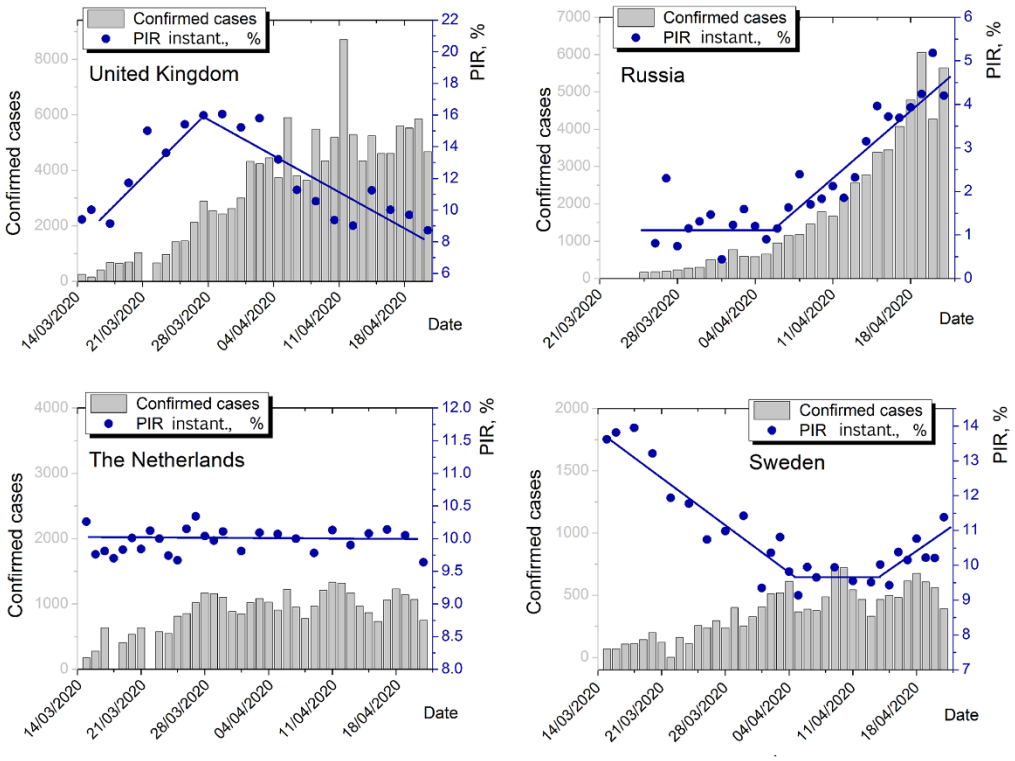

Рисунок 2.3 - Динамика мгновенного показателя PIR для Великобритании, России, Нидерландов и Швеции на конец апреля 2020 года

Серые столбцы представляют ежедневное изменение подтвержденных положительных случаев. Синие точки –мгновенные величины PIR. Синие ломаные являются частями линейных кусочно-заданных аппроксимаций.

Формирование коллективного иммунитета. Для оценки времени и значения максимума формирования коллективного иммунитета в исследуемых странах было выполнено компьютерное численное решение систем уравнений Колмогорова, описанных в разделе «Материалы и методы», с моделированием поведения функций Ляпунова для соответствующих основных уравнений (поиск глобальных аттракторов).

При максимизации первой производной коллективного иммунитета

$$\frac{dh(t)}{dt} = \frac{dN_{immune}(t)}{Ndt}, \qquad (9)$$

мы получаем точку перегиба кривой формирования коллективного иммунитета. График для Швеции (сценарий без карантина) показан на рисунке 3.4. Для интервала 0–120 дней с нулевого дня динамика подтвержденных случаев может быть аппроксимирована экстремальной функцией:

$$N_{confirmed} = N_0 + Ae^{-e^{\frac{t-t_{max}}{w}} - \frac{t-t_{max}}{w} + 1}, \qquad (10)$$

для Швеции коэффициенты следующие:

$N_0 = 60.30$;

$A = 488.79$;

$t_{max} = 30.07$;

$w = 15.63$.

Используя эпидемиологические данные по Швеции, принимая во внимание $r_0 = 5{,}6$ и максимизируя первую производную коллективного иммунитета по времени с помощью анализа функций Ляпунова в положительном квадранте, мы получаем двойную экспоненциальную функцию (dh (t)) / dt (зеленая кривая на рисунке 2.4):

$$\frac{dh(t)}{dt} = De^{\left(-e^{\left(\frac{t-t_z}{q}\right)^p} + \left(\frac{t-t_z}{v}\right)^u\right)}, \qquad (11)$$

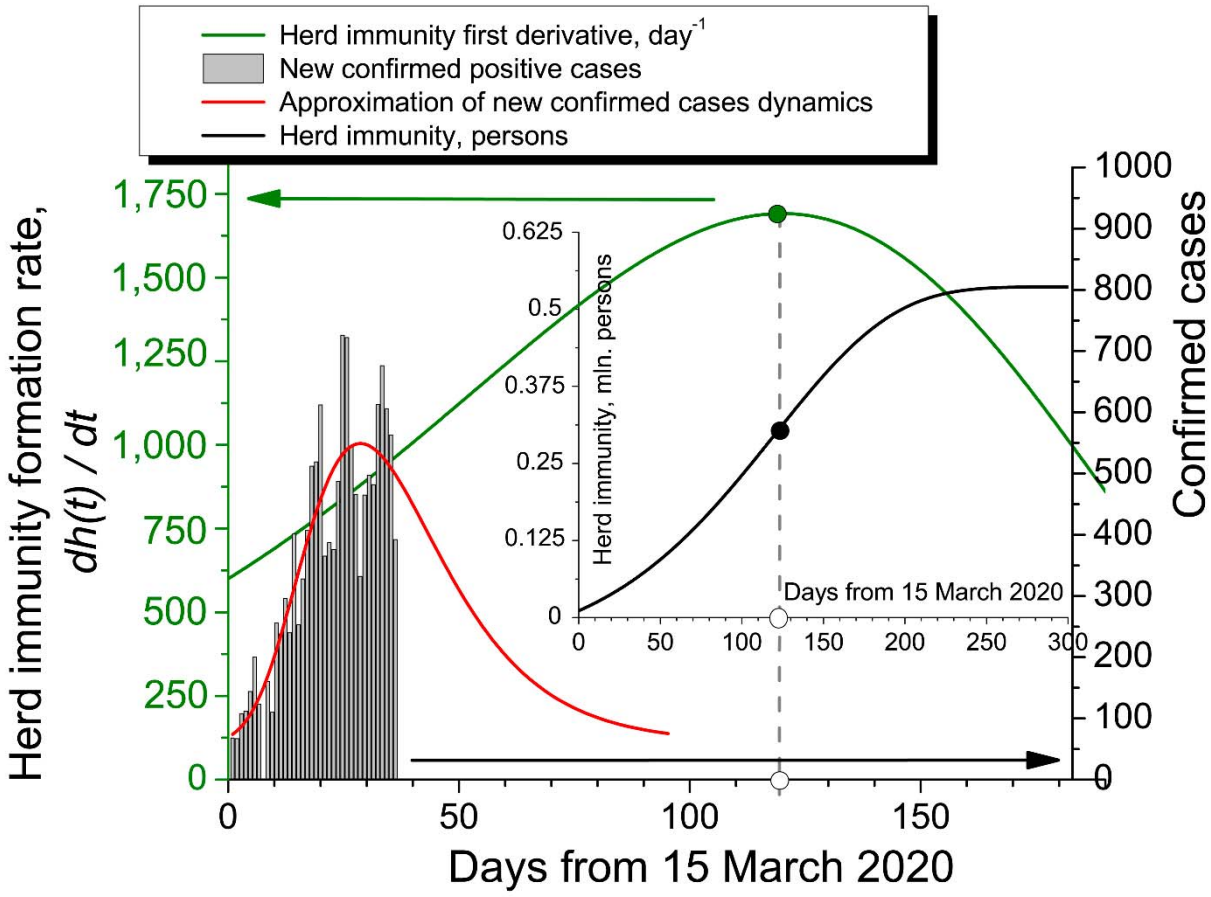

Рисунок 2.4 - Расчет формирования коллективного иммунитета для Швеции
За нулевой день принято 15 марта 2020 года. Точка перегиба кривой формирования коллективного иммунитета (черная кривая на графике-вставке) одновременно является максимумом его первой производной (зеленая кривая на основном графике).

Коэффициенты таковы:

$D = 3{,}417.46$;

$t_z = 62$;

$p = 1.6$;

$q = 150.0$;

$u = 1$;

$v = 50.50$.

Статистический анализ предложенной модели. Для коррекции / уточнения модели было проведено четыре основных итерации (прогноз дальнейшего распространения SARS-CoV-2 на апрель, май, июнь и август). Важно подчеркнуть, что постоянно обновляемая эпидемиологическая информация о пандемии скорректировала модель с марта по июнь 2020 года в значительной степени.

На рисунке 2.5 показано, что к концу 2020 года показатель PIR значительно снизился по сравнению с мартом 2020 года, достигнув низкого плато, независимо от страны или сценария сдерживания (полный карантин / частичный карантин / отсутствие карантина). Из шести государств, данные по которым представлены на рисунке 2.5, Великобритания и Россия выбрали режим полной изоляции, Нидерланды – частичной изоляции, а Швеция, Исландия и Республоика Беларусь, наоборот, предпочли не вводить «локдауны» и «самоизоляции». С мая 2020 года повсеместно наблюдалась четкая тенденция к снижению PIR. В большинстве стран к концу 2020 года PIR можно оценить примерно в 2-4 процента, в Швеции и Беларуси – 6-7 процентов, тогда как первоначальные показатели за март и апрель были значительно выше.

Возможно, это объясняется улучшением репрезентативности программ тестирования на возбудитель (ПЦР-тест) и тестирования на антитела к вирусу. В начале пандемии в центр внимания тестов, будь то официальных, спонсируемых государством или коммерческих, попадали преимущественно люди с тяжелыми симптомами COVID-19, пациенты, находящиеся в стационаре, и члены их семей. В силу этого, среди той выборки PIR мог составлять до 40-60%. Вероятно, именно так можно объяснить алогичные, сильно завышенные эпидемиологические данные, опубликованные правительствами Великобритании и Бельгии в марте-апреле (PIR почти 60% со смертностью 35-40%). Позже в исследования были включены пациенты с более легкими симптомами, бессимптомные носители и значительно более широкий круг людей, слабо контактировавших с инфицированными. Использование данных за май и июнь в качестве входных параметров для нашей модели позволило нам повысить ее прогностическую силу: коэффициент точности повысился практически до 68%, а скорректированный

коэффициент детерминации – до 89% (рисунок 2.6).

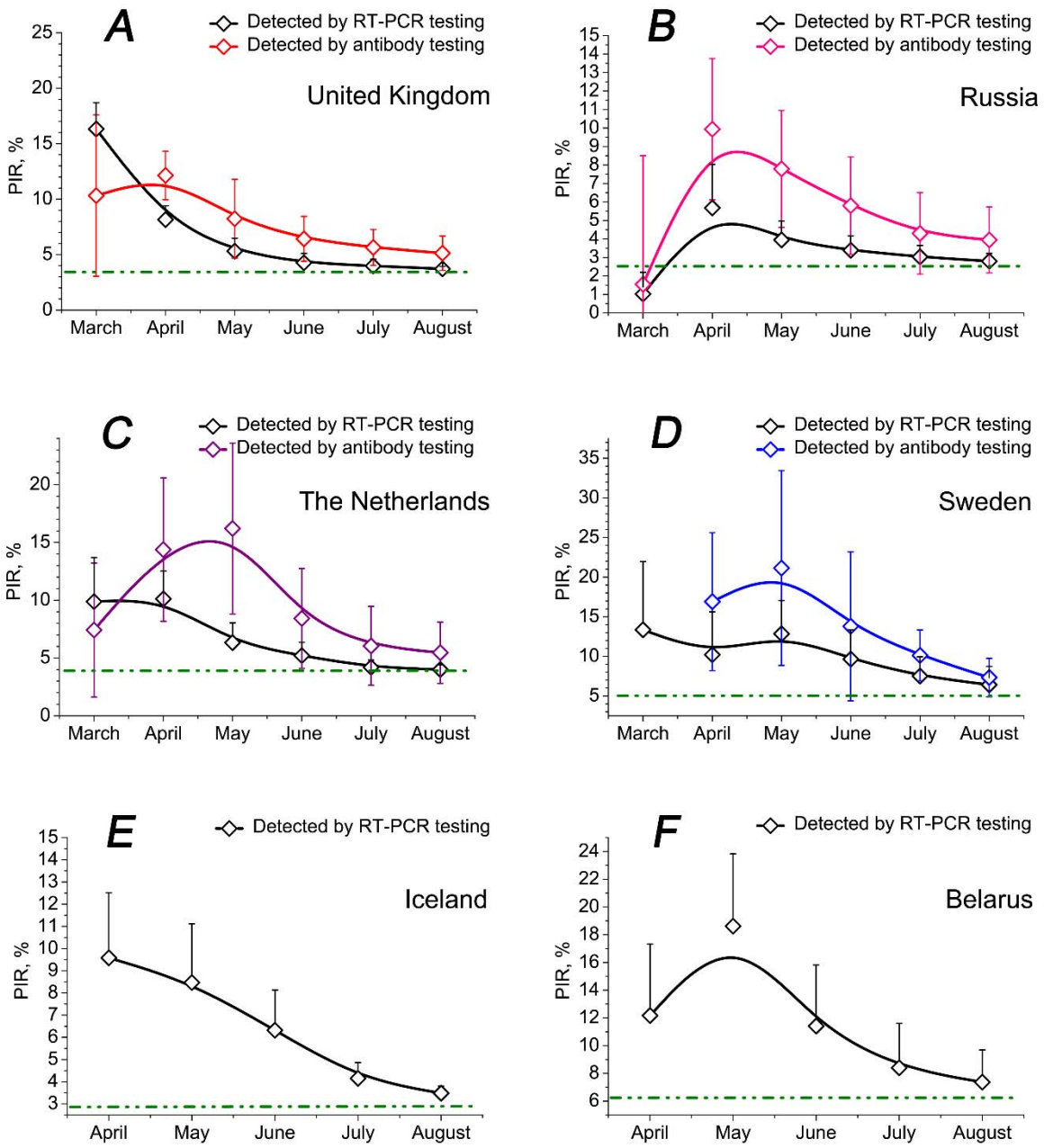

Рисунок 2.5 - Эпидемиологические данные об уровне инфицирования населения (PIR), собранные для разных стран в разные месяцы с начала пандемии SARS-CoV-2 в Европе Усы показывают оценки ложноположительных и ложноотрицательных результатов тестов на антитела и ложноотрицательные оценки для ПЦР-диагностики. Доверительный интервал (ДИ) 95%. Полный карантин сохранялся до конца мая – начала июня 2020 года: Великобритания (A). Полная изоляция до середины июня 2020 года: Россия (B). Частичная изоляция на апрель 2020 года и полная на май 2020 года: Нидерланды (C). Карантинные меры не вводились: Швеция (Германия), Исландия (Восток) и Беларусь (Франция).

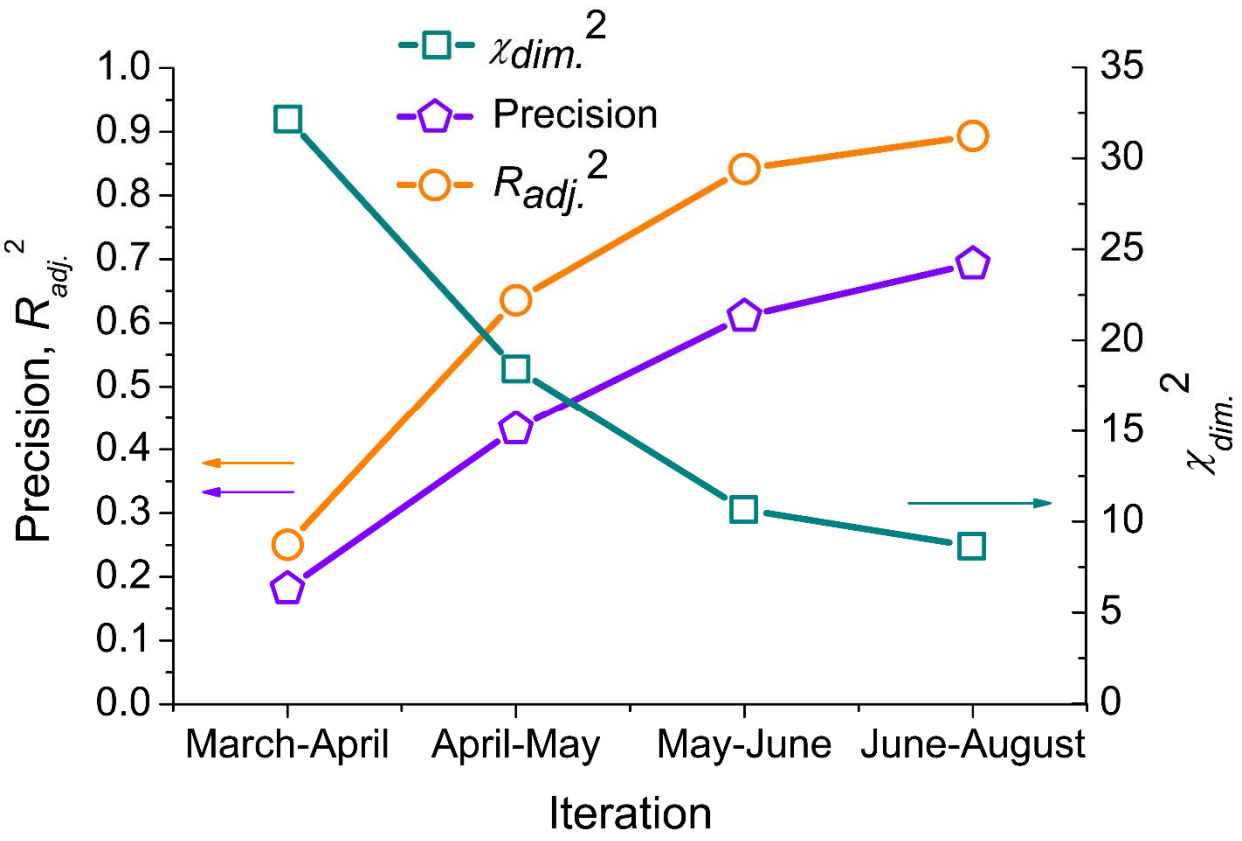

Рисунок 2.6 – Оценка точности модели для каждой итерации

Скорректированный коэффициент детерминации $R_{adj}{}^2 = 1 - \frac{(1-R^2)(n-1)}{n-k-1}$, где R – коэффициент корреляции Пирсона между экспериментальными данными и смоделированными значениями, а k – количество дескрипторов (объяснительных терминов). Точность $Prec = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\frac{|C_{mod\,i}-C_{real\,i}|}{|C_{x\,i}|}$, где $C_{x\,i}$ – наибольшее по модулю из $\{C_{mod\,i}$; $C_{real\,i}\}$; $C_{mod\,i}$ – смоделированная величина в точке i, а $C_{real\,i}$ – наблюдаемая на опыте величина в этой точке. Уменьшенное хи-квадрат посчитано по формулам: $\chi_{\dim.}{}^2 = \frac{\chi^2}{n-1}$; $\chi^2 = \sum_i \frac{(x_i - C_i)^2}{\sigma^2}$; $\sigma^2 = \frac{\sum_{q=1}^{m}\left(x_q - \bar{x}\right)^2}{m}$, где m – число данных в выборке; n – 1 – число степеней свободы, x_i – экспериментальные эпидемиологические данные, C_i – смоделированные значения, а σ^2 – дисперсия экспериментальных данных.

Для разных типов экологических окружений (закрытых сообществ, полуоткрытых помещений и открытых пространств) модель показала различную предсказательную силу (рисунок 2.7).

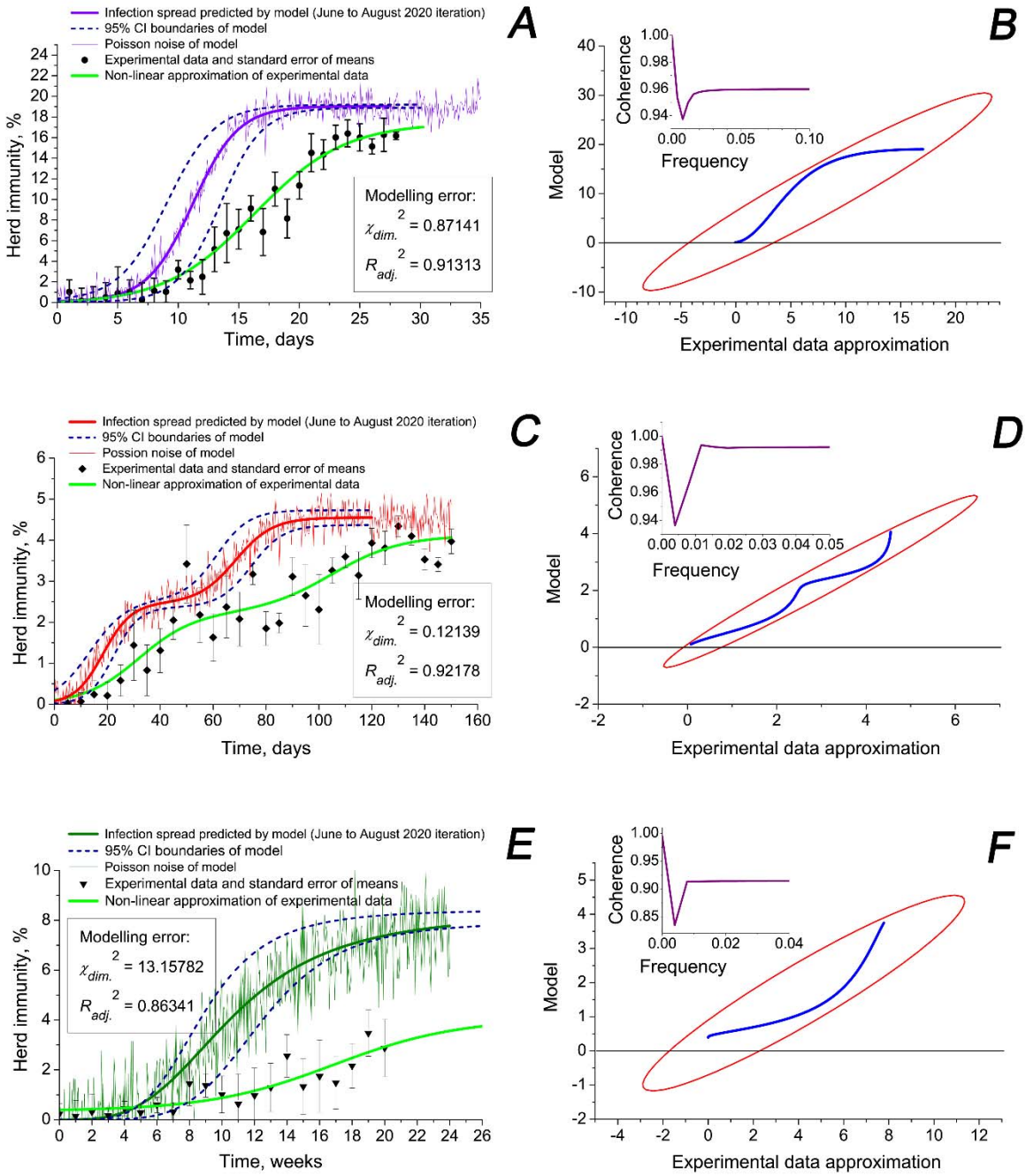

Рисунок 2.7 – Моделирование формирования коллективного иммунитета к SARS-COV-2, реальные эпидемиологические данные и статистическая обработка модели для различных типов сред

Закрытых сообществ (A, B), полуоткрытых помещений (C, D) и открытых пространств (E, F). Коэффициенты корреляции Пирсона между смоделированной кривой и аппроксимацией эпидемиологических данных: 0,95882 ($p \leq$ 0,00183) (A); 0,96290 ($p \leq$ 0,00072); и 0,93733 ($p \leq$ 0,01274). В правой части рисунка (B, D и F) показаны матрицы рассеяния (синие линии) и эллипсы корреляции для 95% ДИ (красные эллипсы). На вставках представлены графики зависимости когерентности от частоты сигналов. Согласованность между смоделированной кривой и реальными данными рассчитывалась как

$$C_{ab}(f) = \frac{|P_{ab}(f)|^2}{P_{aa}(f)P_{bb}(f)},$$

где P_{ab} – кросс-спектральная (поперечная) плотность мощности, а P_{aa} и P_{bb} – спектральные плотности мощности моделируемой кривой и усредненных экспериментальных данных. Оценки пуассоновского шума модели: 5,12% (A); 6,68% (C); и 14,47% (E).

На рисунке 2.7 представлена июньская стадия моделирования, характеризующаяся наибольшей точностью. Использованы данные, собранные в ходе эпидемиологических исследований в Великобритании, России, Нидерландах и Швеции. Как показывают оценки погрешности моделирования ($\chi_{dim.}^2$ и $R_{adj.}^2$), модель позволила получить наилучшее совпадение прогнозируемого коллективного иммунитета с экспериментальными данными для полуоткрытых помещений (многоэтажные жилые дома, кондоминиумы, огороженные жилые кварталы, большие офисы, торговые залы, складские помещения и т. д.), где был получен самый низкий $\chi_{dim.}^2$ и самый высокий $R_{adj.}^2$ (рисунок 2.7, C и D). Двухфазная структура распространения вируса, предсказанная моделью (наличие промежуточного и высокого плато), удовлетворительно согласуется с экспериментальными эпидемиологическими данными. Моделирование распространения SARS-CoV-2 в закрытых сообществах (квартиры и небольшие дома, маленькие по площади офисы) дало менее точные результаты (рисунок 2.7, A и B). Прогнозирование распространения вируса на открытых пространствах оказалось наименее точным (рисунок 2.7, E и F).

2.4 Заключение

Наше исследование опровергает предположение о том, что только строгий карантин может привести к снижению распространения SARS-CoV-2. На рисунке 2.8 показано прогнозирование формирования коллективного иммунитета с 95 и 99% доверительными интервалами. После 7-8 недель распространения вируса режимы «самоизоляции» и ее отсутствия дают статистически сопоставимые результаты (рисунок 2.8).

За отчетный период разработана уникальная модель формирования популяционного иммунитета к новому коронавирусу SARS-CoV-2 на основании баз данных результатов ПЦР-диагностики и иммунологического тестирования населения в разных странах в различных экологических средах: полного популяционного тестирования, выборочного тестирования на улицах, тестирования в замкнутых и полузамкнутых помещениях, тестирования по половозрастным группам и по группам риска [13, 14].

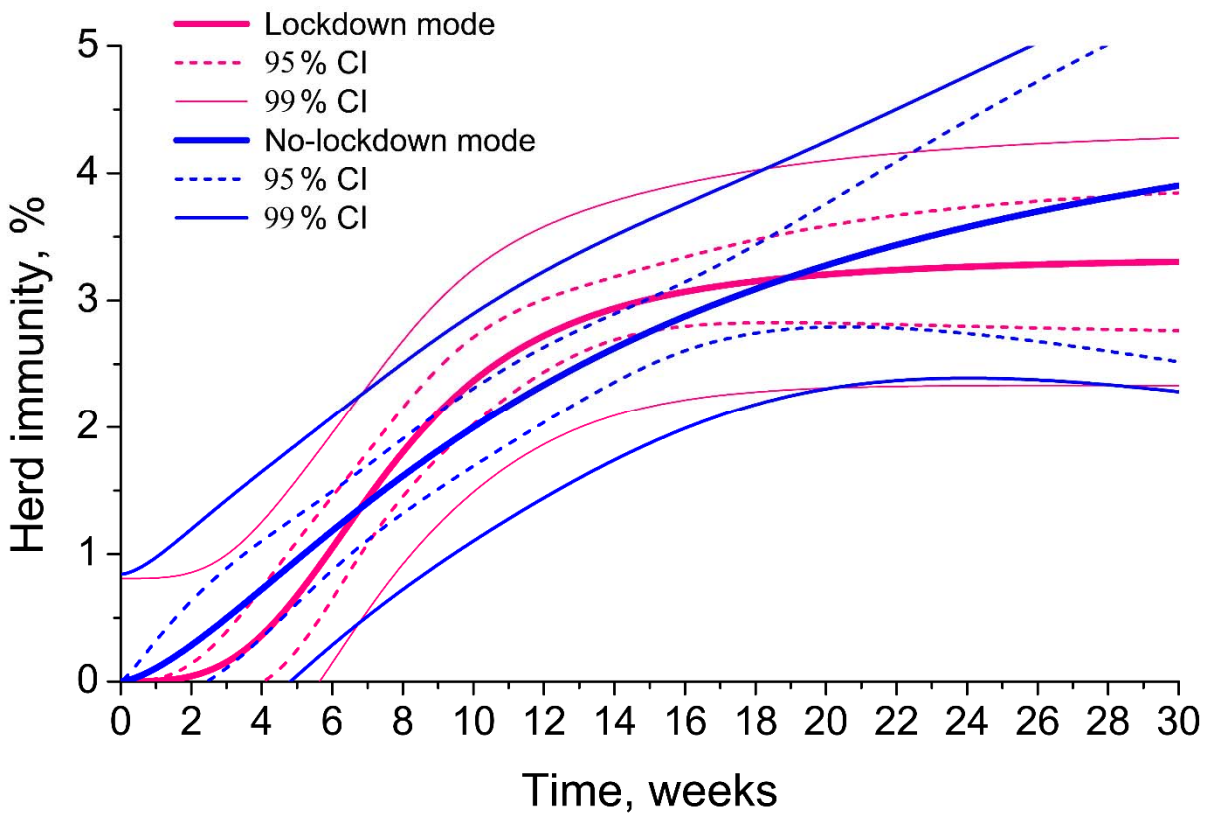

Рисунок 2.8 – Моделирование формирования коллективного иммунитета к новому коронавирусу SARS-CoV-2 (августовская, наиболее точная итерация модели) для двух сценариев

Карантина - (розовые кривые) и отсутствия карантина - (синие кривые). Жирные сплошные кривые – смоделированные значения; пунктирные кривые – границы прогностической зоны для 95% ДИ; сплошные тонкие кривые – границы прогностической зоны для 99% ДИ.

Результаты моделирования и анализ эпидемиологических данных по пандемии SARS-CoV-2 показали, что изначальное предположение об уровне коллективного (популяционного) иммунитета, равного двум третям населения Земли или даже больше, должно быть пересмотрено. Реальный уровень популяционного иммунитета к новому коронавирусу значительно меньше (по разным странам). Для России он равен примерно 3-6%. Практически повсеместное введение «локдаунов» (карантинных мер принудительного закрытия людей в помещениях) и полное отключение экономик, предпринятые весной 2020 года и продолжающиеся даже в конце 2020 года в некоторых странах, например, в Германии, Франции, Австрии или Великобритании, идут вразрез с данными о поведении вируса.

2.5 Список использованных источников

1. L'Angiocola P. D., Monti M. COVID-19: the critical balance between appropriate governmental restrictions and expected economic, psychological and social consequences in Italy. Are we going in the right direction? // Acta Biomed. – 2020. – Vol. 91. – No. 2. – P. 35-38. – DOI: 10.23750/abm.v91i2.9575

2. Taghrir M. H., Akbarialiabad H., Ahmadi Marzaleh M. Efficacy of Mass Quarantine as Leverage of Health System Governance During COVID-19 Outbreak: A Mini Policy Review // Arch Iran Med. – 2020. – Vol. 23. – No. 4. – P. 265-267. – DOI: 10.34172/aim.2020.08

3. Quigley M. C., Attanayake J., King A., Prideaux F. A multi-hazards earth science perspective on the COVID-19 pandemic: the potential for concurrent and cascading crises // Environ Syst Decis. – 2020. – May 16. – DOI: 10.1007/s10669-020-09772-1

4. Çelik I., Saatçi E., Eyüboğlu A. F. Emerging and reemerging respiratory viral infections up to COVID-19 // Turk. J. Med. Sci. – 2020. – Apr 15. – DOI: 10.3906/sag-2004-126

5. Gralinski L. E., Menachery V. D. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV // Viruses. – 2020. – Vol. 12. – No. 2. – Article E135. – DOI: 10.3390/v12020135

6. Kakodkar P., Kaka N., Baig M. N. A Comprehensive Literature Review on the Clinical Presentation, and Management of the Pandemic Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) // Cureus. – 2020. – Vol. 12. – No. 4. – Article e7560. – DOI: 10.7759/cureus.7560

7. Kock R. A., Karesh W. B., Veas F., et al. 2019-nCoV in context: lessons learned? Lancet Planet Health. – 2020. – Vol. 4. – No. 3. – Article e87-e88. – DOI: 10.1016/S2542-5196(20)30035-8

8. Kwok K. O., Lai F., Wei W. I., et al. Herd immunity - estimating the level required to halt the COVID-19 epidemics in affected countries // J. Infect. – 2020. – PII: S0163-4453(20)30154-7. – DOI: 10.1016/j.jinf.2020.03.027

9. Prompetchara E., Ketloy C., Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic // Asian Pac. J. Allergy Immunol. – 2020. – Vol. 38. – No. 1. – P. 1–9. – DOI: 10.12932/AP-200220-0772

10. Syal K. COVID-19: Herd Immunity and Convalescent Plasma Transfer Therapy // J. Med. Virol. – 2020. – Apr 13. – Article 32281679. – DOI: 10.1002/jmv.25870

11. Chavez S., Long B., Koyfman A., et al. Coronavirus Disease (COVID-19): A primer for emergency physicians // Am. J. Emerg. Med. – 2020. – Mar 24. – 7102516. – DOI: 10.1016/j.ajem.2020.03.036

12. Kolifarhood G., Aghaali M., Saadati H. M., et al. Epidemiological and Clinical Aspects of COVID-19; a Narrative Review // Arch. Acad. Emerg. Med. – 2020. – Vol. 8. – No. 1. – Article e41.

13. Sharov K. S. Creating and applying SIR modified compartmental model for calculation of COVID-19 lockdown efficiency // Chaos Solitons & Fractals. Nonlinear Science, and Nonequilibrium and Complex Phenomena. – 2020. – Vol. 141. – 110295. DOI: 10.1016/j.chaos.2020.110295

14. Sharov K. S. Trends in adaptation of fifteen European countries population to SARS-CoV-2 in March–May 2020: Can Taiwanese experience be adopted? // Journal of the Formosan Medical Association. – 2020. – 31 July. – DOI: 10.1016/j.jfma.2020.07.038

РАЗДЕЛ 3 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ У БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

3.1 Введение

Первая часть работы посвящена изучению роли метаболизма железа в пластичности губок. Способность реагировать на гипоксию развивалась у предковых форм беспозвоночных и связана с регуляцией гомеостаза железа [1, 2]. Морские губки (тип Porifera) - наиболее древние из существующих Metazoa, развиваются только в присутствии ионов железа, устойчивы к гипоксии и являются уникальной природной моделью для исследования закономерностей метаболизма железа. Пластичность клеток губок обусловлена способностью их клеток к переходу между несколькими типами способом, аналогичным трансдифференцирующимся стволовым клеткам, и позволяет им восстанавливать функциональные структуры после диссоциации тела на отдельные клетки [3]. Однако факторы, определяющие устойчивость к гипоксии и регулирующие реагрегацию клеток губок, оставались неизвестными. С помощью генетических и биохимических методов, транскриптомного и протеомного анализа мы выявили молекулярные механизмы устойчивости к гипоксии холодноводных морских губок *Halichondria panicea* и *Halisarca dujardinii* акватории Белого моря и установили сходство и отличия факторов обмена железа с таковыми у других животных, в том числе млекопитающих.

Вторая часть работы касается исследования регуляция протеома клеток насекомых при инфекции бакуловирусами. Бакуловирусы – это большие ДНК-содержащие вирусы, которые инфицируют клетки насекомых и применяются в фундаментальных научных исследованиях, биотехнологии для продукции белков, сельском хозяйстве для борьбы с насекомыми вредителями и в медицине для создания вакцин. Исследование инфекционного цикла бакуловирусов представляет интерес для фундаментальной биологии и имеет важность для практического применения вирусов. В 2020 г. было продолжено исследование роли систем контроля клеточного протеома, протеасом, лизосом, шаперонов HSP/HSC70 и сегрегазы VCP/p97, в клетках чешуекрылого насекомого *Spodoptera frugiperda* в условиях бакуловирусной инфекции. Ранее нами было показано, что активность шаперонов [4, 5], протеасом [6] и сегрегазы VCP/p97 [7] необходима для протекания вирусного цикла и формирования первого типа зрелых вирусов BV (Budded Virions - выпочковывающийся вирус). В отчетный период нами начато исследование поздних стадий вирусной инфекции, приводящих к формированию белковых тел включения правильной формы (полиэдров) и второго типа зрелых вирусов ODV (Occlusion Dirived Virions), которые обеспечивают сохранение вируса в окружающей

среде и инфицирование популяций насекомых. Полиэдры формируются белком полиэдрином, который интенсивно синтезируется на поздних стадиях инфекционного цикла.

3.2 Материалы и методы

Для первой части работы образцы холодноводных морских губок *H. dujardinii* и *H. panicea* были собраны в разные сезоны, соответствующие разным периодам жизненного цикла губок, кроме того для *H. dujardinii* были получены также образцы диссоциированных клеток и клеточных агрегатов. Образцы губок были собраны на Беломорской биологической станции МГУ в ноябре 2017-2019 гг. РНК была выделена TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc.), обработана Dnase I (Ambion) и очищена с помощью Ribo-zero rRNA Removal Kit (Human / Mouse / Rat) (Illumina). кДНК библиотеки были сконструированы с использованием NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs), проверены Agilent 2100 DNA High Sensitivity Kit и секвенированы на Illumina Hiseq2500 с парно-концевыми ридами длиной 125 пар оснований (по). Для одноконцевых прочтений длиной 50 по мРНК была выделена из тотальной с помощью NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs), далее кДНК библиотеки были сконструированы и секвенированы. На основе парноконцевых прочтений осуществлена *de novo* транскриптомная сборка с помощью программы Trinity v.2.8.4 [8]. Одноконцевые прочтения в 2-х повторах для губки и диссоциированных клеток были картированы на транскриптомную сборку. Риды были количественно оценены с помощью RSEM v.1.3.1. Для анализа дифференциальной экспрессии был использован R package *edgeR* [8].

Для иммуногистохимического окрашивания и Вестерн-блоттинга использовали ткани тела губки H. dujardinii, диссоциированные клетки и клеточные агрегаты и поликлональные антитела кролика к ALAD (ARP41657_P050, Aviva Systems Biology, Canada) и FTH1 (4393, Cell Signaling, USA), моноклональные антитела мыши к β актину (Santa Cruz Biotechnology, США), антитела козы к Ig G кролика, меченные Alexa 594 или 488 (Invitrogen, США), антитела козы к IgG мыши и кролика, конъюгированные с пероксидазой (Amersham Biosciences, Великобритания). Для выявления митохондрий использовали MitoTracker Green kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (500 nM, 1 час инкубации), флуоресценцию оценивали при λexc = 495 nm и λem = 517 nm с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM RXA2, Germany. Непараметрические данные о плотности митохондрий были представлены в виде медианы, минимума и максимальные значения. Сравнение групповых выборок проводилось с использованием Mann-Уитни

теста. Сравнения между группами проводились с использованием дисперсионного теста ANOVA и последующего теста Тьюки. Уровень значимости был установлен на 1%.

Для второй части работы рекомбинантные вирусы для экспрессии рекомбинантных белков были сконструированы с учетом опубликованных ранее результатов по анализу агрегационной способности фрагментов полиэдрина [9]. Для получения рекомбинантных бакуловирусов была использована система Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System Kit (Invitrogen). Фрагменты гена полиэдрина были встроены в донорские плазмиды pFastBac1, а затем произведена трансформация клеток E. coli. Подходящие по размеру клоны отобраны с помощью ПЦР. Правильность конструкций была проведена с использованием секвенирования по Сэнгеру. Затем была проведена рекомбинация донорской плазмидной ДНК с бакмидой в составе штамма *E.coli DH10Bac.* В результате селекции по трем антибиотикам найдены подходящие клоны, содержащие рекомбинантную бакмиду. Далее вирусные препараты были получены в результате трансфекции клеток Sf9 бакмидным препаратом. Клетки Sf9 заражали конструкциями рекомбинантных бакуловирусов (MOI 10) и оставляли на 48, 72 и 96 часов для проверки динамики экспрессии рекомбинантных белков.

Сравнение групповых выборок проводилось с использованием Mann-Уитни теста. Сравнения между группами проводились с использованием дисперсионного теста ANOVA и последующего теста Тьюки. Уровень значимости был установлен на 1%.

3.3 Результаты и обсуждение

*Роль метаболизма железа в пластичности губок***.** Чтобы охарактеризовать метаболические пути, участвующие в регенерации тела губки, проведен транскриптомный анализ клеток губок в разном морфологическом состоянии. Данные были депонированы в Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) для Halisarca dujardinii (PRJNA594150) и Halichondria panicea (PRJNA594151).

Используя сборки транскриптомов *de novo* наших *данных Halisarca dujardinii* (PRJNA594150) и *Halichondria panicea* (PRJNA594151), мы установили гомологи белков губок, участвующие в биосинтезе и транспорте гема, метаболизме железа и ответе на гипоксию. Биосинтез гема у губок включает восемь этапов, как и у других животных (рисунок 3.1).

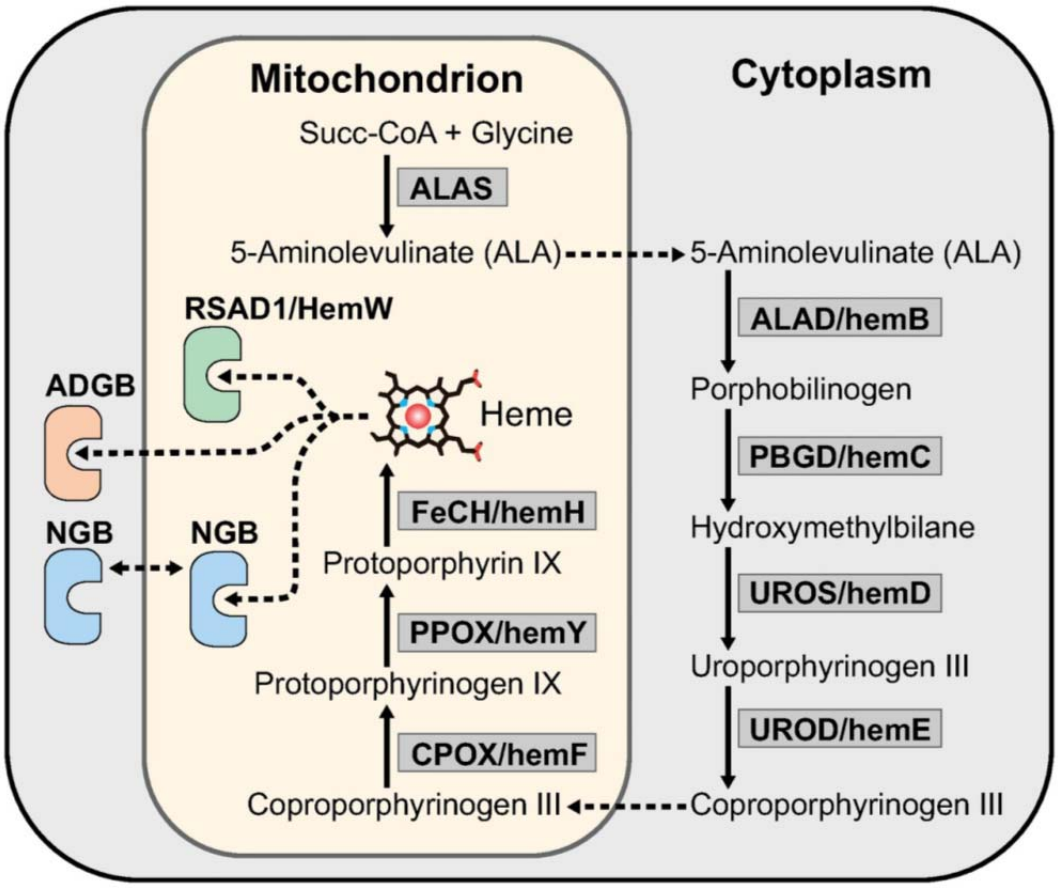

Рисунок 3.1 - Биосинтез гема в клетках губок (модифицировано из [10]).

Семь из восьми факторов синтеза гема имеют сходство (60–85%) по анализируемым ортологам, в то время как сходство синтазы уропорфириноген-III (UROS / hemD) ограничивается уровнем 50%. Факторы, участвующие в переработке зрелого гема, имеют 40% до 60% сходства. Среди них шаперон гема RSAD1 / hemW, который может вставлять гем на дыхательные ферменты и глобины, нейроглобин NGB и андроглобин ADGB. Синтез гемма инициируется в митохондриях путем превращения глицина в 5-амино-левулинат (ALA) с помощью 5-аминолевулинатсинтазы ALAS, затем в цитоплазме ALA превращается в порфобилиноген дегидратазой дельта-аминолевулиновой кислоты ALAD / hemB и затем в гидроксиметилбилан с помощью порфобилиногендеаминазы PBGD / hemC. Впоследствии синтаза уропорфириноген-III UROS / hemD продуцирует уропорфириноген III, который затем превращается в копропорфириноген III под действием уропорфириногендекарбоксилазы UROD / hemE. Затем копропорфириноген III модифицируется в митохондриях до протопорфириногена IX посредством копропорфириноген III оксидаза CPOX / HemF. Протопорфириноген IX впоследствии трансформируется в протопорфирин IX кислородзависимой протопорфириногеноксидазой PPOX / HemY. Наконец, протопорфирин IX превращается в протогем под действием

феррохелатазы. FECH / HemH. Гем-шаперон RSAD1 / hemW может вставлять гем в дыхательные глобины губок, нейроглобин NGB и андроглобин ADGB. Мы использовали дистанционный подход, реализованный в программе Erable [11], для 30 видов эукариот (включая трёх губок) для оценки относительных скоростей эволюции ферментов биосинтеза гема. Мы выяснили, что среди белков биосинтеза гема ALAD является наиболее эволюционно консервативным, а UROS / hemD эволюционирует быстрее всего. Глобины, ADGB и NGB, накапливают аминокислотные замены и изменяется быстрее, чем ферменты синтеза биосинтеза гема. NGB показывает самую высокую скорость дивергенции последовательности при сохранении важных структурных остатков. Полученные нами данные подтверждают, что путь биосинтеза гема в ходе эволюции сохраняет консервативную природу. Также были идентифицированы белки, которые участвуют в метаболизме железа, и белки путей PI3K / AKT / mTOR и COX2 / AKT / ERK1 / 2 в *H. dujardini* и *H. panicea*, которые ответственны за устойчивость к повреждениям синглетным кислородом процессы: NFkb1, BCL2, AKT, NOS1, CBS, BIRC5 / Survivin, CTH, NAMPT, TST / MPST, CDGSH / mitoNEET, MTOR. Все эти белки имеют хорошее сходство последовательностей. (От 60% до 85%) за исключением регулятора апоптоза BCL2.

Мы исследовали экспрессию фермента ALAD и белка хранения железа – ферритина FTH1 в интактной ткани тела губки, диссоциированных клетках и клеточных агрегатах. Оба белка играют важную роль в обмене железа. Фермент ALAD инициирует производство гема в ответ на гипоксию в цитоплазме, тогда как запасной белок ферритин FTH1 контролирует запас лабильного пула железа. Вестерн-блоттинг и иммунно-флуоресцентные анализы показали, что количество ALAD в диссоциированных клеток было намного больше, чем в интактной ткани губки и в агрегированных клетках (рисунок 3.2 и рисунок 3.3). Напротив, количество FTH1 значительно уменьшилось после диссоциации и далее уменьшалась после агрегации клеток (рисунок 3.2 и рисунок 3.3). Чтобы дополнительно охарактеризовать изменения в клетках губок в процессах диссоциации/реагрегации, мы сравнили плотность митохондрий в тканях тела и агрегированных клетках. Интенсивность флуоресценции митохондрий в агрегированных клетках была в два раза выше, чем в клетках ткани. ($t = 5{,}6831$, $df = 44{,}194$, $p = 0{,}009713$), что указывает на увеличение плотности митохондрий в клетки во время агрегации (рисунок 3.4).

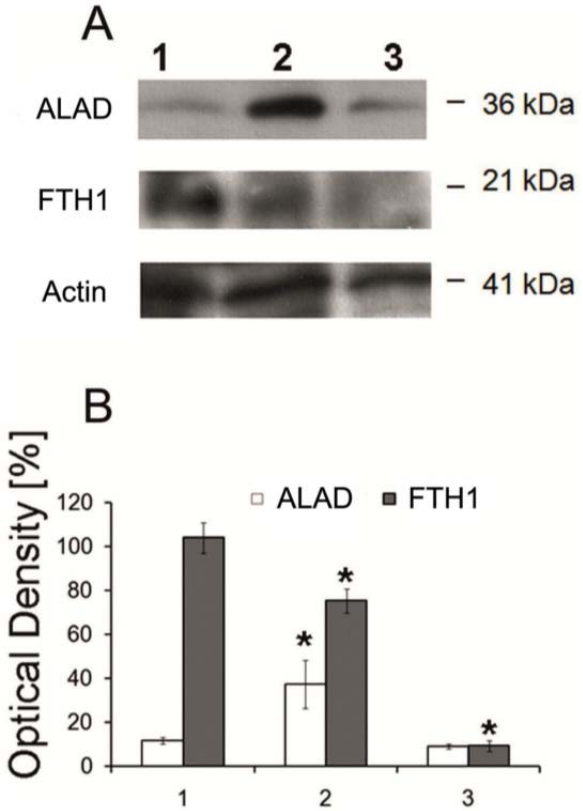

Рисунок 3.2 - Экспрессия белков ALAD и FTH1 в тканях тела (1), диссоциированных (2) и агрегированных (3) клетках морской холодноводной губки *H. dujardinii*

(A) - Вестерн-блот анализ белков ALAD и FTH1. (B) - Относительные количества (представленные оптической плотностью блотов) ALAD и FTH1, нормализованные по количеству β-актина. Количество FTH1 в ткани было принято за 100%. Показаны средние значения ± стандартные ошибки. *Достоверные отличия от ткани при $p < 0,05$ ($n = 4$).

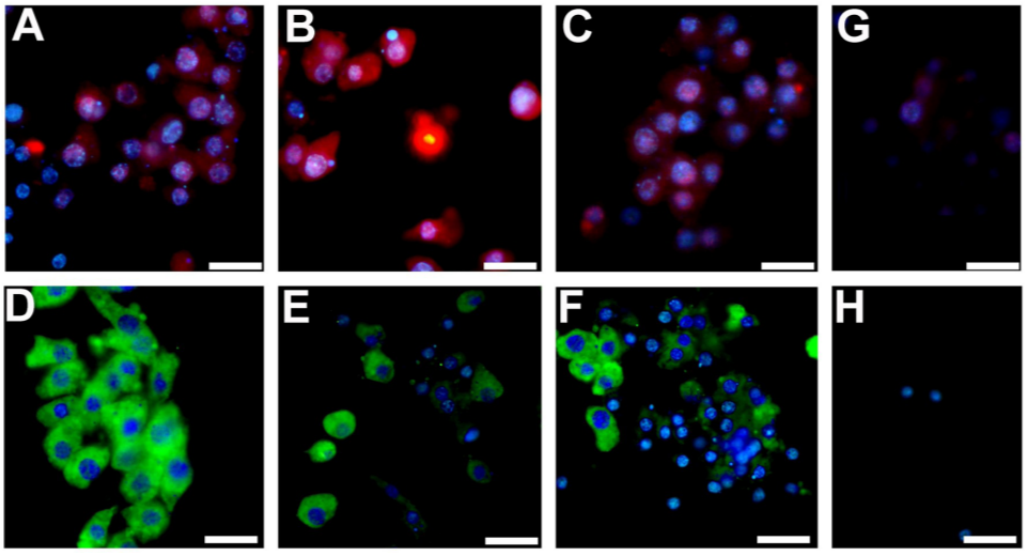

Рисунок 3.3 - Иммуннофлуоресцентная микроскопия белков ALAD и FTH1

Иммунная флуоресценция ALAD (красный) и FTH1 (зеленый) в репрезентативных образцах ткани тела H. dujardini (A, D), диссоциированные (B, E) и агрегированные (C, F) клетки. Ядра визуализировались Hoechst-33342, окрашивание (синий). G, H - контроль флуоресценции. Масштаб 10 мкм.

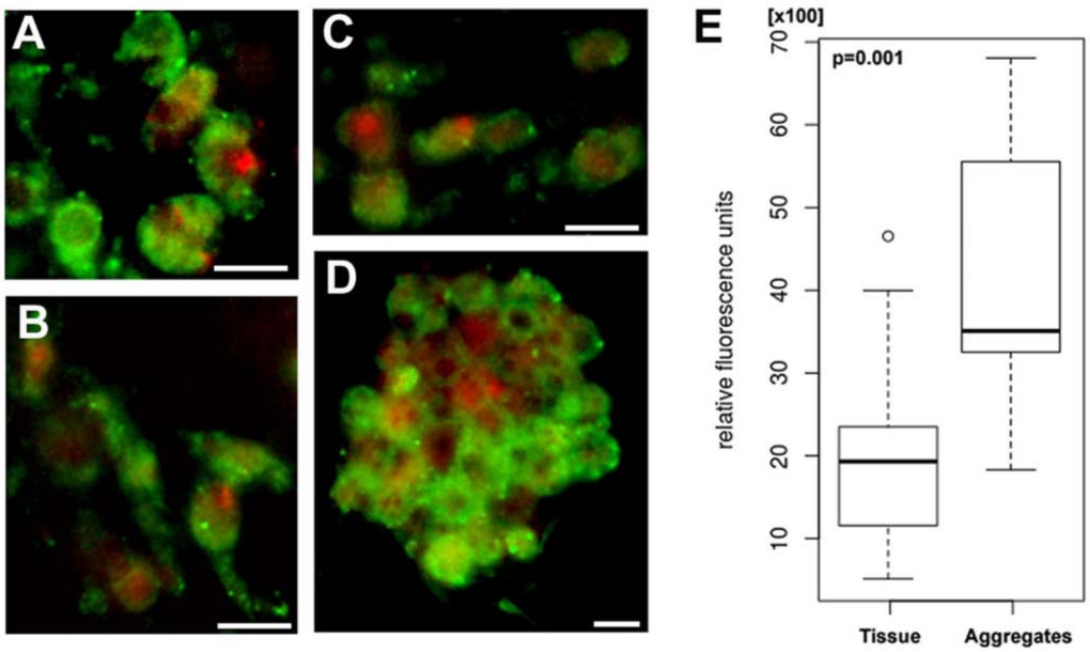

Рисунок 3.4 - Интенсивность флуоресценции митохондрий в тканях губки *H. dujardinii* (A, B), диссоциированных клетках (C) и клеточные агрегаты (D)
Митохондрии визуализировали с помощью Mitotracker green (зеленый цвет), ядра - с помощью DARQ5, флуорохром (красный цвет). Масштаб 10 мкм. (E) прямоугольная диаграмма для относительной единицы флуоресценции двух групповых образцов (линия, медиана; пределы окна, нижний и верхний квартили; усы, минимальные и максимальные значения; p-значение для Тест Манна-Уитни).

Проведенный нами транскриптомный анализ позволил сделать вывод о том, что морфогенез у губок сопровождается изменением экспрессии белковых факторов, участвующих в обмене железа и в реакции на гипоксию. Результаты анализа экспрессии ключевых метаболических факторов, связанных с обменом железа, в ходе диссоциации/реагрегации клеток губок показаны на рисунке 3.5.

Среди белков, участвующих в ответе на гипоксию и контроле реактивных форм кислорода, у губок обнаружены три гомолога транскрипционных факторов HIFα - факторов, индуцированных гипоксией (открытие которых отмечено Нобелевской премией в 2019 г.) и один гомолог ARNT/HIF1β. Экспрессия NFκB (p65) и антиапоптотического фактора BCL2 повышается в агрегированных клетках. Важно отметить, что сверхэкспрессия BCL2, индуцируемого гипоксией фактора HIFA, фактора воспаления NFκB (p65) и нейроглобина NGB характерны для многих типов клеток млекопитающих при злокачественной трансформации и скоординированно регулируется в ответ на стресс антиапоптотическими путями [12, 13].

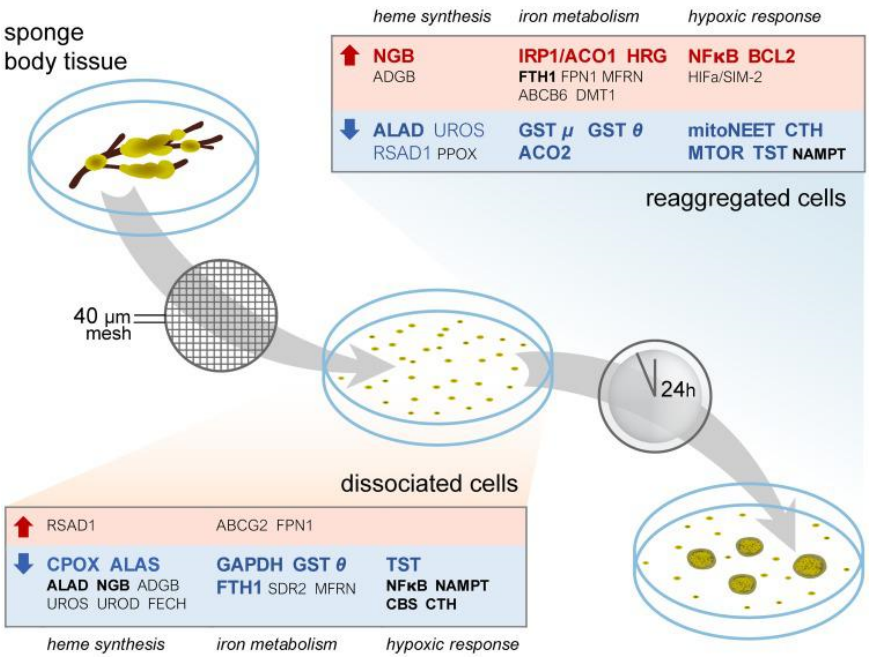

Рисунок 3.5 - Схема опытов и дифференциальная экспрессия генов, изменяющихся при диссоциации и после реагрегации (24 h) у губок

В геноме губок обнаруживаются помимо консервативных белок-кодирующих последовательностей также регуляторные элементы генов, связанных с обменом железа, характерные для млекопитающих. Так в нетранслируемой области мРНК ферритина, а также некоторых других белков губок, присутствуют "шпильки" железо-зависимого элемента (iron responsive element, IRE), с которыми связывается регулятор трансляции IRP1, отвечающий на изменения в концентрации ионов железа в клетке [14].

Регуляция протеома клеток насекомых при инфекции бакуловирусами. Для изучения поздних стадий вирусной инфекции и процесса формирования полиэдров были получены три рекомбинантных вируса AcMNPV для продукции белков, в которых фрагменты полиэдрина Ph (245 аа, 28,6 кДа) слиты в единой рамке трансляции на N-конце зеленого флуоресцентного белка (GFP). Инфекционный цикл трех вирусов для продукции белков, содержащих фрагмент полиэдрина 1-110 аа - вирус vPh(1-110)-GFP, фрагмент 58-110 аа - вирус vPh(58-110)-GFP и только GFP - вирус vGFP(-Ph), был изучен в клетках Sf9 с использованием флуоресцентной микроскопии и денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле. На поздних стадиях инфекции рекомбинантными вирусами в клетках наблюдается сильный сигнал флуоресценции от рекомбинантного белка (рисунок 3.6).

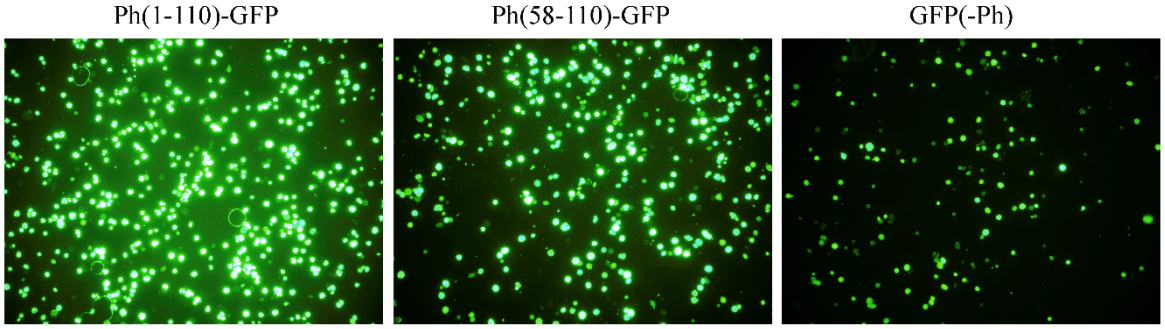

Рисунок 3.6 - Флуоресценция клеток Sf9 на стадии 72 ч после инфицирования рекомбинантными вирусами vPh(1–110)-GFP, vPh(58-110)-GFP и vGFP(-Ph) Фотографии получены на флуоресцентном микроскопе Leica DRM.

В опытах наблюдалась значительная вариация интенсивности флуоресценции клеток. Статистическая обработка сигнала флуоресценции клеток по алгоритму ANOVA показывает статистически достоверный рост сигнала флуоресценции для вируса vPh(1-110)-GFP в интервале 48-72-96 ч после инфицирования. Для вирусов vPh(58-110)-GFP и vGFP(-Ph) наблюдался рост сигнала флуоресценции в период 48-72 ч, и затем в период 72-96 ч происходила стабилизация сигнала для vPh(58-110)-GFP и падение флуоресценции для vGFP(-Ph). Анализ экстрактов инфицированных клеток денатурирующим электрофорезом в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) (рисунок 3.7) подтвердил высокой уровень продукции рекомбинантного белка Ph(1-110)-GFP и возрастание его количества в клетках в интервале 48-72-96 ч., менее эффективное накопление белка Ph(58-110)-GFP и относительно низкий уровень синтеза белка GFP(-Ph). Содержание GFP(-Ph) в инфицированных клетках могло быть надежно оценено только с помощью Вестерн-блоттинга с антителами к GFP, тогда как белки Ph(58-110)-GFP и Ph(1-110)-GFP регистрировались при окрашивании геля красителем Кумасси. Причину снижения содержания белка GFP(-Ph) в период 72-96 ч специально не исследовали. Известно, что уровень продукции разных белков под контролем промотора гена полиэдрина может существенно различаться, а некоторые рекомбинантные белки при суперэкспрессии становятся токсичными для клеток Sf9, что снижает уровень их синтеза. При этом динамика вирусного цикла для всех трех рекомбинантных вирусов вплоть до самых поздних стадий была нормальной, о чем свидетельствало накопление в клетках позднего вирусного белка DBP. Вестерн-блот анализ показал также стабильность рекомбинантных белков в ходе инфекционного цикла в период 72-96 ч. В отчетный период начаты эксперименты с метаболическими ингибиторами. Специфические ингибиторы протеасом (бортезомиб) и лизосом (3-метиладенин) в высоких концентрациях, соответственно 10 мкМ и 10 мМ, оказывали умеренный ингибирующих эффект на накопление в клетках

рекомбинантного белка Ph(1-110)-GFP и вызывали более выраженное ингибирование для Ph(58-110)-GFP и GFP(-Ph) (рисунок 3.7). Это свидетельствует об относительно невысокой зависимости синтеза белка Ph(1-110)-GFP от протеолитической активности протеасом и лизосом. Оба ингибитора могут быть использованы в данных концентрациях (10 мкМ бортезомиба и 10 мМ 3-метиладенина) в опытах по анализу формирования полиэдров.

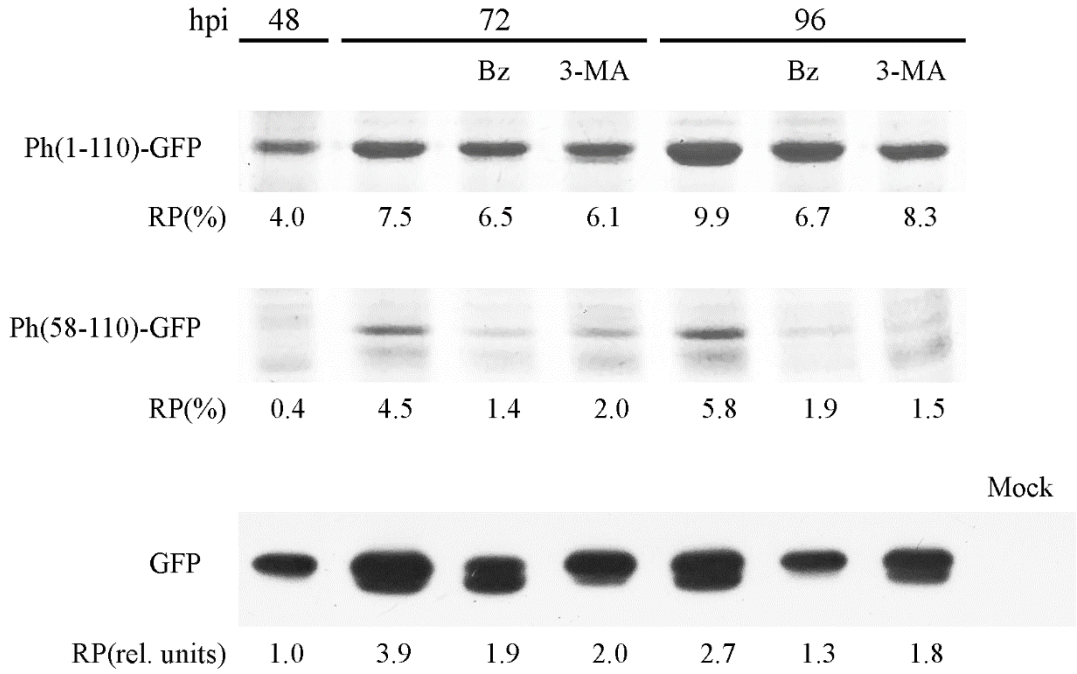

Рисунок 3.7 - Динамика накопления рекомбинантных белков Ph(1–110)-GFP, Ph(58-110)-GFP и GFP(-Ph) (GFP) в клетках Sf9 после инфицирования рекомбинантными вирусами vPh(1–110)-GFP, vPh(58-110)-GFP и vGFP(-Ph)

Экстракты ($6*10^3$ клеток на дорожку) получали на 48, 72 и 96 ч после инфицирования и фракционировали денатурирующим электрофорезом (SDS-12% PAGE). Гель окрашивали красителем Кумасси R-250. Показаны зоны геля с рекомбинантными белками. В случае вируса vGFP(-Ph) рекомбинантный белок выявляли моноклональными антителами к GFP после блоттинга. Относительное количество рекомбинантного белка (RP) определяли как отношение его окраски к окраске всего белка на дорожке для Ph(1–110)-GFP и Ph(58-110)-GFP и в относительных единицах по отношению к сигналу на 48 ч для GFP(-Ph). Ингибиторы, бортезомиб (Bz) в концентрации 10 мкМ и 3-метиладенин (3-MA) в концентрации 10 мМ добавляли на стадии 48 ч.

Рекомбинантный белок Ph(1–110)-GFP активно синтезируется на поздних стадиях инфекционного цикла, проявляет тенденцию к агрегации и формирует в клетке флуоресцирующие агрегаты (рисунок 3.8). Таким образом, рекомбинантный вирус vPh(1-110)-GFP и белок Ph(1–110)-GFP являются хорошими экспериментальными моделями для исследования поздних стадий вирусного цикла и процесса формирования полиэдров.

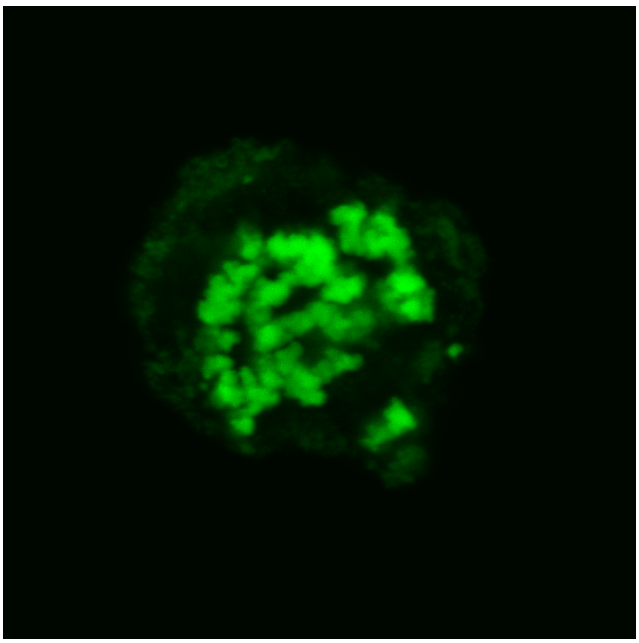

Рисунок 3.8 - Формирование комплексов рекомбинантного белка Ph(1–110)-GFP в ядрах клеток Sf9 через 72 ч после инфицирования вирусом vPh(1–110)-GFP
Фотография получена на конфокальном микроскопе Leica SP5.

3.4 Заключение

Проведенные нами транскриптомный и протеомный анализы клеток губок в процессах диссоциации/реагрегации показал, что биохимические пути метаболизма железа высших позвоночных имеют древнее происхождение [15, 16]. Консервативная природа факторов обмена железа согласуется с их важной ролью в процессах трансдифференцировки и дифференцировки клеток многоклеточных животных. Дальнейшие исследования пластичности клеток губок и метаболизма железа могут пролить свет на общие механизмы регуляции морфогенетических процессов у многоклеточных животных.

Кроме того, в отчетный переод нами получены три рекомбинантных бакуловируса для исследования поздних стадий бакуловирусной инфекции в клетках чешуекрылых насекомых. Рекомбинантные вирусы обеспечивали высокую экспрессию флуоресцентных белков под контролем сильного позднего промотора гена полиэдрина (Ph). Рекомбинантный белок, в котором N-концевой фрагмент полиэдрина (1-110 аа) слит с флуоресцентным белком GFP, стабильно экспрессировался на поздних стадиях вирусного цикла (48-96 ч после инфицирования) и формировал в клетках Sf9 высокомолекулярные агрегаты. Этот рекомбинантный белок и соответствующий рекомбинантный вирус vPh(1-110)-GFP являются подходящей модельной системой для анализа поздних стадий бакуловирусной инфекции в клетках насекомых и процесса формирования полиэдров.

3.5 Список использованных источников

1. Weir E.K., Lorpez-Barneo J., Buckler K.J., Archer S.L. Acute Oxygen-Sensing Mechanisms//New England Journal of Medicine. - 2005. - Vol. 353. - P. 2042-2055. doi.org/10.1056/NEJMra050002.

2. Semenza G.L. Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease//New England Journal of Medicine. – 2011. - Vol. 365. - P. 537-547. doi.org/10.1056/NEJMra1011165.

3. Sogabe S., Hatleberg W.L., Kocot K.M., Say T.E., Stoupin D., Roper K.E., et al. Pluripotency and the origin of animal multicellularity//Nature. - 2019. - Vol. 570. - P. 519-522. doi.org/10.1038/s41586-019-1290-4

4. Lyupina, Y.V., Zatsepina, O.G., Timokhova, A.V., Orlova, O.V., Kostyuchenko, M.V., Beljelarskaya, S.N., Evgen'ev, M.B., Mikhailov, V.S. New insights into the induction of the heat shock proteins in baculovirus infected insect cells//Virology – 2011. -Vol. 421.- P. 34-41. DOI: 10.1016/j.virol.2011.09.010.

5. Lyupina, Y.V., Orlova, O.V., Abaturova, S.B., Beljelarskaya, S.N., Lavrov, A.N., Mikhailov, V.S. Egress of budded virions of Autographa californica nucleopolyhedrovirus does not require activity of Spodoptera frugiperda HSP/HSC70 chaperones//Virus Res. - 2014. -Vol. 192. - P. 1-5. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.08.002.

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

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

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

9 Sampieri, A., Luz-Madrigal, A., Zepeda, J., Vaca, L. Identification of fragments from Autographa Californica polyhedrin protein essential for self-aggregation and exogenous protein incorporation//BMC Biochem. – 2015. -Vol. 16(5). DOI: 10.1186/s12858-015-0034-9.

10. Cenci U., Moog D., Curtis B.A., Tanifuji G., Eme L., Lukesˇ J, et al. Heme pathway evolution in kinetoplastid protists//BMC Evolutionary Biology. - 2016. - Vol. 16. - P. 109-122. doi: 10.1186/s12862-016-0664-6

11. Binet M., Gascuel O., Scornavacca C.P., Douzery E.J., Pardi F. Fast and accurate branch lengths estimation for phylogenomic trees//BMC Bioinformatics. - 2016. - Vol. 17. - P. 23-31. doi.org/10.1186/s12859-015.

12. Hinz M., Krappmann D., Eichten A., Heder A., Scheidereit C., Strauss M. NF-κB Function in Growth Control. Regulation of Cyclin D1 Expression and G 0 /G 1 -to-S-Phase Transition// Molecular and Cellular Biology. - 1999. - Vol. 19. - P. 2690-2698. doi.org/10.1128/mcb.19.4.2690.

13. Reeves KJ, Reed MWR, Brown NJ. The role of nitric oxide in the treatment of tumours with aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy//Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. - 2010. - Vol. 101. - P. 224-232. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.07.007.

14. Anderson C.P., Shen M., Eisenstein R.S., Leibold E.A. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins//Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. - 2012. - Vol. 1823. - P. 1468-1483. 10.1016/j.bbamcr.2012.05.010.

15. Finoshin A.D., Adameyko K.I., Mikhailov K.V., Kravchuk O.I., Georgiev A.A., Gornostaev N.G., Kosevich I.A., Mikhailov V.S., Gazizova G.R., Shagimardanova E.I., Gusev O.A., Lyupina Y.V. Iron metabolic pathways in the processes of sponge plasticity//Plos One. – 2020. – Vol. 15. – Is. 2. - P. e0228722. DOI: 10.1371/journal.pone.0228722. – Q2.

16. Адамейко К.И., Кравчук О.И., Финошин А.Д., Бончук А.Н., Георгиев А.А., Михайлов В.С., Горностаев Н.Г., Михайлов К.В., Бачева А.В., Индейкина М.И., Бугрова А.Е., Газизова Г.Р., Козлова О.С., Гусев О.А., Шагимарданова Е.И., Люпина Ю.В. Структура нейроглобина холодноводной губки *Halisarca dujardinii*//Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54. – № 3. – С. 474-479. DOI: 10.31857/S0026898420030039. – Adameyko K.I., Kravchuk O.I., Finoshin A.D., (...), Mikhailov V.S., Gornostaev N.G., (…), Shagimardanova E.I., Lyupina Y.V. Structure of Neuroglobin from Cold-Water Sponge *Halisarca dujardinii*//Molecular Biology. – 2020. – Vol. 54(3). – P. 416-420. DOI: 10.1134/S0026893320030036. – Q4.

РАЗДЕЛ 4 МЕХАНИЗМЫ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ВЫБОРА И РАЗВИТИЯ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

4.1 Введение

Исследования направлены на решение фундаментальной проблемы клеточных и молекулярных механизмов формирования поведенческих программ в онтогенезе и адаптивной перестройки таких программ у зрелых организмов. В основе, как запуска, так и реализации поведенческих программ лежит активность химически разнородных нейронов [1]. Беспозвоночные животные (моллюски и насекомые), на которых проведены исследования, являются классическими модельными объектом для решения проблем нейробиологии развития и в целом для общей нейробиологии. Моллюски имеют в нервной системе сравнительно небольшое число клеточных элементов, относительно легкодоступных. При этом многие из выявленных к настоящему моменту нейробиологических механизмов являются общими как для высших животных, так и для беспозвоночных. Одним из важных аспектов экспериментального подхода коллектива является сравнительное исследование нейрохимической организации поведения.

Одно из основных направлений исследований в настоящем разделе программы связано с определением роли химических факторов в механизмах организации поведения. Мы исходим из того положения, что моторное поведение дискретно – оно представлено некоторым репертуаром поведенческих актов, и каждый такой акт продуцируется определенным паттерн-генерирующим ансамблем нейронов [1-3].

В ходе исследования локомоторных генераторов у модельного объекта – прудовика – в наших предыдущих экспериментах была разработана новая экспериментальная модель, позволившая проверить предположение, что предшествующая двигательная нагрузка может на длительное время менять функциональное состояние животного, в том числе ускорять принятие решения. Развитие этой модели стало задачей серии экспериментов последних лет. При этом исследуется поведение прудовика и возможные нейронные и нейрохимические корреляты при попадании моллюска из воды на сушу. Этот момент является необычной и опасной ситуацией для данного вида пресноводных моллюсков, однако экологически оправдан и предполагает наличие поведенческих механизмов для возвращения в естественную среду.

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

4.2 Материалы и методы

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

Анализ поведения. Применяется стандартное оборудование для видеорегистрации поведения с последующим анализом с использованием программного обеспечения Ethovision XT 13 software (Nodus, the Netherlands). Кроме того, использовалась оригинальная система автоматизированной обработки данных (Д.Д. Воронцов), основанная на известных алгоритмах, но дающая такие преимущества, как предельная гибкость в добавлении требующихся по ходу исследования возможностей.

В некоторых опытах анализировали влияние предварительной двигательной нагрузки на поведение улитки на сухой стеклянной поверхности в градиенте освещения.

Электрофизиология. Исследование электрической активности редуцированных препаратов – изолированных нейронов, изолированных фрагментов ЦНС, а также полуинтактных препаратов проводилась стандартными методами нейроэтологии с использованием внутриклеточных микроэлектродов [4, 5].

Фармакология. Использовались средства коммерческих фирм-производителей нейро- и психофармакологии: серотонин, дофамин, L-3,4-дигидроксифенилаланин (L-ДОФА), тапсигаргин, протеаза тип IX – (Sigma-Aldrich®), антитела против гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), серотонина, ГАМК А рецепторов (Abcam).

Для анализа экспрессии генов нейронных сетей, управляющих моторными программами поведенческих актов, применяли метод иммуногистохимического картирования с использованием конфокального микроскопа. В работе были использованы PBS – 0,1M Na-фосфатный буфер с добавлением 0,9% NaCl, pH 7,2-7,4 (Sigma).

Используя метод ПЦР-РВ (полимеразная цепная реакция в реальном времени) создавали систему определения профиля экспрессии генов медиаторных путей в нейронах.

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

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени была выполнена на гибридайзере StepOne Plus (Applied biosystems, США), который оснащен модифицированным термоблоком VeriFlex, состоящим из шести независимо программируемых модулей, объединенных в стандартном 96-ти луночном формате. Использовали SYBR Green I – интеркалирующий краситель, специфичный к

двухцепочечной ДНК (длина волны возбуждения – 497 нм, флуоресценции – 521 нм).

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

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

Объекты. Модельный объект – пресноводный легочный моллюск большой прудовик *Lymnaea stagnalis* в течение последних 30-ти лет успешно культивируется авторами. Пресноводные улитки, и в частности *L. stagnalis*, являются классическим объектом экспериментальной эмбриологии, фармакологии, а также этологии.

Вторым модельным объектом являлись близкородственные вида наземных пульмонат – два вида виноградных улиток *Helix lucorum* и *Helix aspersa*. Они также обладают важными достоинствами: (1) доступностью - круглогодичное культивирование обоих видов; (2) высокой степенью изученности (включая собственный опыт коллектива);

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

Голожаберные молюски Tritoniidae, Dendronotidae, Dorididae

4.3 Результаты и обсуждение

Видоспецифичные формы интенсивной локомоции оптимизируют последующее поведение в новой среде у далеких в эволюционном отношении видов. Роль серотонина в немедленном и отсроченном влиянии физических нагрузок на функции мозга интенсивно изучалась у млекопитающих. Ранее мы показали немедленное влиянии интенсивной локомоции на принятие решений в условиях неопределенности у большой прудовой улитки Lymnaea stagnalis [6]. У этого животного серотонинергические нейроны контролируют движение, а серотонин модулирует многие процессы, лежащие в основе поведения, в том числе когнитивные (память и обучение). Опосредует ли серотонин поведенческие эффекты интенсивной локомоции у моллюсков, как это происходит у позвоночных, остается неизвестным. В работе 2020 г. на Lymnaea, описаны отсроченные стимулирующие эффекты интенсивного передвижения на принятие решений в новой среде. Было обнаружено, что прошлые упражнения изменяют метаболизм серотонина, а именно содержание предшественника серотонина и его катаболитов в церебральных и педальных ганглиях, по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии. Непосредственные и отсроченные эффекты упражнений на метаболизм серотонина были

разными. Более того, метаболизм серотонина в разных ганглиях регулировался по-разному. Фармакологические манипуляции с содержанием серотонина и доступностью рецепторов дают основание считать, что серотонин, вероятно, отвечает за ускорение локомоторного движения в тесте на принятие решений в условиях неопределенности, выполняемой после тренировки. Однако облегчение принятия решений, вызванное упражнениями (проявляющееся в уменьшении количества поворотов во время ориентировочного поведения), нельзя отнести к эффектам серотонина.

На рисунке 4.1 (A) показана процедура исследования эффектов повышенной двигательной активности (упражнения, E, EE) и отдыха после упражнений (ER – группа с отдыхом). В двойных слепых экспериментах улиток разделили на контрольную и экспериментальную группы и поместили в аналогичных условиях освещения перед тем, как поместить на тестовую арену. Контрольных улиток содержали в глубокой воде, чтобы они могли использовать цилиарную передвижение в течение 2 часов при аналогичных условиях освещения. Были использованы две контрольные группы: улитки, взятые непосредственно из их гнездовой колонии (Ch, отмечены зеленым цветом), и улитки, которых содержали в течение 2 часов в емкостях объемом 300 мл, наполненных той же водой, что и в племенном поголовье (Cn, отмечены синим цветом)). Последняя группа была использована для проверки того, вызывает ли новизна сама по себе локомоторное возбуждение у улиток. Подопытных и контрольных животных исследовали параллельно в одном эксперименте. Улитки экспериментальной группы «упражнение» (E, отмечено красным цветом) содержались в резервуаре (25 × 50 см), заполненном тонким (1 мм) слоем воды, который предохранял их от высыхания, но заставлял их ползать (интенсивная мышечная локомоция), чтобы компенсировать недостаток воды, поддерживающей вес панциря, в течение 2 часов (E, отмечен светло-красным цветом) или 4 часов (EE, отмечен темно-красным цветом). Улиток экспериментальной группы «отдых после тренировки» (ER, отмечен фиолетовым цветом) помещали в цилиндр, наполненный водой до 9 см, чтобы иметь возможность использовать цилиарную локомоцию в течение 2 часов после 2 часов тренировки в маловодье. На рисунке 4.1 (B) изображена поведенческая парадигма для исследования принятия решений в новой среде. Одну или четыре улитки (в разных сериях опытов) помещали в одни и те же центральные точки квадратной арены на плоскую и сухую пластиковую поверхность с односторонним асимметричным освещением. Все движения улиток отслеживались и записывались на видео в течение 15 мин в каждом эксперименте. Камера размещалась под прозрачным пластиковым дном арены.

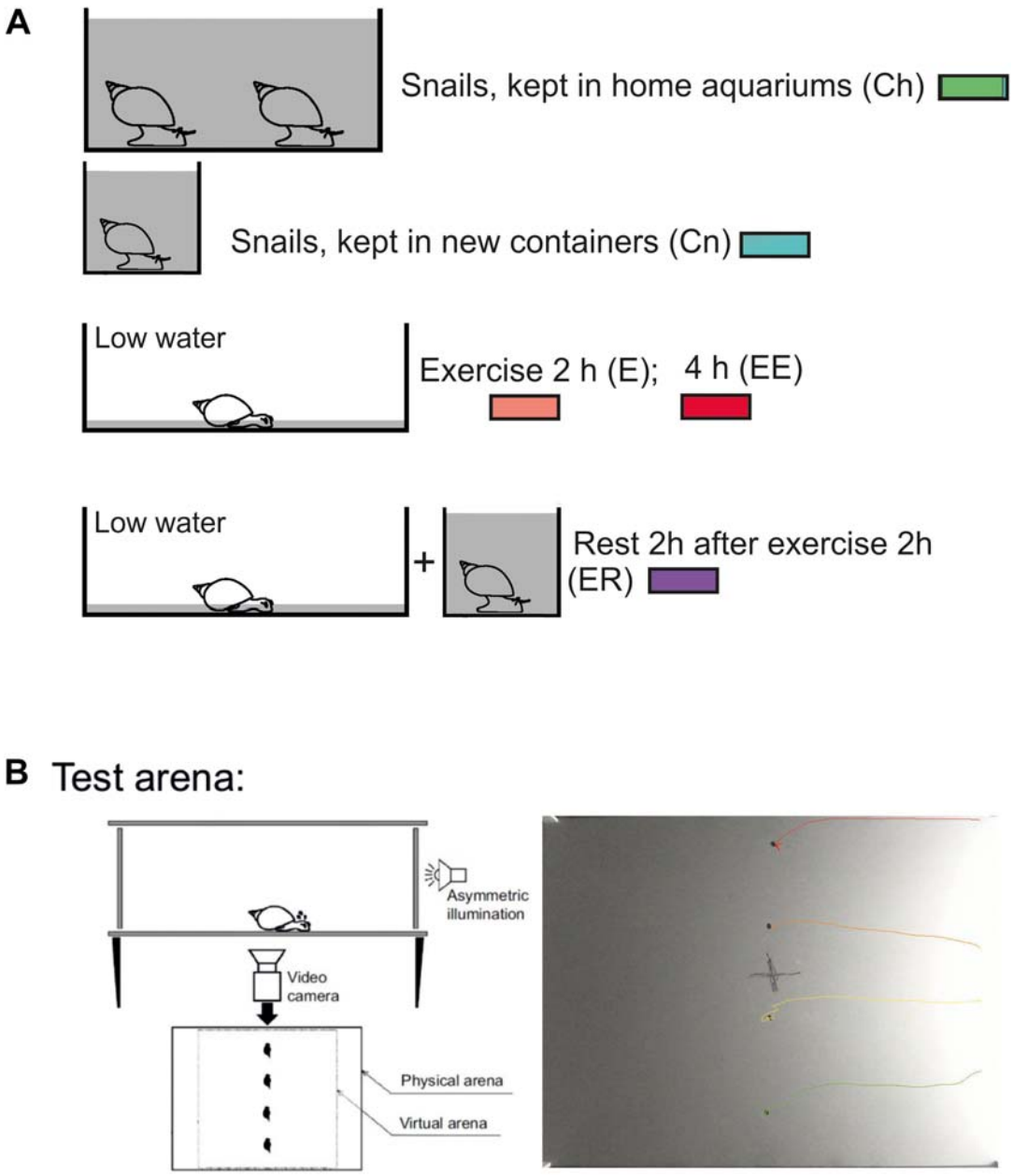

Рисунок 4.1 - Схематическое изображение экспериментальной процедуры

Для поведенческого анализа определялась граница виртуальной арены (22 см от центральной точки). Показан пример одной записи из четырех одновременно отслеживаемых улиток. В их поведении можно увидеть две четко различные фазы: (1) неопределенные движения, характеризующиеся сравнительно низкими скоростями движения, остановками и повторяющимися изменениями направления движения и (2) интенсивное быстрое передвижение в выбранном направлении [7].

Оптимизация поведения в условиях неопределенности и низкой предсказуемости событий приобрела особую актуальность в последнее время. В соответствии с нашей гипотезой, одним из факторов, активирующих естественные механизмы адаптации к

новой среде и неопределенности, является активное перемещение организма или интенсивная локомоция. Исследовано влияние видоспецифичной интенсивной локомоции на последующее поведение в новой среде у далеких в систематическом отношении животных. Показано облегчение принятия решения и достижения цели у моллюска Lymnaea stagnalis в новой среде спустя два часа после интенсивной локомоции. Показано, что серотонин вовлечен в общее ускорение поведения в новых условиях, что частично воспроизводит эффект моторной нагрузки.

Также впервые на беспозвоночных продемонстрировано различие эффектов стресса и локомоторной нагрузки в условиях новизны (рисунок 4.2).

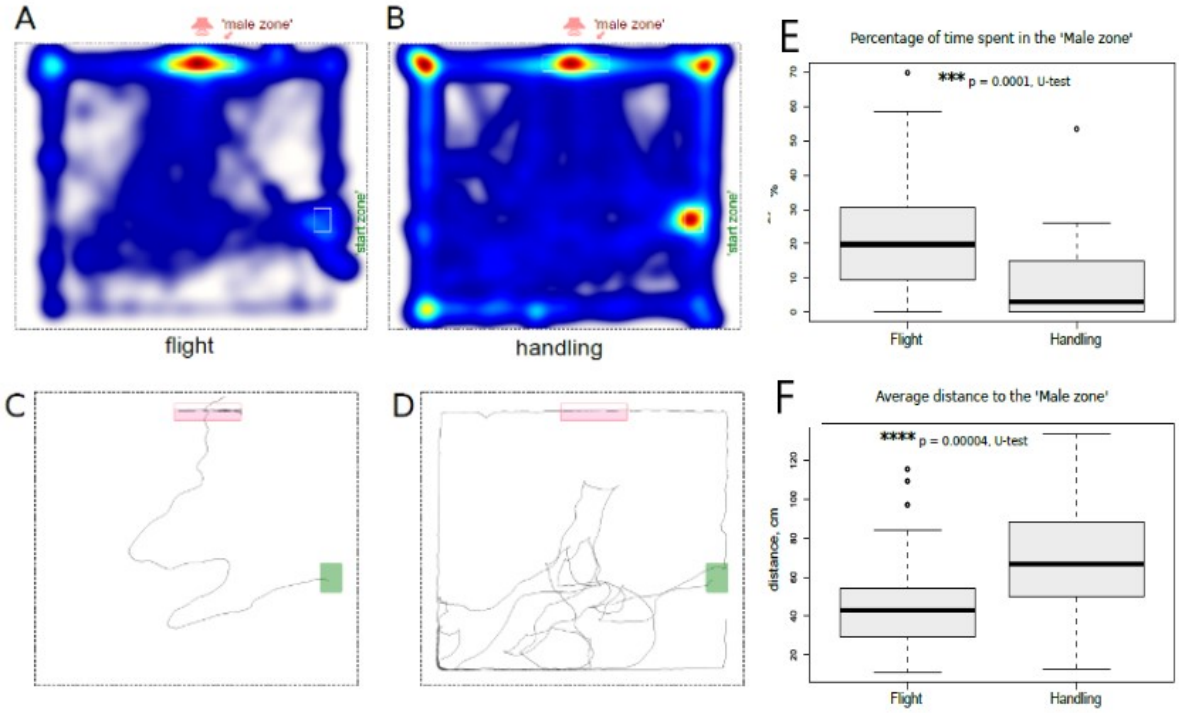

Рисунок 4.2 - Стимулирующее влияние полета на поисковое и половое поведение у самок сверчка

A, B - время, проведенное опытной и контрольной группами животных в пространстве арены. C, D - пример индивидуальных треков опытного и контрольного животного. E, F - время, проведенное около динамика, транслирующего призывную песню самца, и среднее расстояние до динамика. Flight – после полета. Handling – контроль. Зеленый прямоугольник – место размещения контейнера со сверчком на арене, розовый прямоугольник – зона около динамика [7, 8].

В исследованиях на насекомом, сверчке *Gryllus bimaculatus*, показано, что самки после интенсивной локомоции (полета) лучше справлялись с задачей нахождения источника призывной песни самца в новой среде, чем контрольные нелетавшие животные.

Фундаментальная значимость исследования определяется обнаружением естественных механизмов, повышающих адаптивность поведения в новых условиях.

Понимание моноаминергических механизмов естественной регуляции поведения в условиях неопределенности будет полезным для разработки и улучшения методов лечения психопатологических проявлений.

Серотонин активирует многие формы поведения и участвует в регуляции когнитивных функций, таких как обучение и память, у моллюсков в том числе и при выработке аверзии на пищу [9]. В работах 2020 года [10, 11] показана роль инсулина в этом серотонин-зависимом процессе. Когда улиток приучают к условному отвращению вкуса (CTA, conditioned taste aversion) в относительно длительном состоянии отсутствия пищи, они выражают долговременную память (LTM), если до теста памяти снова отказывают в еде. Мы предположили, что есть оптимальное состояние, такое как повышенный уровень инсулина и пониженный уровень глюкозы в гемолимфе, в улитки, которые позволяют вспоминать. Инъекция инсулина вместо голодания перед тестированием памяти вызвало оптимальное внутреннее состояние у улиток, которые изначально не экспрессировали CTA-LTM. Инсулин напрямую модулирует синаптическую передачу в нейронах центральной нервной системы и изменяет обучение и память [10, 11].

*Математическое моделирование самоорганизации нейронных ансамблей на основе гетерохимизма нервных клеток***.** В 2020 году продолжались ранее начатые [12, 13, 14, 15, 16]. совместные работы сотрудников лаборатории нейробиологии развития ИБР РАН и Института проблем управления им. В.А. Трапезникова РАН по математическому моделированию механизмов самоорганизации на основе медиаторного разнообразия простых нейронных сообществ с малым количеством клеток Эти исследования направлены на теоретическое обоснование оригинального представления Д.А. Сахарова о том, что для формирования генераторов поведенческих паттернов критически важными являются химические взаимодействия между нервными клетками, а не их морфологические связи, которые решают лишь ряд пространственных задач в нервной системе [1]. Многочисленные экспериментальные наблюдения реальных нейронных взаимодействий показывают, что клетки в небольших ансамблях, таких как центральные генераторы паттернов (ЦГП), генерирующие ритмическую моторную активность, взаимодействуют не только через изолированные синапсы, но и через общее внеклеточное пространство. Математическое моделирование взаимодействия нейронов в ансамбле, учитывающее нейрохимическое многообразие клеток, может быть теоретическим подтверждением сформулированного Д.А. Сахаровым представления о клеточных механизмах организации поведения. Однако, современные математические модели

рассматривают исключительно синаптические взаимодействия. Была предложена новая модель гетерогенных формальных нейронов. Описание нейронной активности обычно основано на дифференциальных уравнениях.

В настоящем исследовании выяснялось, чего можно достичь с упрощенной дискретной моделью. Нейроны взаимодействуют, выбрасывая нейротрансмиттеры в общее внеклеточное пространство. Каждый нейрон характеризуется набором трансмиттер-специфических рецепторов и набором трансмиттеров, которые он выбрасывает во время активности. Когда нейрон генерирует потенциал действия, во внеклеточную среду секретируется некоторое количество свойственных данному нейрону трансмиттеров, и каждый нейрон с подходящими рецепторами на них реагирует. Нейрон имеет несколько состояний, и переходы между состояниями следуют эндогенным паттернам, которые примерно соответствуют поведению возбуждения и торможения, наблюдаемому в биологических нейронах: осцилляции, тоническая активность, генерация плато и т. д. Нейронные взаимодействия состоят из двух компонентов: синаптических связей и внесинаптического выброса нейромедиаторов. Динамика асинхронная и событийно-ориентированная; события соответствуют изменениям активности нейронов.

Эта модель является новаторской в представлении дискретных структура для моделирования взаимодействий нейротрансмиттеров, которые играют важную роль в нейромодуляции. В проведенном исследовании была смоделирована ритмическая активность небольших нейронных ансамблей, таких как генераторы центральных паттернов (ЦГП). Смоделированные примеры включают: двухфазный ритм, генерируемый механизмом полуцентра с посттормозной отдачей (как, например, регулируется сердцебиение ЦГП пиявки), трехфазный ритм (подобный тому, как работает пищевой ЦГП в буккальной системе у прудовика) и переключение паттернов в системе нескольких нейронов (как переключение пищевого ЦГП от акта проглатывания к акту срыгивания у аплизии). Асинхронная динамика позволяет получать многофазные ритмы с длительности фаз близки к своим биологическим прототипам. Таким образом, асинхронная модель может быть использована как инструмент для изучения функциональной организации нейронных ансамблей и создания прототипов вычислительных моделей. [17].

Молекулярно-генетические и онтогенетические исследования голожаберных моллюсков. В 2020 г. продолжались исследования, посвященные отбору модельных объектов, удобных для экспериментального анализа клеточных механизмов перестроек поведения и сравнительных онтогенетических исследований [18]. Сравнительное

исследование клеточных механизмов организации поведения на родственных группах и эволюционно удаленных дает очень важные сведения как о структуре генераторов поведенческих паттернов, так и эволюционных процессов трансформации клеточных взаимодействий, обеспечивающих адаптацию к новым условиям существования. Один из интереснейших подходов состоит в поиске и исследовании гомологичных нейронов и ансамблей. На целом ряде голожаберных моллюсков были обнаружены и описаны гомологичные нейроны, которые у *Tritonia diomedea* обеспечивают видоспецифическое плавательное поведение, однако в нервной системе животных, не имеющих такого поведения, гомологичные им нейроны присутствуют в системе, но выполняют иные функции [19].

Tritonia – знаменитый модельный объект для изучения нейрохимических основ управления поведением. В нашей стране нейробиологические эксперименты на Tritonia были начаты под руководством Д.А. Сахарова на Японском море [20, 21, 22]. Вскоре в США стартовали [23] и по сей день ведутся нейроэтологические исследования на Tritonia, обитающими на Тихоокеанском побережье США. Кроме того для экспериментов в качестве модельных объектов привлечены и другие тритонииды, например Tochuina. Современные нейроэтологи активно ищут нейроны-гомологи, управляющие поведением у разных модельных моллюсков, основываясь на эволюционных взаимоотношениях моллюсков. В работе [24] впервые показано, что голожаберные моллюски Tritonia, которые используются для экспериментов в США, являются комплексом, как минимум, двух разных видов. (*T. tetraquetra* (Pallas, 1788) и *T. exsulans* Bergh, 1894). Моллюски Tritonia, которые изучались российской группой исследователей на Японском море, по-видимому, являются третьим (отдельным) видом *T. primorjensis* Minichev, 1971. В работе представлена филогенетическая реконструкция семейств Tritoniidae, Doridoxidae, Heterodorididae, Doridomorphidae, Arminidae и Dendronotoidea по трем генам маркерам. Разъяснены таксономические различия и даются корректные названия для таксонов. Приведены филогеографические данные. Сделана реконструкция анцестрального состояния для вторичных жабр вышеуказанных таксонов. Приводится схема морфологических трансформаций орального паруса и ринофоров в эволюции тритониид [24].

Дориды - одна из крупнейших групп голожаберных моллюсков, использующихся как “модельные” системы для исследований нейрохимической регуляции поведения. Эта группа насчитывает более 2000 видов. Одна из не решенных проблем в эволюции дорид - это филогенетические отношения между криптобранхиальными (имеющими жаберную полость) и фанеробранхиальными (без жаберной полости) доридами. Был применен метод

интеграции филогенетических данных с онтогенетической моделью эволюции дорид. Показано, что предковая организация дорид с большой степенью вероятности была криптобранхиальной (имеющей жаберную полость). Была применена реконструкция филогенетических деревьев на основе четырех генетических маркеров, включающих большинство основных таксонов дорид. Впервые были выяснены филогенетические отношения некоторых редких таксонов. Была обновлена система дорид в целом. Было выделено новое семейство (рисунок 4.3). Как отдельная, большая часть исследования была проведена ревизия рода Cadlina, описаны несколько новых для науки видов, приведены подробные филогеографические данные для представителей этого рода [25]. Одной из популярных моделей для изучения нейрохимических основ поведения является нервная система голожаберных моллюсков Dendronotus. До недавнего времени для экспериментов в основном использовались *D. iris* и *D. frondosus*. Развитие молекулярных методов в последние годы привело к обнаружению среди моллюсков рода Dendronotus большого числа новых видов, которые ранее не выявлялись.

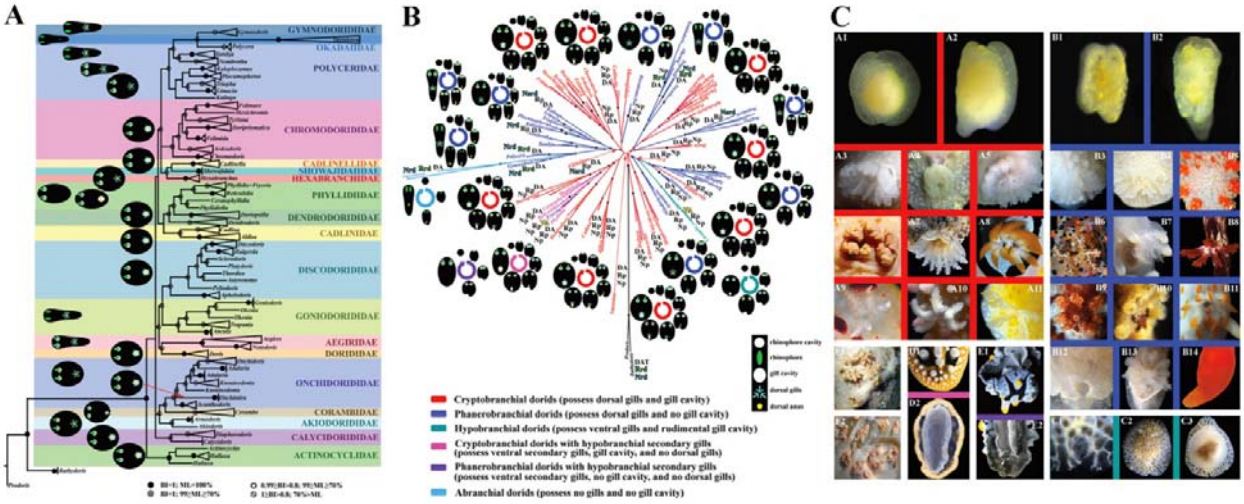

Рисунок 4.3 - A. - филогенетические отношения моллюсков дорид на основе четырех генов-маркеров. B. - интеграция онтогенетических данных и молекулярно-филогенетических реконструкций для основных групп дорид. C. - сравнение строения жаберной полости ранних ювенильных и взрослых стадий развития у различных групп дорид

Так, в период 2010-2020 гг. было описано 12 новых видов для мировой фауны. Увеличение видового состава рода потребовало глобальной ревизии, проведенной, как на основе морфологических, так и молекулярных данных. Без проведения ревизии модельных объектов невозможно оценить точность результатов экспериментов. В настоящей работе проведена наиболее полная ревизия этого таксона. В работе приводится филогенетическая реконструкция большинства таксонов рода Dendronotus (по четырем

генетическим маркерам), дается полный синопсис, приводятся филогеографические данные, восстанавливается таксономический статус рода Pseudobornella и выделяется новый род Cabangus. Показано, например, что модельный объект *D. frondosus* на котором раньше проводились эксперименты, мог быть смешан, как минимум, с еще семью видами: *D. lacteus, D. elegans, D. europaeus, D. nordenskioeldi* (обитающих в водах Атлантики) и *D. primorjensis, D. kalikal* и *D. kamchaticus* (из вод Тихого океана) [26].

В российских водах Камчатки недавно был обнаружен голожаберный моллюск рода Dendronotus, новый для фауны России. Идентификация этого моллюска, несмотря на молекулярно-генетические данные, была затруднена из-за произошедшей в 1970 году ошибки, когда морфологические характеристики двух разных (но внешне похожих) видов Dendronotus были перепутаны, а виды были идентифицированы неверно. В нашей работе 2020 г. приводятся убедительные доказательства в пользу того, что *D. robilliardi* является валидным видом. Даются, как исторические, морфологические, так и молекулярно-генетические доказательства. На основе молекулярных маркеров построены сети гаплотипов. Приводятся филогеографические данные [27].

Результаты полевых исследований голожаберных моллюсков вошли в книгу о голожаберных моллюсках острова Матуа (Средние Курилы) с описанием одного нового вида для мировой фауны (приводится его морфологический диагноз и молекулярные данные для генетического маркера 16S). Остров Матуа является одним из стратегически важных для России районов. В атласе даны фотографии и описания более 400 видов морских и наземных беспозвоночных животных, рыб, водорослей, наземных растений, грибов и лишайников, обитающих на острове Матуа, относящемся к группе средних Курильских островов, и труднодоступная группа российских островов, отличающаяся большим своеобразием и высоким уровнем эндемизма биоты, и, в то же время, очень слабой её изученностью. В результате новых исследований, проведенных в этом районе, для многих видов впервые описана их природная окраска и другие прижизненные признаки. Четверть собранных видов впервые были указаны для региона. Атлас может быть полезен широкому кругу биологов при проведении исследовательских работ, студентам, а также всем интересующимся морской и наземной флорой и фауной. Можно использовать в качестве полевого определителя [28].

В 2020 г продолжалось исследование функционального значения изменения уровня экспрессии нейронспецифических генов моллюсков. В частности, ранее найденного нами гена, кодирующего предшественник (preHelixSFamid) - одного из представителей большого семейства педальные пептиды/оркокинины.

Была продолжена начатая ранее серия экспериментов, направленных на выявление

генов, которые могут участвовать в формировании стабильных состояний генератора локомоции. Подтверждены полученные ранее предварительные данные о пространственном распределении изменений экспрессии и особенностях этой динамики при разных по продолжительности локомоторных нагрузках.

4.4 Заключение

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

Представляется перспективным развитие направлений, связанных с поиском молекулярно-генетических механизмов адаптивной пластичности: поиском генов, изменение экспрессии которых коррелирует с изменением мотивационного состояния животного и пластическими модификациями поведения. В настоящее время ведется работа по анализу транскриптома большого прудовика при сравнении разных функциональных состояний животного.

4.5 Список использованных источников

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

2. Zhong, G., Shevtsova, N.A., Rybak I.A. and Harris-Warrick R. M.. Neuronal activity in the isolated mouse spinal cord during spontaneous deletions in fictive locomotion: Insights into locomotor CPG organization//J. Physiol. - 2012. - Vol. 590. - P. 4735-4759.

3 Gadboisa S., Sieverta O., Reevea C., Harrington F.H. Fentress J.C Revisiting the concept of behavior patterns in animal behavior withan example from food-caching sequences in Wolves (Canis lupus), Coyotes (Canis latrans), and Red Foxes (Vulpes vulpes)//Behavioural Processes. - 2015. - Vol. 110. - P. 3–14.

4. Chistopolsky I.A., Sakharov D.A. Biosensors detect patterned chemical signals generated by network of neurons//Simpler Nervous Systems (VII East European conference of ISIN). - 2006 - P. 122.

5. Dyakonova V.E., Hernádi L., Ito E., Dyakonova T.L., Chistopolsky I.A., Zakharov I.S., Sakharov D.A. The activity of isolated neurons and the modulatory state of an isolated

nervous system represent a recent behavioural state//J. Exp. Biol. -2015. -Vol. 218 (Pt 8). - P.1151-1158.

6. Korshunova, T. A., Vorontsov, D. D., and Dyakonova, V. E. Previous motor activity affects transition from uncertainty to decision-making in snails//J. Exp. Biol. -2016. – Vol. 219. - P. 3635–3641.

7… Aonuma H., Mezheritskiy M., Boldyshev B., Totani Y., Vorontsov D., Zakharov I., Ito E., Dyakonova V. The Role of Serotonin in the Influence of Intense Locomotion on the Behavior Under Uncertainty in the Mollusk Lymnaea stagnalis//Front Physiol. – 2020 .- Mar 17;11:221. doi: 10.3389/fphys.2020.00221. eCollection 2020.

8. Mezheritskiy M, Vorontsov D, Lapshin D, Dyakonova V. Previous flight facilitates partner finding in female crickets//Sci Rep, - 2020. – Vol. 10. 22328. https://doi.org/10.1038/s41598-020-78969-w.

9. Balaban P. M. Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail//Neurosci. Biobehav. Rev. – 2002. – Vol. 26. – P. 597–630. doi: 10.1016/s0149-7634(02)00022-2

10. Totani Y., Nakai J., Dyakonova V.E.1, Lukowiak K., Sakakibara M., Ito E. Induction of LTM following an Insulin Injection//eNeuro. – 2020. – Vol. 7. – Is. 2. DOI: 10.1523/ENEURO.0088-20.2020.

11. Nakai J., Totani Y., Hatakeyama D., Dyakonova V.E.1, Ito E. Another example of conditioned taste aversion: Case of snails//Biology. – 2020. – Vol. 9. – Is. 12. Art.no 422. P. 1-14. DOI: 10.3390/biology9120422.

12. Базенков Н.И., Воронцов Д.Д., Дьяконова В.Е., Жилякова Л.Ю., Захаров И.С., Кузнецов О.П., Куливец С.Г., Сахаров Д.А. 2017. Дискретное моделирование межнейронных взаимодействий в мультитрансмиттерных сетях//Искусственный интеллект и принятие решений. - № 2. – С. 55-73.

13. Кузнецов О.П., Базенков Н.И., Болдышев Б.А., Жилякова Л.Ю., Куливец С.Г., Чистопольский И.А. Асинхронная дискретная модель химических взаимодействий в простых нейронных системах//Искусственный интеллект и принятие решений. - 2018. - № 2. - С. 3-20. DOI: 10.14357/20718594180201

14. Bazenkov N., Dyakonova V., Kuznetsov O., Sakharov D., Vorontsov D., Zhilyakova L.. Discrete Modeling of Multi-transmitter Neural Networks with Neuronal Competition // Advances in Intelligent Systems and Computing. - 2018. - Vol. 636. P. 10–16. DOI 10.1007/978-3-319-63940-6_2. (Scopus)

15. Bazenkov N., Zhilyakova L, Dyakonova V. E., Kuznetsov O. P., Sakharov D. A.,. Vorontsov D. D. Formal modeling of heterogeneous neural ensembles with broadcast

communications. Abstracts of EMBO|EMBL Symposium: Probing Neural Dynamics with Behavioural Genetics EMBL Heidelberg, Germany, 10 - 13 Apryl 2019. MERA Print & Design, Sandhausen, Germany. p. 61.

16. Boldyshev B., Kuznetsov O. P, Zhilyakova L., Bazenkov N.,. Dyakonova V. E. Simulation of CPG reconfiguration by discrete computational modeling. Abstracts of EMBO|EMBL Symposium: Probing Neural Dynamics with Behavioural Genetics EMBL Heidelberg, Germany, 10 - 13 Apryl 2019. MERA Print & Design, Sandhausen, Germany. p. 712.

17. Bazenkov N., Boldyshev B., Dyakonova V, Kuznetsov O. Simulating Small Neural Circuits with a Discrete Computational Model//Biol Cybern. - 2020. – Vol. 114. – P. 349-362. doi: 10.1007/s00422-020-00826-w. Epub 2020 Mar 13.

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

19. Newcomb J. M., Katz· P.S. Homologues of serotonergic central pattern generator neurons in related nudibranch molluscs with divergent behaviors//J Comp Physiol A. -2007. - Vol. 193. - P. 425–443 DOI 10.1007/s00359-006-0196-4 123

20. Вепринцев Б.Н., Крастс И.В., Сахаров Д.А. Нервные клетки голожаберного моллюска Tritonia diomedea Bergh /Биофизика. - 1964. - Т. 9. - № 3. - С. 327.

21. Sakharov D.A., Borovyagin V.L., Zs.-Nagy I. Light, fluorescence and electron microscopic studies on “neurosecretion” in Tritonia diomedea Bergh (Mollusca: Nudibranchia)//Cell and Tissue Research. - 1965. - Т. 68. - № 5. - С. 660-673.

22. Боровягин В.Л., Сахаров Д.А. Ультраструктура гигантских нейронов тритонии. Атлас. М. «Наука». – 1968.

23. Willows AO, Hoyle G. Neuronal network triggering a fixed action pattern//Science. – 1969. - Vol. 166. – P. 1549-1551. doi: 10.1126/science.166.3912.1549.

24. Korshunova T., Martynov A. Consolidated data on the phylogeny and evolution of the family Tritoniidae (Gastropoda: Nudibranchia) contribute to genera reassessment and clarify the taxonomic status of the neuroscience models Tritonia and Tochuina//PLoS ONE. -2020. – Vol. 15(11): e0242103. - P. 1-47.

25. Korshunova T., Fletcher K., Picton B., Lundin K., Kashio S., Sanamyan N., Sanamyan K., Padula V., Schrodl M., Martynov A. The Emperor’s Cadlina, hidden diversity and gill cavity evolution: new insights for the taxonomy and phylogeny of Dorid nudibranchs (Mollusca: Gastropoda)//Zoological Journal of the Linnean Society. – 2020. – Vol. 189. - P. 762-827. DOI: 10.1093/zoolinnean/zlz126.

26. Korshunova T., Bakken T., Grøtan, V.V., Johnson K. B., Lundin K., Martynov A. A

synoptic review of the family Dendronotidae (Mollusca: Nudibranchia): a multilevel organismal diversity approach//Contributions to Zoology. – 2020. – P. 1-61. https://doi.org/10.1163/18759866-bja10014, Q1-Q2

27. Martynov A., Fletcher K., Korshunova T.1 A 50-year conundrum is conclusively solved: Nudibranchs Dendronotus albus (= D. diversicolor) and Dendronotus robilliardi are valid species with compelling evidence from type materials, bibliographic sources, and molecular data//Canadian Journal of Zoology. – 2020. – Vol. 98. – Is. 9. – P. 623-632. DOI: 10.1139/cjz-2019-0261.

28. Мартынов А.В., Коршунова Т.А.1 Голожаберные моллюски (моллюски отрядов Doridida и Nudibranchia)//Флора и фауна острова Матуа (средние Курильские острова) : атлас-определитель. Том 1. Море / под ред. К.Э. Санамян, Н.П. Санамян. Череповец : ООО «Интрон». - 2020. - С. 172–195.

РАЗДЕЛ 5 РЕЦЕПТОРЫ И СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ В КЛЕТКАХ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

5.1 Введение

Фактор Виллебранда (ФВ) играет ключевую роль в первичном гемостазе. В нормальном состоянии он перманентно синтезируется в клетках эндотелия и экспонируется ими на внутренней поверхности сосудов в виде гигантских мультимеров, масса которых изначально достигает 20000 кДа. Гигантские мультимеры сразу подвергаются частичному расщеплению металлопротеиназой ADAMTS13 на менее крупные фрагменты массой от 250 кДа, которые поступают в кровоток. В случае повреждения стенки сосуда ФВ опосредует адгезию тромбоцитов на поврежденном участке, обеспечивая таким образом защиту от кровотечений. Воспалительные процессы и аутоиммунные расстройства могут вызывать избыточный синтез и секрецию ФВ клетками эндотелия. Избыток гигантских мультимеров на поверхности стенок сосудов приводит к развитию тяжелых тромботических микроангиопатий с повреждениями мозга, почек, сердца и других жизненно важных органов и систем [1].

Основным предметом исследований в этом году была роль молекул, которые образуются и секретируются в местах воспаления, в регуляции секреции ФВ эндотелиальными клетками. Ранее было показано, что активные формы кислорода, выделяемые в большом количестве нейтрофилами, а также гистамин, секретируемый тучными клетками, и тромбин являются патогенетическими факторами тромбозов [2-4]. Тем не менее, участие этих молекул в регуляции синтеза и секреции ФВ в норме и при развитии тромботических микроангиопатий на сегодняшний день изучено слабо. Во многом это объясняется ограничениями используемыхдля исследования данных механизмов моделей и методов. В частности методы классической иммуноцитохимии, которые применяются для специфического окрашивания антигенов, в большинстве случаев требуют предварительного фиксирования клеток и тканей. Фиксирование всегда приводит к изменениям в клеточных структурах и делает невозможными исследования биологических процессов в динамике. Данная проблема может быть решена, если для окрашивания использовать специфичные к антигенам интереса олигонуклеотиды - аптамеры. В отличие от антител применение специфичных аптамеров не требует предварительной фиксации клеток, а поспецифичности аптамеры не уступают антителам [5]. Одной из задач данной работы был поиск подхода для окрашивания ФВ в живой культуре эндотелиальных клеток (ЭК) с помощью специфичного к А1 домену ФВ аптамера ARC1779 (US20090203766A1). Необходимо было выяснить, насколько аптамер

ARC1779 применим для регистрации изменений в синтезе и секреции ФВ в живых культивируемых ЭК.

Другая проблема, которой посвящены исследования лаборатории, касается состояния маркеров эндотелиальных клеток в норме и при патологии. Несмотря на многочисленные исследования, мы далеки от понимания закономерностей экспрессии эндотелиальных маркеров как в норме, так и при различных патологических состояниях организма.

Третья проблема, которой было уделено значительное внимание, был вопрос эффективного лечения детей с приобретённой тромботической тромбоцитопенической пурпурой. Это редкое и крайне тяжелое заболевание, которое в отсутствие эффективного и своевременного лечения приводит в 90% случаев к поражению жизненно важных органов и смерти. В основе заболевания лежит аутоиммунная реакция, в результате которой вырабатываются антитела, инактивирующие металлопротеиназу ADAMTS13. Как уже упоминалось выше, данный фермент расщепляет гигантские мультимеры фактора Виллебранда, не допуская, таким образом, произвольного тромбообразования в микрососудистом русле. Согласно общепринятому протоколу, пациентов с приобретенной ТТП лечат плазмообменом и иммуносупрессией с применением глюкокортикоидов и ритуксимаба. Применение данного протокола позволило снизить уровень смертности до 10% [6]. Однако есть пациенты с ТТП, которые невосприимчивы к терапии плазмообменом и иммуносупрессии или склонны к частым рецидивам. В связи с этим крайне актуален поиск препаратов, применение которых позволило бы вывести пациента с ТТП в состояние устойчивой ремиссии. В качестве одного из таких препаратов может выступать бортезомиб, который продемонстрировал свою высокую эффективность в терапии различных аутоиммунных заболеваний. В работе, выполненной совместно с врачами из Национального медицинского исследовательского центра детской онкологии, гематологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева описано два случая его успешного применения при лечении приобретенной ТТП у детей.

5.2 Материалы и методы исследования

1. ЭК выделяли из пупочной вены (HUVEC) и культивировали в среде M199 с 20% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота и эндотелиальной ростовой добавки, полученной из мозга кролика [7]. Клетки идентифицировали по морфологическим критериям и по наличию фактора Виллебранда, ангиотензинпревращающего фермента, поверхностных белков CD31, CD54. В работе использовали клетки 2-4 пассажей.

2. Для прижизненного окрашивания ФВ на поверхности эндотелиальных клеток использовали аптамер ARC1779 (патент US20090203766A1), конъюгированный с флуоресцентным красителем Cy5. Для этого выращенные в 24-луночном планшете ЭК отмывали от среды роста физиологическим солевым раствором PSS, pH 7.4, содержавшим NaCl (145 мМ), KCl (5 мМ), HEPES (10 мМ), $MgCl_2$ (1 мМ), $CaCl_2$ (1 мМ), глюкозу (10 мМ). Клетки инкубировали в отсутствии или в присутствии активатора при 32-34°C в течение 20 мин. После этого внеклеточную жидкость отбирали и добавляли в лунки по 100 мкл раствора 250 н MARC1779-Cy5 в среде гибридизации, содержащей 0.1 мг/мл tRNA (RocheDiagnosticsGMBH #10109495001), 1 мг/мл бычий сывороточный альбумин (Amresco #0332), 5 мМ $MgCl_2$, 25 мМ глюкозы, 2.67 мМ KCl, 1.47 мМ KH_2PO_4, 136.9 мМ NaCl, 8.10 мМ Na_2HPO_4), инкубировали 20 мин при 32°C. Для окрашивания ядер в среду добавляли 1 мкг/мл Hoechst 33342 (ThermoFisherScientific, USA). По окончании инкубации клетки 2 раза промывали раствором PBS для удаления несвязавшегося ARC1779-Cy5. К клеткам добавляли 200 мкл FluoroBrite TMDMEM (Gibco, #A18967-01) и сразу после этого снимали изображение окрашенных клеток с помощью флуоресцентного микроскопа LeicaDMI 6000 с использованием объектива HCXPL FLUOTARL 20.0x0.40 DRY, диодных осветителей с длинами волн 385 и 620 нм и фильтров A4 и TX2.В качестве контроля использовали аналогичный по нуклеотидному составу олигонуклеотид со случайной последовательностью, также меченый Cy5.

3. Иммуноцитохимическое окрашивание антителами к фактору Виллебранда человека (Daco, Дания) проводили согласно ранее описанному протоколу [8].

4. Визуальный анализ и съёмку окрашенных клеток проводили с помощью флуоресцентного микроскопа LeicaDMI 6000 (Leica, Germany).

5. Интенсивность флуоресценции окрашенного ФВ на каждом из полученных в процессе съёмки кадров оценивали с помощью программы CellProfiler [8].

6. Активность определяли по гидролизу флуоресцентного субстрата металлопротеиназы ADAMTS-13 FRETS-VWF73 с помощью планшетного ридера.

5.3 Результаты и обсуждение

В 1990 году был впервые описан метод, который позволяет получать уникальные последовательности РНК или ДНК, способные с высокой афинностью и специфичностью связывать самый широкий спектр антигенов, начиная от ионов металов и заканчивая целыми клетками [5, 9]. Афинность и специфичность подобных олигонуклеотидовненижетаковых у антител. В отличие от антител, синтетические аптамеры легко воспроизводимы, более термостабильны, менее иммуногенны, а широкие

возможности для модификаций нуклеотидов позволяют создать аптамеры, обладающие устойчивостью к нуклеазам. Устойчивость к действию нуклеаз и низкая иммуногенность сделали аптамеры идеальным инструментом для проведения исследований *in vivo* и применения в фармакологии в качестве альтернативы гуманизированным антителам [5]. Одной из мешений для аптамеров, которые представляют особый интерес для фармокологов, является фактор Виллебранда. Данный фактор играет одну из ключевых ролей в системе гемостаза в нормальном состоянии и в развитии тромботических микроангиопатий при различных патологиях [1]. На сегодняшний день получено несколько аптамеров к ФВ [10-13]. Одним из первых аптамеров, специфично связывающим А1 домен ФВ, является ARC1779. И пока это единственный аптамер, который нашел своё применение в терапии, показав эффективность при лечении болезни Виллебранда типа 2В. Используя конъюгат ARC1779-Cy5, мы смогли продемонстрировать раскрытие отдельных секреторных гранул с ФВ на поверхности неактивированных и активированных гистамином эндотелиальных клеток (рисунок 5.1).

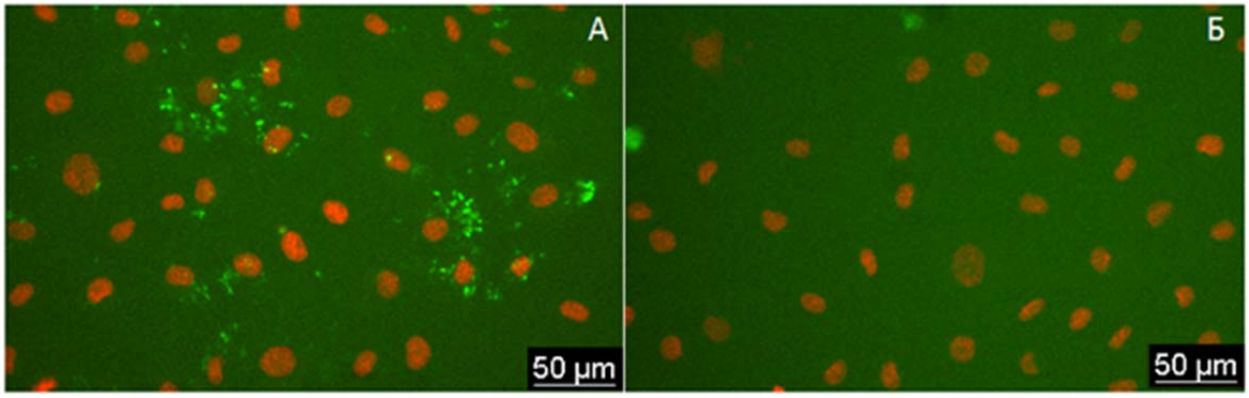

Рисунок 5.1 - Окрашивание аптамером ARC1779-Cy5 (А) и конъюгированным с флуоресцентной меткой Cy5 контрольным олигонуклеотидом (Б) эндотелиальных клеток, активированных гистамином (100 мкМ)
Концентрации ARC1779-Cy5 и контрольногоолигонуклеотида 50 нМ.

Окрашивание ФВ аптамером ARC1779-Cy5 становится заметным, начиная с концентрации 50 нМ (рисунок 5.2). При этом яркость флуоресценции возрастает с повышением концентрации до 1 мкМ. Контрольный олигонуклеотид в концентрациях до 100 нМ практически не окрашивает клетки, однако при дальнейшем повышении концентрации наблюдается небольшой рост флуоресценции, обусловленный неспецифическим связыванием (рисунок 5.1А). При этом было показано, что гистамин не влияет на неспецифическое связывание (рисунок 5.1Б). Таким образом было установлено, что оптимальная концентрация аптамера ARC1779-Cy5, необходимая для регистрации ФВ

на поверхности ЭК составляет 50 нМ, т.к. в данной концентрации аптамер демонстрирует низкое неспецифическое связывание.

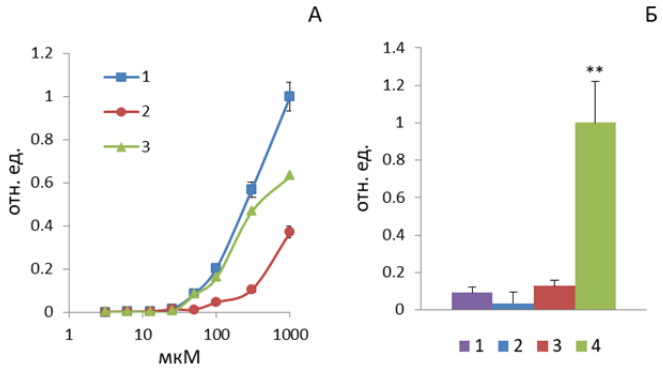

Рисунок 5.2 – Окрашивание ФВ аптамером ARC1779-Cy5
А - зависимости яркости флуоресценции ЭК от концентрации ARC1779-Cy5 (кривая 1) или конъюгата контрольного олигонуклеотида с Cy5 (кривая 2). Кривая 3 представляет собой разность между значениями на кривой 1 (общее связывание) и кривой 2 (неспецифическое связывание) и отражает взаимодействие ARC1779-Cy5 с ФВ.
Б - яркость флуоресценции ЭК, окрашенных ARC1779-Cy5 (3,4) или контрольным олигонуклеотидом (1,2) в концентрациях 50 нМ, в отсутствие (1,3) или в присутствии 100 мкМ гистамина (2,4) **p<0.01 достоверность отличия (4) от (1,2,3).

В процессе написания обзора был проведён анализ большого массива литературных данных, и дана подробная характеристика всем известным на текущий момент маркёрам эндотелиальных клеток сосудов [14]. Составлен подробный список маркёров, которые играют основополагающую роль в развитии эндотелия, обеспечении его функционирования в нормальном состоянии и при развитии различных патологических процессов. Описана роль фактора Виллебранда не только в системе гемостаза, но и в регуляции ангиогенеза. Рассмотрено участие сигнальных путей ACE2/Ang(1–7)/Mas, АПФ/AngII/AT(1), VEGFR1-2, Angpt-Tieи их взаимодействия в регуляции ангиогенеза и физиологических функций эндотелиальных клеток. Охарактеризованы рецепторы семейства CAMи их участие в регуляции барьерной функции эндотелиальных клеток. Рассматривается возможность их использования в качестве маркёров повреждения эндотелия и потенциальных мишеней для терапии при таких заболеваниях, как болезни Альцгеймера, Паркинсона, рассеянный склероз, некоторые случаи бактериального менингита, травмы и ишемия, связанные с наличием опухоли. Описаны известные на текущий момент механизмы, активируемые при развитии воспалительного процесса в эндотелии сосудов.

В обзоре выделены главные маркеры эндотелиальных клеток, не зависящие от его функционального состояния, и маркеры, характеризующие физиологические и патофизиологические процессы. В общей сложности дано описание около 60 маркеров.

Особый интерес представляет описание белков, которые играют роль «рецепторов» коронавирусаSARS-CoV-2. Это ангиотензипревращающий фермент 2 (АПФ2) и белок базигин(CD147).

Было описано два успешных случая применения бортезомиба для лечения приобретенной ТТП у детей 5 и 12 лет [15]. В первом случае в больницу поступила девочка 12 лет с чрезмерная петехиальной сыпью, желтухой, тошнотой и артралгией. Общий анализ крови показал тромбоцитопению (11×10^9 / л), низкий гемоглобин (Hb; 9,8 г / дл), ретикулоциты (16,9%) и лейкоциты ($5{,}9 \times 10^9$ / л). Общий уровень билирубина составил 48 мкмоль/л, лактатдегидрогеназа (ЛДГ) - 514 Ед / л, шистоциты - 16%, ретикулоциты были 51%, а проба Кумбса была отрицательной. Диагностическое обследование на СКВ было отрицательным. Активность ADAMTS13 составила менее 5%. Во втором случае девочка 5 лет поступила после с рецидивом после короткосрочной ремиссии (9 месяцев). Анализы показали тромбоцитопению (19×10^9 / л), анемию (4,9 г / дл) и ретикулоцитоз (4,1%). ЛДГ была 1183 Ед / л, активность ADAMTS13 составляла 0%, а активность анти-ADAMTS13 антител составляла > 4,5 единиц Bethesda. В обоих случаях применение плазмообмена в комплексе с терапией метилпреднизолоном и ретуксимабом не позволило добиться устойчивой ремиссии. После получение письменного согласия был назначен бортезомиб. Лечение бортезомибом позволило добиться устойчивой ремиссии, которая в первом случае уже составило 5 лет, во втором - 12 месяцев.

5.4 Заключение

В результате проведенных в 2020 году исследований нами разработан метод анализа фактора Виллебранда с помощью флуоресцентномеченого аптамера, который позволяет не только проводить исследования на живых клетках, но и обеспечивает существенно более высокую точность и специфичность в сравнении с классическими методами иммуноцитофлуоресценции. Нами проведены совместные клинические исследования с врачами из Национального медицинского исследовательского центра детской онкологии, гематологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, результатом которых стало разработка нового метода лечения детей, страдающих аутоиммунной формой тромботической тромбоцитопенической пурпуры – болезни, при которой повышено содержание фактора Виллебранда в плазме крови. На двух клинических случаях показано, что ингибирование активности протеасом бортезомибом вызывает устойчивую ремиссию у детей, резистентных к другим способам лечения.

5.5 Список использованных источников

1. Sadler J. E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor // Annu Rev Biochem.- 1998. - Vol. 67. - P. 395-424. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.395.

2. Vischer U. M., Jornot L., Wollheim C. B., Theler J. M. Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of von Willebrand factor from cultured human vascular endothelial cells // Blood. - 1995. - Vol. 85. - P. 3164-3172. DOI: 10.1182/blood.V85.11.3164.bloodjournal85113164

3. Hattori R., Hamilton K. K., Fugate R. D., McEver R. P., Sims P. J. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140 // J Biol Chem. - 1989. - Vol. 264. - P. 7768-7771. https://www.jbc.org/content/264/14/7768.long

4. Esposito B., Gambara G., Lewis A. M., Palombi F., D'Alessio A., Taylor L. X., Genazzani A. A., Ziparo E., Galione A., Churchill G. C., Filippini, A. NAADP links histamine H1 receptors to secretion of von Willebrand factor in human endothelial cells // Blood. - 2011. - Vol. 117. - P. 4968-4977. doi: blood-2010-02-266338 [pii] 10.1182/blood-2010-02-266338.

5. Wang J., Li G. Aptamers against cell surface receptors: selection, modification and application // Curr Med Chem. - 2011. - Vol. 18. - P. 4107-4116. doi: 10.2174/092986711797189628.

6. Scully M. Rituximab in the treatment of TTP// Hematology. - 2012. - Vol. 17(Suppl 1) - P. S22-S24 https://doi.org/10.1179/102453312X13336169155178

7. Goncharov N. V., Sakharov I., Danilov S. M., Sakandelidze O. G. Use of collagenase from the hepatopancreas of the Kamchatka crab for isolating and culturing endothelial cells of the large vessels in man // Biulleten' eksperimental'noibiologiiimeditsiny. - 1987. - Vol. 104. - P. 376–378.

8. Авдонин П.В., Цитрина А.А., Миронова Г.Ю., Авдонин П.П., Жарких И.Л., Надеев А.Д., Гончаров Н.В. Пероксид водорода стимулирует экзоцитоз фактора Виллебранда эндотелиальными клетками пупочной вены человека // Известия РАН. Сер.биол. - 2017. - №5. - С. 549-556. DOI: 10.7868/S0002332917050101

9. Ellington A. D., Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands // Nature. - 1990. - Vol. 346. - P. 818-822. doi: 10.1038/346818a0.

10. Sakai K., Someya T., Harada K., Yagi H., Matsui T., Matsumoto M. Novel aptamer to von Willebrand factor A1 domain (TAGX-0004) shows total inhibition of thrombus formation superior to ARC1779 and comparable to caplacizumab // Haematologica. - 2019. - Vol.105(11). - P. 2631-2638. doi: 10.3324/haematol.2019.235549.

11. Matsunaga K. I., Kimoto M., Hirao I. High-Affinity DNA Aptamer Generation Targeting von Willebrand Factor A1-Domain by Genetic Alphabet Expansion for Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment Using Two Types of Libraries Composed of Five Different Bases // J Am Chem Soc. - 2017. - Vol.139. - P. 324-334. doi: 10.1021/jacs.6b10767.

12. Kovacevic K. D., Buchtele N., Schoergenhofer C., Derhaschnig U., Gelbenegger G., Brostjan C., Zhu S., Gilbert J. C., Jilma B. The aptamer BT200 effectively inhibits von Willebrand factor (VWF) dependent platelet function after stimulated VWF release by desmopressin or endotoxin // Scientific reports. - 2020. - Vol. 10. - 11180, doi: 10.1038/s41598-020-68125-9.

13. Nimjee S. M., Dornbos D. 3rd, Pitoc G. A., Wheeler D. G., Layzer J. M., Venetos N., Huttinger A., Talentino S. E., Musgrave N. J., Moody H., Rempel R. E., Jones C., Carlisle K., Wilson J., Bratton C., Joseph M. E., Khan S., Hoffman M. R., Sommerville L., Becker R. C., et al. Preclinical Development of a vWF Aptamer to Limit Thrombosis and Engender Arterial Recanalization of Occluded Vessels // Mol Ther. - 2019. - Vol. **27**. - P. 1228-1241. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.03.016.

14. Goncharov N.V., Popova P.I., Avdonin P.P., Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K., Korf E.A., Avdonin P.V. Endothelial Markers in Health and Disease // Biologicheskie Membrany. - 2020.– Vol. 37. – Is. 2. – P. 3-21. DOI: 10.31857/S0233475519040054. – Q4.

15. Maschan A, Patrova U, Kalinina I, Kurnikova E, Fedorova D, Baidildina D, Kotskaya N, Avdonin P, Novichkova G. Bortezomib induces long term remission in children with immune thrombotic thrombocytopenic purpura, refractory to plasma exchange, glucocorticoids, and rituximab: a report on two cases // Pediatric Blood and Cancer. - 2020. - e28818. https://doi.org/10.1002/pbc.28818. - Q2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

1) Выявлено значительное увеличение экспрессии субъединицы LMP2 протеасом в спонтанно возникающих опухолях молочной железы инбредных мышей BLRB/BYRB по сравнению с молочными железами контрольных здоровых мышей. Этот результат совпадает с результатом, полученным для рака молочной железы человека в отсутствие эстрогеновых рецепторов при сравнении с условно нормальной прилежащей тканью, что указывает на перспективы применения субъединицы LMP2 в качестве новой мишени для терапии данного типа рака.

2) Показано, что IgG коррегирует репродуктивные расстройства, вызванные липополисахаридом в раннем онтогенезе. Эффект IgG может быть реализован через цАМФ сигналы и наиболее выражен через 40-60 мин после введения липополисахарида, когда синтез провоспалительных цитокинов еще не достиг своего пика. Полученные результаты могут послужить основой для разработки подходов к коррекции нарушений в развивающейся репродуктивной системе под действием неблагоприятных факторов уже в раннем развитии.

3) Разработана уникальная модель формирования популяционного иммунитета к новому коронавирусу SARS-CoV-2 на основании баз данных результатов RT-PCR диагностики и иммунологического тестирования населения в разных странах в различных экологических средах: полного популяционного тестирования, выборочного тестирования на улицах, в замкнутых и полузамкнутых помещениях, тестирования по половозрастным группам и по группам риска. Спрогнозирован 3-6%-ный уровень популяционного иммунитета для России. Введение «локдаунов» в некоторых странах в настоящее время идет вразрез с данными о поведении вируса.

4) С помощью генетических и биохимических методов, транскриптомного и протеомного анализа выявлены молекулярные механизмы устойчивости к гипоксии холодноводных морских губок *Halichondria panicea* и *Halisarca dujardinii* акватории Белого моря и установлено сходство и отличия факторов обмена железа с таковыми у других животных, в том числе млекопитающих. Получены рекомбинантные бакуловирусы для синтеза химерных белков, в которых фрагменты полиэдрина слиты в единой рамке

трансляции с флуоресцентным белком GFP, и начаты опыты по изучению механизма формирования полиэдров.

5) Получены экспериментальные и теоретические данные, подтверждающие координирующую роль нейроактивного состава межклеточной среды, обеспечивающей адаптацию к изменяющимся условиям окружающей среды. Показана активация ориентировочно-исследовательского поведения при усилении локомоторной нагрузки в условиях неопределенности у филогенетически удаленных видов беспозвоночных. Описаны некоторые нейрохимические и клеточные механизмы, лежащие в основе активирующих влияний усиленной локомоции животных.

6) Разработан метод оценки экспрессии ФВ в эндотелиальных клетках с помощью флуоресцентно меченого аптамера, что принципиально важно, поскольку нарушение обмена этого фактора вызывает развитие ТТП. Разработанный метод позволит успешно исследовать тонкости механизмов развития данного заболевания. В совместной работе с клиницистами из Национального исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Димы Рогачева впервые показано, что ингибитор протеасом бортезомиб оказывает эффективное терапевтическое действие при лечении аутоиммунной формы ТТП у детей.

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

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ

*отчетные публикации

Раздел 1 Подраздел 1.1

1. ***Астахова Т.М.**, Моисеева Е.В., **Шарова Н.П.** Особенности пула протеасом в спонтанно возникающих злокачественных опухолях молочной железы мышей//Онтогенез. - 2020. - Т. 51. - С. 379–385. DOI: 10.31857/S047514502005002X.

Английская версия: Astakhova T.M., Moiseeva E.V., **Sharova N.P.** Features of the Proteasome Pool in Spontaneously Occurring Malignant Tumors of the Mammary Gland in Mice//Russ. J. Dev. Biol. - 2020. - Vol. 51. - P. 317–322. DOI: 10.1134/S1062360420050021. - Q4.

2. *Kondakova I.V., Shashova E.E., Sidenko E.A., **Astakhova T.M., Zakharova L.A., Sharova N.P.** Estrogen receptors and ubiquitin proteasome system: mutual regulation//Biomolecules. - 2020. - Vol. 10. - pii: E500. DOI: 10.3390/biom10040500. - Q2.

Раздел 1 Подраздел 1.2

3. ***Izvolskaia M., Sharova V., Zakharova L**. Perinatal inflammation reprograms neuroendocrine, immune, and reproductive functions: Profile of cytokine biomarkers//Inflammation. - 2020. - Vol. 43. - P. 1175–1183. - Q3.

4. **Лифанцева Н.В.**, **Конеева Ц.О.**, **Воронова С.Н**., Луценко Г.В., **Захарова Л.А., Мельникова В.И.** Экспрессия и роль серотонинового рецептора 1а типа в эмбриональном тимусе крыс//Онтогенез. – 2020. - Т. 51. - №5. - С. 338–350.

Английская версия: Lifantseva N.V., Koneeva Ts.O., Voronova S.N., Lutsenko G.V., **Zakharova L.A., Melnikova V.I.** Expression and Role of Serotonin Receptor 1a in the Rat Embryonic Thymus//Russ. J. Dev. Biol. - 2020. - Vol. 51. - No. 5. – P. 283–293.

Раздел 2

5. ***Sharov K.S.** Creating and applying SIR modified compartmental model for calculation of COVID-19 lockdown efficiency//Chaos Solitons & Fractals. Nonlinear Science, and Nonequilibrium and Complex Phenomena. – 2020. – Vol. 141. – 110295. DOI: 10.1016/j.chaos.2020.110295. - Q1.

6. ***Sharov K.S.** Trends in adaptation of fifteen European countries population to SARS-CoV-2 in March–May 2020: Can Taiwanese experience be adopted? // Journal of the Formosan Medical Association. – 2020. – 31 July. – DOI: 10.1016/j.jfma.2020.07.038. - Q2.

Раздел 3

7. ***Finoshin A.D., Adameyko K.I.**, Mikhailov K.V., **Kravchuk O.I.**, Georgiev A.A., **Gornostaev N.G.**, Kosevich I.A., **Mikhailov V.S.**, Gazizova G.R., Shagimardanova E.I., Gusev

O.A., **Lyupina Y.V.** Iron metabolic pathways in the processes of sponge plasticity//Plos One. – 2020. – Vol. 15. – Is. 2. - P. e0228722. DOI: 10.1371/journal.pone.0228722. – Q2.

8. ***Адамейко К.И., Кравчук О.И., Финошин А.Д.**, Бончук А.Н., Георгиев А.А., **Михайлов В.С., Горностаев Н.Г.**, Михайлов К.В., Бачева А.В., Индейкина М.И., Бугрова А.Е., Газизова Г.Р., Козлова О.С., Гусев О.А., Шагимарданова Е.И., **Люпина Ю.В.** Структура нейроглобина холодноводной губки *Halisarca dujardinii*//Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54. – № 3. – С. 474-479. DOI: 10.31857/S0026898420030039.

Английская версия: Adameyko K.I., Kravchuk O.I., Finoshin A.D., (...), **Mikhailov V.S., Gornostaev N.G.,** (…), Shagimardanova E.I., **Lyupina Y.V.** Structure of Neuroglobin from Cold-Water Sponge *Halisarca dujardinii*//Molecular Biology. – 2020. – Vol. 54(3). – P. 416-420. DOI: 10.1134/S0026893320030036. – Q4.

Раздел 4

9. *Aonuma H., **Mezheritskiy M**., Boldyshev B., Totani Y., **Vorontsov D., Zakharov I**., Ito E., **Dyakonova V**. The Role of Serotonin in the Influence of Intense Locomotion on the Behavior Under Uncertainty in the Mollusk Lymnaea stagnalis//Front Physiol. . – 2020 . – Vol. 11. DOI: 10.3389/fphys.2020.00221. eCollection 2020.

10. ***Mezheritskiy M., Vorontsov D**., Lapshin D., **Dyakonova V**. Previous flight facilitates partner finding in female crickets//Sci. Rep. - 2020. - Vol. 10. 22328. https://doi.org/10.1038/s41598-020-78969-w.

11. *Totani Y., Nakai J., **Dyakonova V.E.**, Lukowiak K., Sakakibara M., Ito E. Induction of LTM following an Insulin Injection//eNeuro. – 2020. – Vol. 7. – Is. 2. DOI: 10.1523/ENEURO.0088-20.2020.

12. Nakai J., Totani Y., Hatakeyama D., **Dyakonova V.E**., Ito E. Another example of conditioned taste aversion: Case of snails//Biology. – 2020. – Vol. 9. – Is. 12. Art.no 422. P. 1-14. DOI: 10.3390/biology9120422.

13. *Bazenkov N., Boldyshev B., **Dyakonova V.**, Kuznetsov O. Simulating Small Neural Circuits with a Discrete Computational Model // Biol Cybern. - 2020. - Jun;114(3):349-362. doi: 10.1007/s00422-020-00826-w. Epub 2020 Mar 13.

14. **Korshunova T**., Martynov A. Consolidated data on the phylogeny and evolution of the family Tritoniidae (Gastropoda: Nudibranchia) contribute to genera reassessment and clarify the taxonomic status of the neuroscience models Tritonia and Tochuina// PLoS ONE. -2020. – V. 15(11): e0242103. P. 1-47.

15. ***Korshunova T**., Fletcher K., Picton B., Lundin K., Kashio S., Sanamyan N., Sanamyan K., Padula V., Schrodl M., Martynov A. The Emperor's Cadlina, hidden diversity and gill cavity evolution: new insights for the taxonomy and phylogeny of Dorid nudibranchs

(Mollusca: Gastropoda)//Zoological Journal of the Linnean Society. – 2020. – V. 189. P. 762-827. DOI: https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlz126

16. **Korshunova T**., Bakken T., Grøtan V.V., Johnson K.B.; Lundin K., Martynov A. A synoptic review of the family Dendronotidae (Mollusca: Nudibranchia): a multilevel organismal diversity approach//Contributions to Zoology. – 2020. – P. 1-61. https://doi.org/10.1163/18759866-bja10014, Q1-Q2

17. Martynov A., Fletcher K., **Korshunova T**. A 50-year conundrum is conclusively solved: Nudibranchs Dendronotus albus (= D. diversicolor) and Dendronotus robilliardi are valid species with compelling evidence from type materials, bibliographic sources, and molecular data//Canadian Journal of Zoology. – 2020. – Vol. 98. – Is. 9. – P. 623-632. DOI: 10.1139/cjz-2019-0261.

18. Мартынов А.В., **Коршунова Т.А.** Голожаберные моллюски (моллюски отрядов Doridida и Nudibranchia)//Флора и фауна острова Матуа (средние Курильские острова) : атлас-определитель. Том 1. Море / под ред. К.Э. Санамян, Н.П. Санамян. Череповец : ООО «Интрон», 2020. С. 172–195.

Раздел 5

19. *Goncharov N.V., Popova P.I., **Avdonin P.P.**, Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K., Korf E.A., **Avdonin P.V.** Endothelial Markers in Health and Disease//Biologicheskie Membrany. - 2020.– Vol. 37. – Is. 2. – P. 3-21. DOI: 10.31857/S0233475519040054. – Q4.

20. *Maschan A., Patrova U., Kalinina I., Kurnikova E., Fedorova D., Baidildina D., Kotskaya N., **Avdonin P**., Novichkova G. Bortezomib induces long term remission in children with immune thrombotic thrombocytopenic purpura, refractory to plasma exchange,glucocorticoids, and rituximab: a report on two cases//Pediatric Blood and Cancer. - 2020. - e28818. DOI: 10.1002/pbc.28818. - Q2.

Отчет утвержден на заседании Ученого совета, протокол № 10 от 29 декабря 2020 г.