

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 0088-2021-0008

Рег. № НИОКТР АААА-А21-121011490129-5

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

А.В. Васильев

«28» декабря 2021 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

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

(промежуточный)

Руководитель НИР,
заместитель директора по научной
работе, доктор биологических наук


28.12.2021
подпись, дата

Н.П. Шарова

Москва 2021

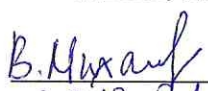
СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

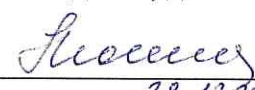
Руководитель, заместитель директора по научной работе, доктор биологических наук  28.12.21 Н.П. Шарова (раздел 1)
подпись, дата

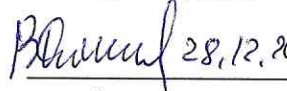
Руководитель, заведующий лабораторией, доктор биологических наук  28.12.21 И.С. Захаров (раздел 4)
подпись, дата

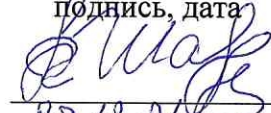
Исполнители:  28.12.21 Л.А. Захарова (раздел 1)
Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор
подпись, дата

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук  28.12.21 Т.М. Астахова (раздел 1)
подпись, дата

Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор  28.12.21 В.С. Михайлов (раздел 3)
подпись, дата

Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук  28.12.21 Ю.В. Люпина (раздел 3)
подпись, дата

Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор РАН  28.12.21 В.Е. Дьяконова (раздел 4)
подпись, дата

Старший научный сотрудник, кандидат философских наук  28.12.21 К.С. Шаров (раздел 2)
подпись, дата

Заведующий лабораторией, доктор биологических наук, профессор  28.12.21 П.В. Авдонин (раздел 5)
подпись, дата

Нормоконтроль, руководитель информационно-аналитического отдела, кандидат биологических наук  28.12.21 Е.Б. Абрамова
подпись, дата

РЕФЕРАТ

Отчет 85 с., 1 кн., 5 разделов, 25 рис., 4 табл., 113 источников, 15 отчетных публикаций.

РАННИЙ ОНТОГЕНЕЗ, ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ ВЫБОР, РАЗВИТИЕ ОПУХОЛЕЙ, МОРСКИЕ ГУБКИ, МОЛЛЮСКИ, НАСЕКОМЫЕ, ГРЫЗУНЫ, ВИРУСЫ, ПРОТЕАСОМЫ, ФЕРРИТИНЫ, ДЕАЦЕТИЛАЗЫ ГИСТОНОВ, ФАКТОР ВИЛЛЕБРАНДА, НЕРВНАЯ И ИММУННАЯ СИСТЕМЫ.

Цель работы – исследование роли системного воспаления, иммуноглобулина G, отдельных форм протеасом, ферритинов, деацетилазы гистонов, фактора Виллебранда и других факторов в раннем онтогенезе и развитии различных адаптивных и патологических процессов у беспозвоночных и позвоночных (млекопитающих), поиск приложения результатов в медицинской практике.

Выявлено значительное увеличение экспрессии субъединицы LMP2 протеасом и ее активности в сочетании с регулятором PA28 $\alpha\beta$ в ректальной аденокарциноме пациентов, что совпадает с данными по приживающимся аллотрансплантатам. Результаты указывают на участие этой субъединицы в выживании чужеродных клеток, включая злокачественные, и открывают перспективы применения субъединицы LMP2 в качестве мишени для терапии данного типа рака.

Обнаружено негативное влияние системного воспаления на ранних стадиях беременности крысы на формирование афферентной иннервации ГРГ нейронов у половозрелых самцов-потомков крыс. Блокада рецептора к интерлейкину-6 или введение иммуноглобулина G в период развития воспаления приводит к восстановлению афферентной иннервации ГРГ нейронов у половозрелых самцов. Эти результаты могут быть полезными для своевременного выявления нарушений у потомства и их коррекции уже в раннем онтогенезе.

Транскриптомный анализ клеток губок в процессах диссоциации/реагрегации показал, что ферритины и деацетилазы гистонов участвуют в регуляции трансдифференцировки клеток в ходе морфогенетических процессов у губок. Исследование развития вирусной инфекции у насекомых выявило, что факторы контроля протеома, шапероны HSP/HSC70 и сегрегаза VCP/p97, необходимы для синтеза рекомбинантных белков на поздних стадиях инфекционного цикла бакуловирусов, но не влияют на формирование полиэдров.

Получены результаты, подтверждающие развиваемую коллективом оригинальную гипотезу о координирующей роли нейроактивного состава межклеточной среды, который социализирует индивидуальные нейроны и удерживает их в актуальном поведенческом

контексте.

Разработана модель передачи вируса SARS-CoV-2 через твердые поверхности и показано, что его адгезионная способность на бумаге выше в 2,5 раза, а время полужизни выше в 4 раза, чем у гриппа А (H1N1). Данное свойство необходимо учитывать при борьбе с распространением пандемии по миру.

Получены новые данные относительно характера обмена фактора Виллебранда (фВ) при отдельных видах тромботических микроангиопатий и при коронавирусной инфекции. Подъем уровня антигена фВ при тяжелой форме COVID-19 не обусловлен подавлением активности металлопротеазы ADAMTS-13, но связан с повышенной секрецией фВ эндотелием. Эндотелий может быть мишенью терапии при COVID-19 для предотвращения тромбоэмболических осложнений, особенно в мелких сосудах (артериолах и капиллярах).

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
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	25
РАЗДЕЛ 2 МОДЕЛИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСОВ И АДАПТАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПОПУЛЯЦИИ.....	37
РАЗДЕЛ 3 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ У БЕСПОЗВОНОЧНЫХ.....	45
РАЗДЕЛ 4 МЕХАНИЗМЫ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ВЫБОРА И РАЗВИТИЯ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ.....	60
РАЗДЕЛ 5 РЕЦЕПТОРЫ И СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ В КЛЕТКАХ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ.....	72
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	81
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ.....	83

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

ГРГ – гонадотропин-рилизинг гормон;

ИЛ-6 – интерлейкин 6;

ЛДГ – лактатдегидрогеназа;

ЛПС – липополисахарид;

ПАФ – параформальдегид;

ПНД – постнатальный день;

ТМА – тромботические микроангиопатии;

ТТП – тромботическая тромбоцитопеническая пурпура;

ФВ – Фактор Виллебранда;

ФСБ – фосфатно-солевой буфер;

ФСБТ – ФСБ, содержащий 0,3% тритон X-100;

ЭД – эмбриональный день;

ChTL – химотрипсинподобный;

CL – каспазаподобный;

GFP - зеленый флуоресцентный белок;

HDACs - гистоновые деацетилазы;

IgG – иммуноглобулин класса G;

ЮО – джонстонов орган;

mAb – моноклональные антитела;

MHC – major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости;

ODV - Occlusion Derived Virions;

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

ВВЕДЕНИЕ

Значительный научный интерес представляет исследование роли системного воспаления, иммуноглобулина G (IgG), отдельных форм протеасом и других 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 ректальной аденокарциномы пациентов. Выполнение работ по Подразделу 1.1 может выявить новые мишени для терапии ректального рака и внести вклад в понимание вопроса о размерах фрагментов кишечника, хирургически удаляемых вместе с опухолью. Этот вопрос крайне важен для сохранения сфинктера.

В рамках Подраздела 1.2 поставлена задача изучения отдаленных последствий влияния системного воспаления, вызванного у беременной крысы бактериальным липополисахаридом (ЛПС), на формирование афферентной иннервации гонадотропин-рилизинг гормон (ГРГ)-нейронов самцов-потомков крысы. Еще одна задача состояла в исследовании возможного противовоспалительного действия IgG на этот процесс на ранних сроках беременности. Результаты данной работы могут быть полезными для разработки рекомендаций по коррекции у потомства нарушений, вызванных воспалением у матери во время беременности.

Раздел 2 посвящен разработке модели распространения вируса SARS-CoV-2 через твердые поверхности. Будет проведен сравнительный анализ распространения этого вируса и вируса гриппа А (H1N1). Ожидаемые результаты важны для принятия решений при борьбе с пандемией SARS-CoV-2 по всему миру.

Раздел 3 касается исследования функций ферритинов и гистоновых деацетилаз (HDACs) в процессах морфогенеза у эволюционно древних животных, к которым относятся губки. Кроме того, будут изучены шапероны HSP/HSC70 и сегрегаза VCP/p9, в клетках чешуекрылого насекомого *Spodoptera frugiperda* в условиях бакуловирусной инфекции, а именно, поздних стадий инфекции, приводящих к формированию белковых тел включения правильной формы (полиэдров) и второго типа зрелых вирусов ODV (Occlusion Derived Virions), которые обеспечивают сохранение вируса в окружающей среде и инфицирование популяций насекомых.

Исследования по Разделу 4 направлены на решение фундаментальной проблемы клеточных и молекулярных механизмов формирования поведенческих программ в онтогенезе и адаптивной перестройки таких программ у зрелых организмов. Одним из

важных аспектов данного экспериментального подхода является сравнительное исследование нейрохимической организации поведения. Выполнение задач 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. Интерес к фактору Виллебранда обусловлен его участием в патогенезе многих сердечно-сосудистых, аутоиммунных и других заболеваний. В настоящее время исследования в этой области приобрели особую актуальность, поскольку нарушения обмена фВ представляют собой одну из главных причин осложнений при коронавирусной инфекции.

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

Изучение молекулярных механизмов развития опухолей до сих пор остается одной из наиболее актуальных задач. Особое место среди онкологических заболеваний занимает рак прямой кишки в связи с необходимостью хирургического удаления фрагментов кишечника с обеих сторон от опухоли. Наиболее проблематичен вопрос определения длины удаляемого фрагмента в дистальной части, близкой к сфинктеру. Решение этой проблемы тесно связано с выявлением областей кишечника, где отсутствуют изменения в функционировании молекул, характерные для опухоли. В связи с этим мы сделали акцент на протеасомах, во многом определяющих судьбу опухоли [1-4]. Протеасомы контролируют протеом клетки и регулируют различные клеточные процессы путем деградации белков и образования биологически активных полипептидов и пептидов.

Множественные функции протеасом обусловлены множественностью их форм, которые различаются структурой и специфичностью гидролиза белковых субстратов. В соответствии с набором протеолитических субъединиц пул протеасом в клетках млекопитающих может быть разделен на конститутивные протеасомы (или протеасомы домашнего хозяйства) и подтипы иммунных протеасом. Конститутивные протеасомы содержат протеолитические субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ в каждом из двух внутренних колец их четырехкольцевой структуры. Эти субъединицы проявляют каспазаподобную (CL), трипсинподобную и химотрипсинподобную (ChTL) активность соответственно. Иммунные протеасомы встраивают иммунные протеолитические субъединицы – LMP2 ($\beta 1i$), MECL1 ($\beta 2i$), и LMP7 ($\beta 5i$) вместо конститутивных субъединиц $\beta 1$, $\beta 2$, и $\beta 5$ соответственно в процессе сборки новых протеасом. В иммунных протеасомах модифицируется конформация карманов, связывающих субстрат, таким образом, что изменяются предпочтения в отношении сайтов расщепления и, следовательно, изменяется структура производимых пептидов [5]. В результате этого иммунные протеасомы проявляют высокую трипсинподобную и ChTL-активность и низкую CL-активность и продуцируют в несколько раз больше эпитопов для молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I по сравнению с конститутивными. Следовательно,

иммунные протеасомы являются важными участниками иммунного ответа на нескольких стадиях. Интересно, что иммунные субъединицы могут быть встроены в протеасомы либо вместе, либо в различных комбинациях с конститутивными субъединицами.

Кроме того, структуры протеасом различаются активаторами (19S, PA28 β/γ , PA200), которые открывают вход в протеолитическую камеру для определенных субстратов [6]. Как правило, активатор 19S распознает убиквитинированные полноразмерные белковые субстраты, в то время как другие активаторы пропускают в протеасому полипептиды среднего размера без предварительного убиквитинирования. Поврежденные/окисленные белки могут утилизироваться 20S-коровой протеасомой [7].

В ряде работ исследована экспрессия PSMB8 (гена субъединицы LMP7) [8], активатора PA28 γ [9], субъединицы Rpt4 регулятора 19S [10] и отмечено возможное клиническое значение этих компонентов протеасомной системы у пациентов с раком кишечника. Ранее мы обнаружили повышенную активность ChTL, а также увеличенное содержание субъединиц LMP7 и LMP2 в раке прямой кишки и снижение этих показателей после неoadъювантной химиолучевой терапии почти до их уровня в контрольной ткани у большинства пациентов [11]. Мы предположили возможность использования этих показателей протеасомного пула для прогнозирования эффективности неoadъювантной химиолучевой терапии у больных раком прямой кишки.

В то же время необходимо более детальное описание пула протеасом рака прямой кишки и различных отделов кишечника для лучшего понимания механизмов развития этого заболевания и для соответствующих клинических выводов. Цель настоящего исследования – изучение функционирования протеасом в аденокарциноме прямой кишки пациентов и различных фрагментах кишечника, локализованных проксимально и дистально от опухоли.

1.1.2 Материалы и методы

Образцы тканей пациентов. В исследование вошла рандомизированная выборка нелеченых пациентов г. Москвы с верифицированной аденокарциномой прямой кишки, удаленной хирургическим путем в Российском национальном исследовательском медицинском университете им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации с февраля 2015 года по октябрь 2019 года. Средний возраст пациентов (54 % женщин и 46 % мужчин) составил 68 лет (от 51 до 82 лет). Стадии заболевания были определены как I, IIА–IIС and IIIА–IIС (T_{2-4b}N_{0-2b}M₀).

Анонимность была достигнута путем шифрования имен пациентов буквенными символами и обозначением образцов ткани опухоли и кишечника числами. Расшифровка проводилась после проведения экспериментальных процедур.

В результате были исследованы 54 образца опухоли, а также 54 образца прилегающей ткани (на расстоянии до 0,7 см от опухоли). Кроме того, исследованы 54 образца дистального фрагмента кишечника с локализацией 2 см от опухоли, 54 образца дистального фрагмента с локализацией 4 см от опухоли, 54 образца проксимального фрагмента с локализацией 8 см от опухоли, 48 образцов проксимального фрагмента с локализацией 15 см от опухоли и 43 образца проксимального фрагмента с локализацией 20 см от опухоли. Образцы тканей хранились при температуре -80°C в течение месяца. Для нативного электрофореза использовались незамороженные ткани.

Было получено информированное письменное согласие каждого пациента после полного разъяснения цели и характера всех процедур исследования. Все исследования были одобрены Комиссией по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Антитела и основные реагенты. Комбинированные моноклональные антитела (mAb) мыши к субъединицам $\alpha 1,2,3,5,6\&7$ протеасом (BML-PW8195), mAb мыши к субъединице Rpt6 19S-активатора (BML-PW9265), к субъединице $\beta 1i$ (LMP2) протеасом (BML-PW8840), к субъединице $\beta 5i$ (LMP7) протеасом (BML-PW8845), поликлональные антитела кролика к субъединице α PA28 $\alpha\beta$ -активатора (BML-PW8185), к субъединице γ PA28 γ -активатора (BML-PW8190) куплены у Enzo Life Sciences, New York, NY, USA; mAb мыши к β -актину (ab8226), mAb кролика to MHC класса I + HLA B (ab110645) куплены у Abcam, Cambridge, UK.

Субстрат ChTL-активности, N-succinyl-leu-leu-val-tyr-7-amido-4-methyl coumarin (Suc-LLVY-AMC) (S6510), субстрат CL-активности, Z-Leu-Leu-Glu-7-amido-4-methyl coumarin (Z-LLE-AMC) (C0483), ингибитор протеасом, Z-leucyl-leucyl-leucinal (MG132) (C2211), куплены у Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; субстрат активности субъединицы $\beta 1i$ (LMP2), Ac-Pro-Ala-Leu-AMC (Ac-PAL-AMC) (S-310) и субстрат активности субъединицы $\beta 5i$ (LMP7), Ac-Ala-Asn-Trp-AMC (Ac-ANW-AMC) (S-320), куплены у Boston Biochem, Cambridge, MA, USA.

Получение осветленных гомогенатов тканей. Для исследования активностей протеасом *in vitro* и Вестерн-блоттинга осветленные гомогенаты опухоли и фрагментов кишечника (ткань, очищенная от мышечного слоя) получали в шести объемах (w/v) буфера, содержащего 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM

дитиотреитол, 10% глицерин, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ АТР, 10 мМ Na₂S₂O₅, лейпептин (0.5 мкг/мл), пепстатин (1 мкг/мл) и апротинин (1 мкг/мл), как описано ранее [12].

Для нативного электрофореза осветленные гомогенаты тканей получали в трех объемах (w/v) буфера, содержащего 50 мМ Na-HEPES, pH 7.5, 200 мМ NaCl, and 10 мМ EDTA.

Определение активности протеасом in vitro и в неденатурирующем геле. ChTL- и CL-активность протеасом определяли по гидролизу флуорогенных субстратов Suc-LLVY-AMC и Z-LLE-AMC соответственно. Активность LMP7- и LMP2-субъединиц определяли по гидролизу флуорогенных субстратов Ac-ANW-AMC и Ac-PAL-AMC соответственно. Указанные типы активности протеасом определяли *in vitro* и в неденатурирующем геле с применением подходов, детально описанных Ероховым П.А. с соавторами [13].

Вестерн-блоттинг. После электрофореза в 13% полиакриламидном геле (10 мкл очинного гомогената или 90-105 мкг белка на дорожку) полипептиды переносили на нитроцеллюзную мембрану стандартной процедурой. Иммунодетекцию проводили с помощью первых антител к α1,2,3,5,6,7, LMP7, LMP2, МНС класса I, β-актину (1 : 1000), Rpt6, PA28α, PA28γ (1 : 1500) и соответствующих вторых антител, конъюгированных с пероксидазой (1 : 2000). Имиджи анализировали с помощью стандартной программы ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Статистика. Статистическую обработку проводили с помощью ANOVA, post-hoc тестов (Fisher, Bonferroni, Newman-Keuls), корреляционного анализа, используя пакет Statistica 10. (StatSoft Inc., 2010, <https://www.tibco.com>).

1.1.3 Результаты и обсуждение

Активность протеасом в аденокарциноме прямой кишки и различных локализациях кишечника in vitro. Мы исследовали аденокарциному прямой кишки пациентов, прилегающую ткань, дистальные фрагменты кишечника, локализованные в 2 см и 4 см от опухоли, и проксимальные фрагменты, локализованные в 8 см от опухоли (54 образца каждый), 15 см (48 образцов) и 20 см (43 образца) от опухоли. Стадии заболевания пациентов (54 % женщин и 46 % мужчин) были определены как I, IIА–IIС and IIIА–IIIС (T_{2-4b}N_{0-2b}M₀).

ChTL- и CL-активность протеасом, подверженная воздействиям и отражающая комплексное влияние различных факторов, включая наличие того или иного активатора в структуре протеасом, комбинацию протеолитических субъединиц протеасом, стрессовые условия, клеточный статус и т. д., является важным показателем состояния протеасомной системы. Поэтому мы сосредоточили внимание на исследовании этих типов активности.

Кроме того, мы изучили активность иммунных субъединиц LMP7 и LMP2, которые вносят вклад в общую ChTL- и CL-активность соответственно и отражают функциональное состояние иммунных протеасом. Для проведения статистического анализа мы обозначили изучаемую активность протеасом в различных локализациях кишечника в цифровых кодах (таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Условные обозначения факторов “Активность протеасом в различных локализациях кишечника”

Факторы	Обозначение
Активность в опухоли	(1)
Активность в прилежащей ткани	(2)
Активность в дистальной части, в 4 см от опухоли	(3)
Активность в дистальной части, в 2 см от опухоли	(4)
Активность в проксимальной части, в 8 см от опухоли	(5)
Активность в проксимальной части, в 15 см от опухоли	(6)
Активность в проксимальной части, в 20 см от опухоли	(7)

Нормальность распределения четырех типов активности протеасом в опухоли и шести локализациях кишечника в выборке мужчин и женщин с тремя стадиями заболевания была проанализирована с помощью тестов Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors и Shapiro-Wilk. Большинство распределений сохраняли симметрию, указывающую на стабильность при оценке с помощью дисперсионного анализа. В целом, данные соответствовали многофакторному нормальному распределению. Таким образом, полученные данные могли быть проанализированы стандартными методами параметрической статистики. Статистические показатели зависимости активности протеасом от расположения в кишечнике приведены в таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Зависимость активности протеасом от локализации в кишечнике

Активность	Статистические показатели		
	df	Fst	p
ChTL	6	276.9	< 0.0001
CL	6	414.2	< 0.0001
LMP7	6	77.1	< 0.0001
LMP2	6	58.9	< 0.0001

Все типы исследованной активности были выше в опухоли и прилежащей ткани в сравнении с другими локализациями в кишечнике (рисунок 1.1). Части кишечника по

уменьшению в них активности протеасом можно расположить в ряд:
опухоль→прилежащая ткань→проксимальный и дистальный фрагменты.

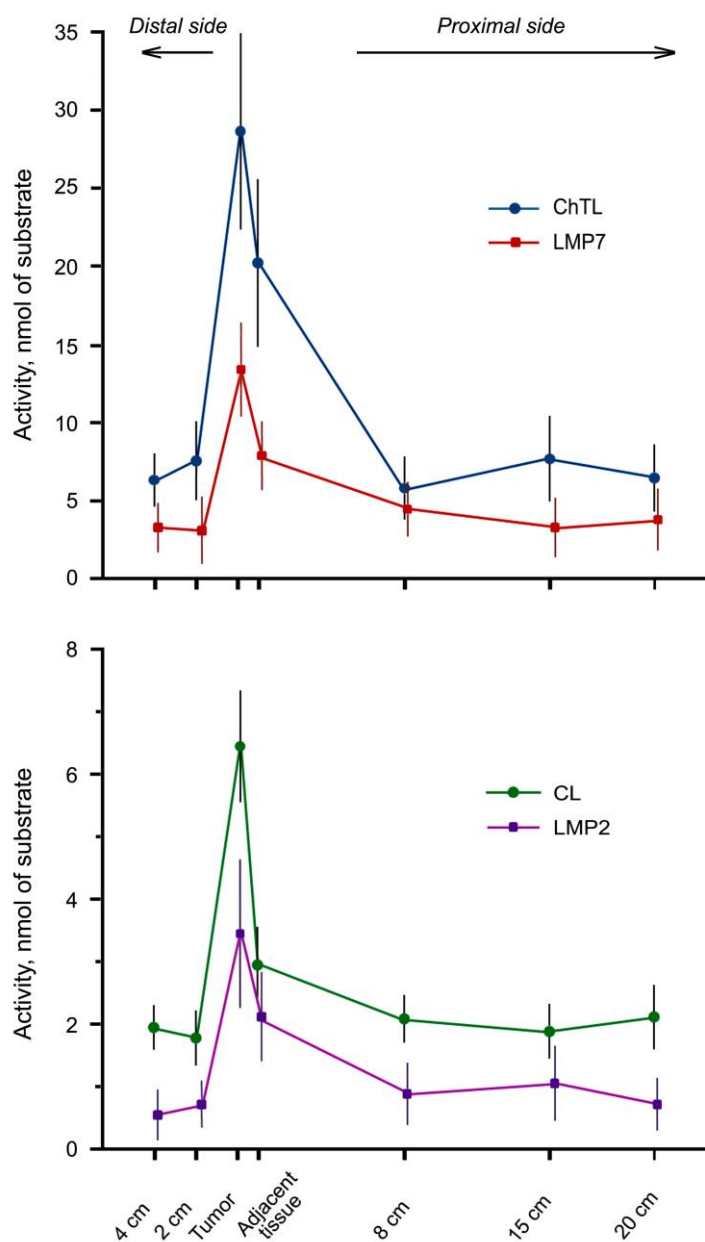


Рисунок 1.1 – Разные типы активности протеасом в ректальной аденокарциноме и различных частях кишечника пациентов [13]

Активность выражена в нмоль субстрата, гидролизованного 100 мкл осветленного гомогената за 20 мин. Указано стандартное отклонение. Активность в опухоли и прилежащей ткани достоверно отличается от активности в других локализациях кишечника при $p < 0.001$.

Интересно, что в проксимальной и дистальной частях кишечника форма графика ChTL-активности похожа на форму графика активности LMP2, в то время как форма графика CL-активности аналогична форме графика активности LMP7 (рисунок 1.1). На первый взгляд, эти результаты противоречивы, поскольку субъединица LMP2, наряду с

субъединицей $\beta 1$, проявляет CL-активность, а субъединица LMP7, наряду с субъединицей $\beta 5$, проявляет ChTL-активность. Это кажущееся противоречие может быть объяснено, если субъединицы LMP2 и LMP7 в большинстве своем встроены в различные структуры протеасом, содержащие комбинации LMP2– $\beta 5$ и LMP7– $\beta 1$. В то же время меньшая часть протеасом может включать комбинацию LMP2–LMP7.

Хотя каждая исследованная активность заметно не различалась в дистальном и проксимальном отделах кишечника (рисунок 1.1), для более точного анализа мы использовали тесты на однородность (таблицы 1.3 и 1.4).

Таблица 1.3 - Гомогенность ChTL- и CL-активности в разных частях кишечника

Гомогенные группы ChTL-активности							Гомогенные группы CL-активности								
Fisher LSD-тест				Bonferroni-тест			Fisher LSD-тест				Bonferroni-тест				
1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	4	5	1	2	3	4
(5)	****			****			(4)	****				****			
(3)	****	****		****			(3)	****	****			****	****		
(7)	****	****		****			(6)	****	****	****		****	****		
(4)	****			****			(5)		****	****		****	****		
(6)	****			****			(7)			****			****		
(2)		****			****		(2)				****			****	
(1)			****			****	(1)				****				****

Здесь и в таблице 1.4: *****, гомогенная группа

Таблица 1.4 - Гомогенность LMP7- и LMP2-активности в разных частях кишечника

Гомогенные группы LMP7-активности							Гомогенные группы LMP2-активности						
Fisher LSD-тест				Bonferroni-тест			Fisher LSD-тест				Bonferroni-тест		
1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3
(4)	****			****			(3)	****			****		
(6)	****			****			(7)	****	****		****		
(3)	****	****		****			(4)	****	****		****		
(7)	****	****		****			(5)	****	****		****		
(5)		****		****			(6)		****		****		
(2)		****			****		(2)			****		****	
(1)			****			****	(1)			****			****

С помощью тестов Fisher LSD и Bonferroni все типы изученных активностей в опухоли и прилегающей ткани занимали независимые кластеры. Для ChTL-, LMP7- и LMP2-активности тест Bonferroni объединил оставшиеся значения в общий кластер, в то время как тест LSD разделил их на два перекрывающихся кластера. В то же время оба теста разделили активность CL в дистальном и проксимальном отделах кишечника на два/три перекрывающихся кластера (таблица 1.3). В целом, эти тесты показали, что, несмотря на принадлежность к перекрывающимся кластерам, активность в отдельных дистальных отделах кишечника ниже, чем активность в большинстве проксимальных

отделов. Полученные результаты указывают скорее на различный клеточный состав дистального и проксимального отделов кишечника, чем на наличие патологии. Так, некоторые фрагменты кишечника могут содержать клетки иммунной системы. Таким образом, дистальная область кишечника даже в 2-4 см от опухоли, скорее всего, нормальна по активности протеасом. Этот факт наряду с другими данными, которые еще предстоит собрать, может быть важен для хирургии.

Был проведен дисперсионный анализ для всего множества зависимых факторов (активность протеасом и локализация) с учетом возможного влияния группирующих факторов (пол и стадия заболевания). В целом, факторы пола и стадии заболевания не влияли на активность протеасом.

Таким образом, различные статистические тесты показали, что значительные изменения всех типов изученных активностей протеасом кишечника пациентов касаются ткани опухоли и прилегающей ткани.

Экспрессия компонентов пула протеасом и молекул МНС класса I в опухоли прямой кишки и различных локализациях кишечника. Обусловлено ли резкое увеличение активности протеасом в опухоли измененным составом протеолитических субъединиц протеасом и/или присутствием специфического активатора? Чтобы это выяснить, мы изучили содержание субъединиц протеасом и активаторов на уровне белка методом Вестерн-блоттинга (рисунок 1.2).

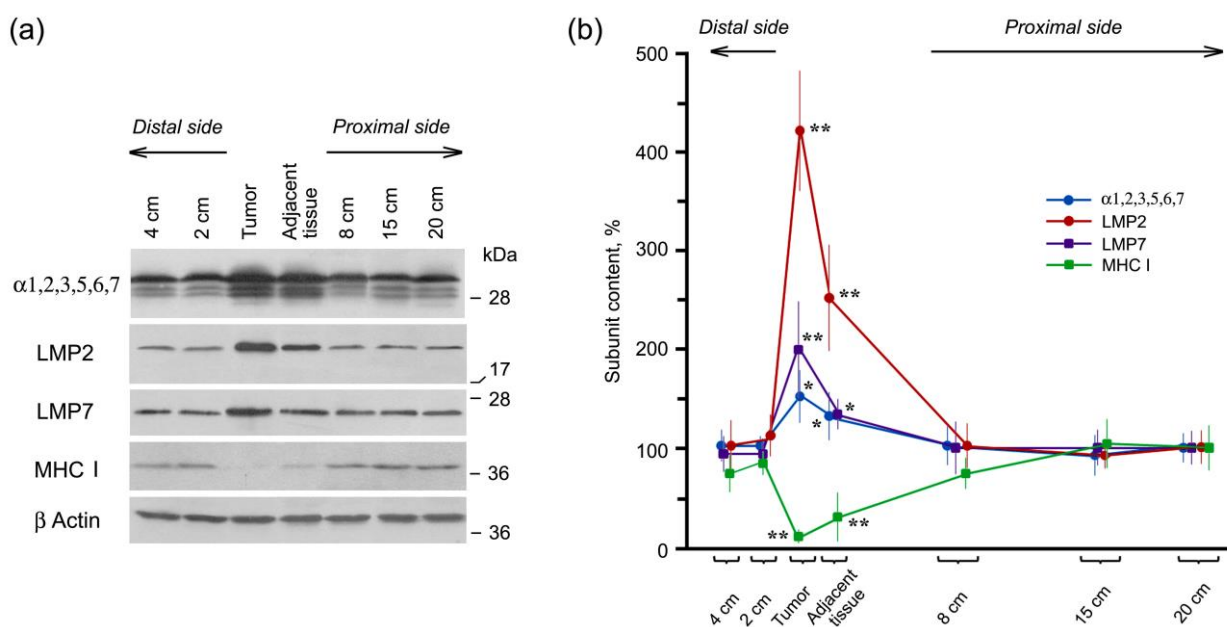


Рисунок 1.2 – Содержание субъединиц протеасом и молекул МНС класса I в ректальной аденокарциноме и различных частях кишечника пациентов [13].

(a) Вестерн-блоты полипептидов осветленных гомогенатов с использованием соответствующих антител. Указана молекулярная масса белков-маркеров. (b) Относительное содержание полипептидов, нормализованное на уровень β -актина, в

процентах от содержания в наиболее удаленном образце (20см от опухоли). Указано стандартное отклонение. Содержание всех полипептидов в опухоли и прилегающей ткани достоверно отличается от других локализаций при $p < 0.05$ (*) и $p < 0.001$ (**).

Аналогично активности протеасом экспрессия иммунных субъединиц LMP2 и LMP7, а также субъединиц $\alpha 1,2,3,5,6,7$ (маркер общего пула протеасом) была выше в опухоли и прилегающей ткани по сравнению с дистальными и проксимальными фрагментами кишечника. Отметим, что экспрессия LMP2 увеличилась в 4 раза, в то время как экспрессия LMP7 увеличилась только в 2 раза в опухоли по сравнению с контролем. Скорее всего, это различие является результатом встраивания субъединицы LMP2 в большое количество вновь образующихся структур протеасом без участия субъединицы LMP7. Высокие уровни иммунных протеасом необходимы для образования чужеродных антигенных эпитопов, включая эпитопы рака, и последующего развития иммунного ответа. Однако клетки рака прямой кишки, экспрессирующие высокие уровни иммунных протеасом, избегают иммунного надзора. Вполне возможно, что раковым клеткам не хватает других компонентов для развития иммунной реакции. Мы проверили наличие молекул МНС класса I в опухоли. Комплекс молекул МНС класса I и эпитопа антигена служит маркером на поверхности клетки для распознавания Т-киллерами. Мы обнаружили, что содержание молекул МНС класса I резко снижено в ткани опухоли прямой кишки и прилегающей ткани по сравнению с другими исследованными участками кишечника (рисунок 1.2). Скорее всего, несмотря на повышенный уровень иммунных протеасом, клетки рака прямой кишки избегают иммунного надзора из-за низкого содержания молекул МНС класса I. Очевидно, раковые клетки адаптировали иммунные протеасомы к своим собственным потребностям.

Экспрессию активаторов 19S, PA28 $\alpha\beta$ и PA28 γ исследовали с использованием антител соответственно к субъединицам Rpt6, PA28 α and PA28 γ . В опухоли была увеличена экспрессия активаторов 19S и PA28 $\alpha\beta$, но не PA28 γ (рисунок 1.3). Причина повышенного количества активатора 19S понятна, поскольку он участвует в поддержании усиленного белкового метаболизма в активно делящихся злокачественных клетках. Так например, обнаружены увеличенные убиквитинирование и деградация белка p53 в клетках колоректального рака [14]. Но как можно объяснить роль активатора PA28 $\alpha\beta$, экспрессия которого также увеличена в ректальной аденокарциноме? Недавно мы показали, что высокие уровни PA28 $\alpha\beta$ и субъединицы LMP2 (но не LMP7) в клетках аллогraftа связаны с его приживлением независимо от донор-реципиентных различий [15]. Мы полагаем, что LMP2-субъединица и PA28 $\alpha\beta$ -активатор, встроенные в одни и те

же протеасомные структуры, вовлечены в обеспечение выживаемости клеток ректального рака, чужеродных для организма.

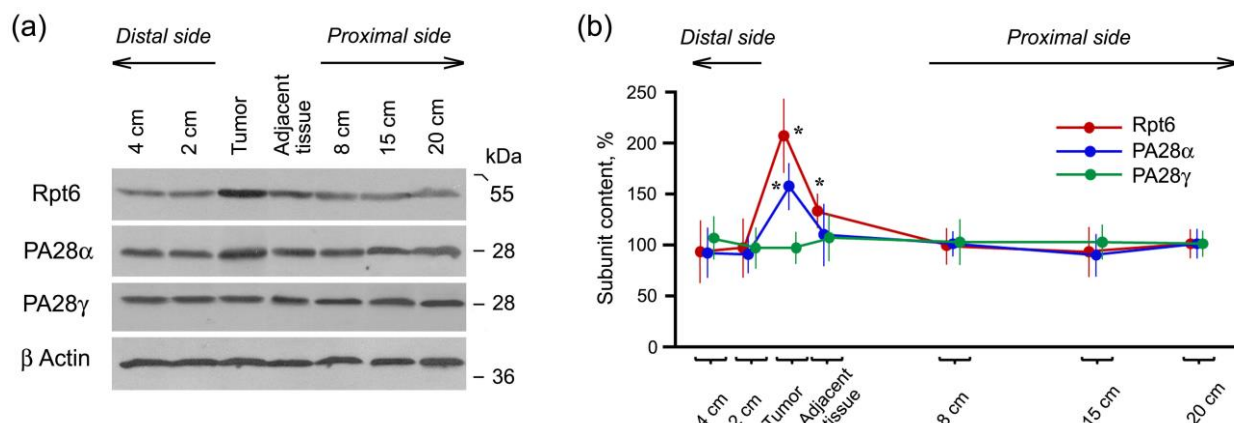


Рисунок 1.3 – Содержание субъединиц активаторов протеасом в ректальной аденокарциноме и различных частях кишечника пациентов [13].

(a) Вестерн-блоты субъединиц осветленных гомогенатов с использованием соответствующих антител. Указана молекулярная масса белков-маркеров. (b) Относительное содержание субъединиц, нормализованное на уровень β -актина, в процентах от содержания в наиболее удаленном образце (20 см от опухоли). Указано стандартное отклонение. Достоверное отличие от дистальных и проксимальных локализаций при $p < 0.01$ (*).

Таким образом, повышенная активность протеасом в ректальной аденокарциноме связана с увеличенной экспрессией протеолитических иммунных субъединиц LMP2 и LMP7 и активаторов 19S и PA28 $\alpha\beta$.

Активности протеасом в неденатурирующем геле. Для того чтобы проверить, принадлежат ли LMP2-субъединица и PA28 $\alpha\beta$ -активатор одним и тем же структурам протеасом, был использован оригинальный метод нативного электрофореза, разработанный нами для грубых фракций протеасом (рисунок 1.4) [16]. Этот метод полезен для «картирования» активности различных форм протеасом. CL-активность, проявляемая субъединицами β 1 и LMP2, и LMP2-активность детектированы в четырех зонах геля, I–IV (рисунок 1.4 а, с). Зоны I и II содержат протеасомы с 19S-активатором, зона III – протеасомы с PA28 $\alpha\beta$ -активатором, 20S коровая структура без какого-либо активатора локализована в зоне IV [16]. ChTL-активность, связанная с субъединицами β 5 и LMP7, и LMP7-активность также обнаружены в зонах I–IV (рисунок 1.5 а, с). Активные зоны протеасом в неденатурирующем геле имеют вид относительно широких пятен, но не узких полос, поскольку каждая из них охватывает разнообразные субтипы протеасом, которые различаются, по крайней мере, комбинацией протеолитических субъединиц.

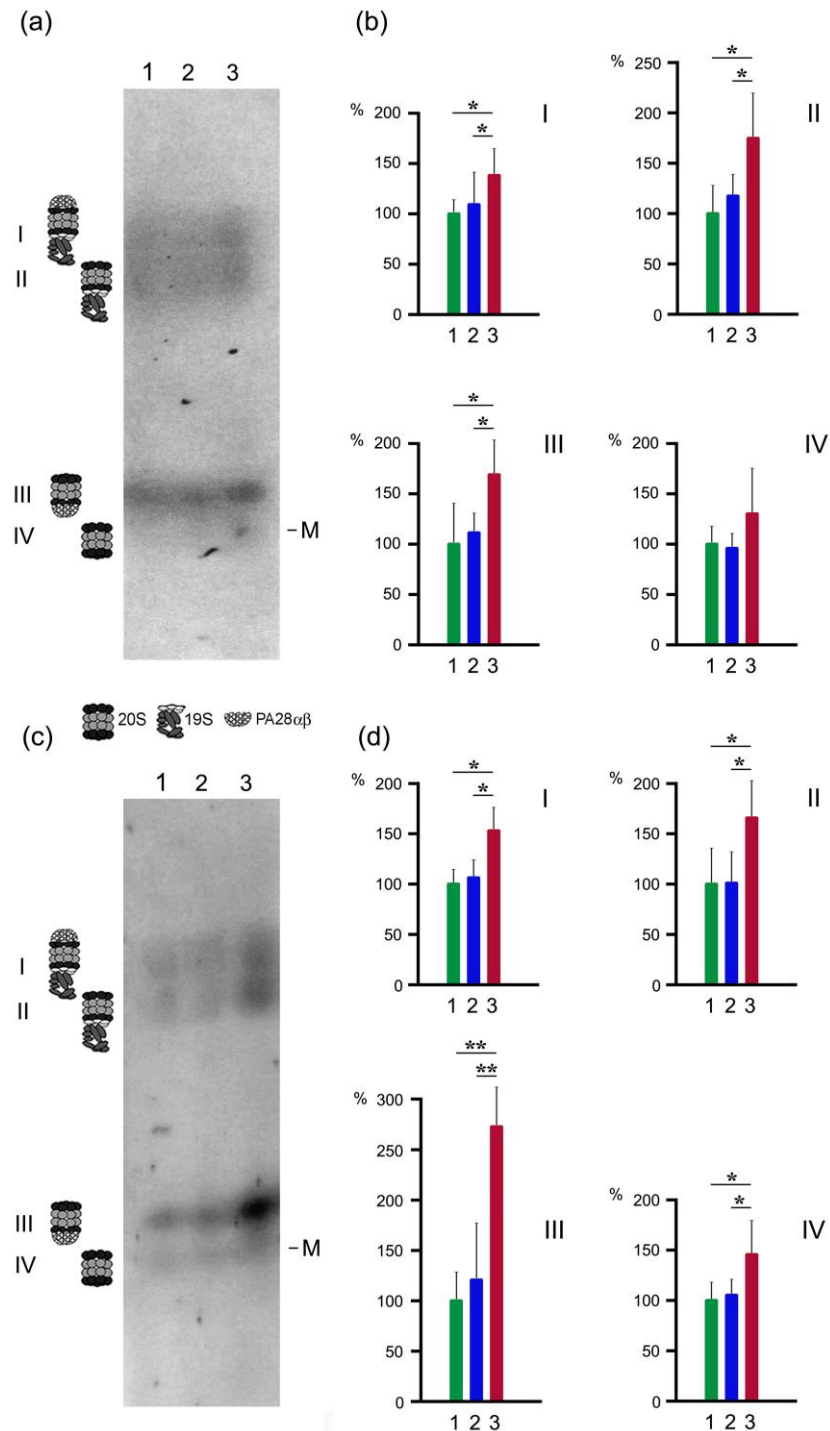


Рисунок 1.4 – CL- и LMP2-активность различных структур протеасом в ректальной аденокарциноме и контрольных фрагментах кишечника пациентов [13].

(a) CL-активность в неденатурирующем геле. (b) CL-активность в каждой зоне геля. (c) LMP2-активность в неденатурирующем геле. (d) LMP2-активность в каждой зоне геля. Тироглобулин (670 кДа), меченный красителем Cy-3.5, использован как маркер (M) молекулярной массы. Активность протеасом в дистальной части кишечника в 2 см от опухоли (взятая за 100%) (1) и проксимальной части в 15 см от опухоли (2) и в опухоли (3). Показано стандартное отклонение, $p < 0.05$ (*), $p < 0.005$ (**).

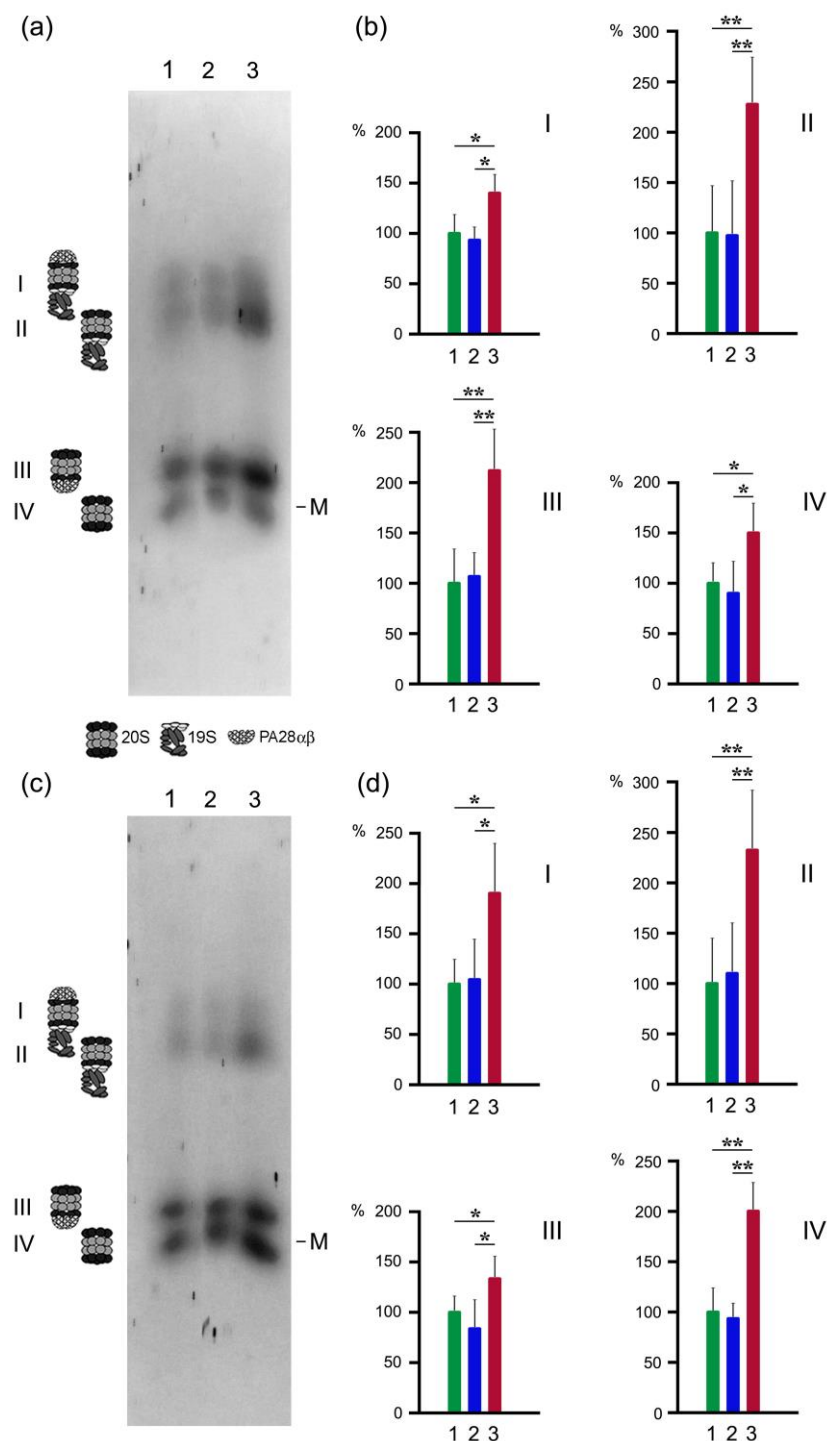


Рисунок 1.5 – ChTL- и LMP7-активность различных структур протеасом в ректальной аденокарциноме и контрольных фрагментах кишечника пациентов [13].
(a) ChTL-активность в неденатурирующем геле. **(b)** ChTL-активность в каждой зоне геля. **(c)** LMP7-активность в неденатурирующем геле. **(d)** LMP7-активность в каждой зоне геля. Тироглобулин (670 кДа), меченный красителем Cy-3.5, использован как маркер (M) молекулярной массы. Активность протеасом в дистальной части кишечника в 2 см от опухоли (взятая за 100%) (1) и проксимальной части в 15 см от опухоли (2) и в опухоли (3). Показано стандартное отклонение, $p < 0.05$ (*), $p < 0.005$ (**).

Вся исследованная активность была выше в опухоли, чем в контрольных образцах кишечника. Отметим, что наиболее существенное повышение связано с LMP2-активностью (на 175%) в структурах, содержащих PA28 $\alpha\beta$ -активатор (зона III геля) (рисунок 1.4). В этой зоне существенно повышена и ChTL-активность (на 115%) (рисунок 1.5), в то время как CL- и LMP7-активность была выше только на 65% и 35% соответственно (рисунки 1.4 a,b и 1.5 c,d). Эти факты вместе с описанными выше результатами указывают на то, что среди протеасом, вновь сформированных в опухоли, субтип, содержащий протеолитическую иммунную субъединицу LMP2, протеолитическую конститутивную субъединицу $\beta 5$ (проявляющую ChTL-активность) и активатор PA28 $\alpha\beta$, доминантен. Минорная часть PA28 $\alpha\beta$ -содержащих протеасом может включать LMP7–LMP2 и/или LMP7– $\beta 1$ комбинации.

Таким образом, в данной работе выявлено, что в ткани кишечника и ректальной аденокарциноме пациентов иммунная субъединица LMP2, так же как и иммунная субъединица LMP7, активна во всех выявленных структурах протеасом – структурах, связанных с активатором 19S, структурах, содержащих активатор PA28 $\alpha\beta$, и коровых 20S-структурах. Среди всего этого множества наиболее значительная наработка новых структур в опухоли связана с включением в них субъединицы LMP2 и активатора PA28 $\alpha\beta$.

При сравнении полученных результатов с опубликованными ранее работами выявляется чрезвычайно интересный факт резкого повышения экспрессии субъединицы LMP2 не только в аденокарциноме прямой кишки пациентов [13], но и в папиллярной карциноме щитовидной железы [2] и раке молочной железы пациентов в отсутствие эстрогеновых рецепторов [4], гепатоклеточной карциноме [12] и раке молочной железы мышей [17]. Это свидетельствует об универсальной роли протеасом с субъединицей LMP2 в развитии опухолей, связанной с обеспечением выживаемости чужеродных клеток [15]. Мы предлагаем гипотезу, согласно которой субтип иммунных протеасом с комбинацией LMP2– $\beta 5$ –PA28 $\alpha\beta$ продуцирует пептиды, высвобождаемые в межклеточное пространство для подавления активности клеток иммунной системы.

Таким образом, субъединица LMP2 сама по себе или совместно с активатором PA28 $\alpha\beta$ может быть перспективной мишенью для противоопухолевой терапии. Вместе с тем, следует помнить о необходимости адресной доставки анти-LMP2 лекарств к опухолевым клеткам, так как субъединица LMP2 участвует во многих процессах, включая адаптивные реакции в головном мозге.

Вторая важная находка данной работы, связанная с практическим применением – отсутствие характерных для опухоли изменений протеасомного пула в дистальной части кишечника даже на расстоянии 2 см и 4 см от опухоли. Этот результат может «выступать» в поддержку идеи сохранения сфинктера при хирургическом вмешательстве.

1.1.4 Заключение

В настоящей работе впервые детально описаны изменения протеасомного пула в аденокарциноме прямой кишки пациентов в сравнении с условно нормальной тканью кишечника. Основные результаты суммированы на схеме (рисунок 1.6).

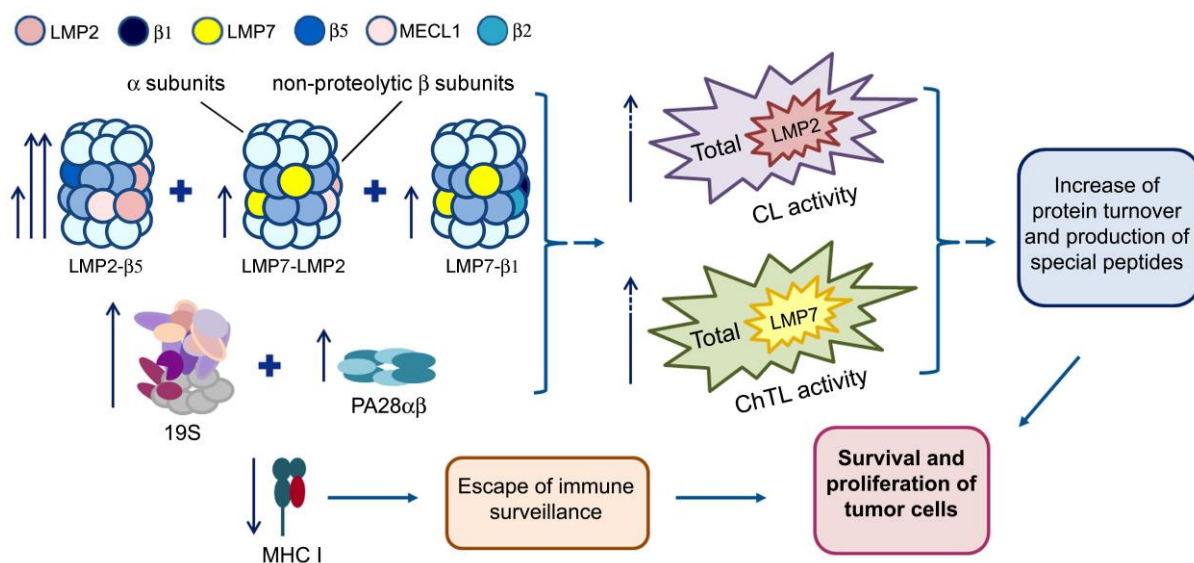


Рисунок 1.6 – Схема изменений протеасомного пула и содержания молекул МНС класса I в ректальной аденокарциноме по сравнению с условно нормальной тканью кишечника пациентов [13]

Обнаружены следующие изменения в опухоли: (1) образование новых структур протеасом с субъединицей LMP2 в количестве, трехкратно превышающем начальный уровень; (2) образование новых структур протеасом с субъединицей LMP7 приблизительно в равных количествах по сравнению с начальным уровнем; (3) экспрессия дополнительного количества активаторов 19S и PA28 $\alpha\beta$; (4) увеличение тотального пула протеасом; (5) возрастание CL-, ChTL-, LMP2- и LMP7-активности; (6) уменьшение содержания молекул МНС класса I. Эти события приводят к интенсивному белковому обмену, продукции специфических пептидов и выживанию и пролиферации опухолевых клеток. Полученные результаты могут быть полезны для лучшего понимания протеасомных механизмов развития ректального рака. В то же время требуются дальнейшие исследования в данной области. Какие пептиды образуются субтипом

протеасом с комбинацией LMP2- β 5-PA28 $\alpha\beta$, и как они участвуют в подавлении иммунного ответа? Еще предстоит получить ответы на эти вопросы.

Настоящее исследование имеет и практическую значимость. Во-первых, полученные результаты указывают на перспективность использования субтипа LMP2-PA28 $\alpha\beta$ в качестве мишени для противоопухолевой терапии при условии разработки способов адресной доставки анти-LMP2-PA28 $\alpha\beta$ лекарств к опухолевым клеткам. Во-вторых, полученные результаты свидетельствуют, что дистальная часть кишечника, близкая к сфинктеру, даже в 2-4 см от опухоли не проявляет особенностей протеасомного пула, характерных для опухоли. Эти результаты могут быть очень важными для сохранения сфинктера при хирургическом вмешательстве.

1.1.5 Список использованных источников

1 Deng S., Zhou H., Xiong R., Lu Y., Yan D., Xing T., Dong L., Tang E., Yang H. Over-expression of genes and proteins of ubiquitin specific peptidases (USPs) and proteasome subunits (PSs) in breast cancer tissue observed by the methods of RFDD-PCR and proteomics//Breast Cancer Res. Treat. - 2007. - Vol. 104. - P. 21–30.

2 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.

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

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

5 Unno M., Mizushima T., Morimoto Yu., Tomisugi Yo., Tanaka K., Yasuoka N., Tsukihara T. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution//Structure. – 2002. - Vol. 10. - P. 609–618.

6 Tanaka K. The proteasome: Overview of structure and functions//Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci. - 2009. - Vol. 85. - P. 12–36.

7 Raynes R., Pomatto L.C., Davies K.J. Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways//Mol. Aspects Med. - 2016. - Vol. 50. - P. 41–55.

8 Ha Y.J., Tak K.H., Kim C.W., Roh S.A., Choi E.K., Cho D.H., Kim J.H., Kim S.K., Kim S.Y., Kim Y.S., Kim J.C. PSMB8 as a candidate marker of responsiveness to preoperative radiation therapy in rectal cancer patients//Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. - 2017. - Vol. 98. - P. 1164–1173.

9 Chen D., Yang X., Huang L., Chi P. The expression and clinical significance of PA28 γ in colorectal cancer//J. Investig. Med. - 2013. - Vol. 61. - P. 1192–1196.

10 Boland K., Flanagan L., McCawley N., Pabari R., Kay E.W., McNamara D.A., Murray F., Byrne A.T., Ramtoola Z., Concannon C.G., Prehn, J.H. Targeting the 19S proteasomal subunit, Rpt4, for the treatment of colon cancer//Eur. J. Pharmacol. - 2016. - Vol. 780. - P. 53–64.

11 Astakhova T.M., Ivanova E.V., Rodoman G.V., Sumedi I.R., Afanas'ev S.G., Goncharov A.L., Kondakova I.V., Sharova N.P. Effect of neoadjuvant chemoradiation therapy on proteasome pool in rectal cancer//Bull. Exp. Biol. Med. - 2017. - Vol. 164. - P. 191–194.

12 Astakhova T.M., Delone G.V., Lupina Y.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. 102–108.

13 Erokhov P.A., Kulikov A.M., Karpova Y.D., Rodoman G.V., Sumedi I.R., Goncharov A.L., Razbirin D.V., Gorelova V.S., Sharova N.P., and Astakhova T.M. Proteasomes in Patient Rectal Cancer and Different Intestine Locations: Where Does Proteasome Pool Change?//Cancers. - 2021. - Vol. 13. - P. 1108.

14 Wang S., Wang T., Wang L., Zhong L., Li K. Overexpression of RNF126 promotes the development of colorectal cancer via enhancing p53 ubiquitination and degradation//Onco Targets Ther. – 2020. - Vol. 13. - P. 10917–10929.

15 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.

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

17 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.

Подраздел 1.2 Механизмы взаиморегуляции развития нейроэндокринной и иммунной систем

1.2.1 Введение

Регуляция становления различных функций в развивающемся организме осуществляется единой сложной суперсистемой, включающей нейроэндокринную, иммунную и репродуктивную системы. Репродуктивная способность потомства млекопитающих зависит от своевременного развития нейронов, синтезирующих гонадотропин релизинг-гормон (ГРГ). Отличительной особенностью ГРГ нейронов является их внемозговое происхождение из обонятельного эпителия обонятельных плакод назальной области головы с 11-13-го дней эмбрионального развития у мышей и крыс и последующей их миграцией в мозг. От обонятельных плакод они мигрируют через решетчатую пластинку решетчатой кости черепа в гипоталамус промежуточного мозга вдоль прорастающих к переднему мозгу обонятельных, вомероназальных и терминальных нервов [18]. При этом регуляция миграции ГРГ нейронов на разных этапах осуществляется разными механизмами [19]. У взрослых крыс ГРГ нейроны расположены в септо-преоптической области переднего гипоталамуса, не образуя чётко локализованных ядер. Их волокна проецируются в срединное возвышение промежуточного мозга, где образуют аксо-вазальные контакты с капиллярами портальной системы кровотока, связывающей гипоталамус с гипофизом. Волокна нейронов с определённой частотой выделяют ГРГ в портальную систему, создавая в ней концентрацию, необходимую для начала секреции гонадотропинов гипофизом, стимулирующих, в свою очередь, секрецию половых стероидов гонадами и гаметогенез в яйчниках и семенниках [20]. В регуляции функционирования ГРГ нейронов у половозрелых животных участвует большое количество афферентных синаптических контактов, образуемых аксонами нейронов, действующих через множественные нейротрансмиттерные системы мозга [21, 22].

Нарушения развития ГРГ системы приводят к нарушениям полового созревания и бесплодию. Однако причины их возникновения до сих пор до конца не определены. Примером нарушения миграции ГРГ нейронов у плода человека, обусловленного X-связанной генетической мутацией гена *KAL1*, является такая патология, как синдром Кальмана, характеризующийся недостаточной секрецией ГРГ и гипогонадизмом [23]. Несмотря на то, что доля определенных генетических причин недоразвития репродуктивной системы растёт, существенное влияние на развитие ГРГ системы могут оказывать неблагоприятные факторы, действующие на развивающийся организм в раннем

онтогенезе [22, 24]. Одним из факторов риска является бактериальная инфекция, индуцирующая воспаление, как в организме матери, так и плода [19, 22]. Активация иммунной системы матери бактериями или их мембранным компонентом липополисахаридом (ЛПС) в критические периоды онтогенеза запускает каскад синтеза различных провоспалительных цитокинов. Их повышенное содержание вызывает нарушения развития гипоталамо-гипофизарно-репродуктивной оси у плода, а в дальнейшем и репродуктивных функций у половозрелого потомства [25, 26].

Ранее нами было показано, что после введения ЛПС (*E. coli*) мышам на 12-й день эмбрионального развития (ЭД12) наблюдается повышение содержания интерлейкина (ИЛ) 6, лейкоemia-ингибирующего фактора и моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 в организме матери и плодов [26]. Повышенное содержание провоспалительных цитокинов сопровождалось подавлением миграции ГРГ нейронов в мозг плодов, а в половозрелом возрасте наблюдалось нарушение структуры гонад, снижение содержания циркулирующих гонадотропинов и половых стероидов. Мы предположили, что появление ГРГ нейронов в переднем мозге с опозданием вызывает нарушения в формировании их афферентной иннервации, что и приводит к нарушениям в ключевых точках развития гипоталамо-гипофизарно-репродуктивной оси.

Воспалительные процессы, индуцированные воздействием инфекционных факторов на организм матери в период беременности, могут приводить не только к нарушениям развития различных структур мозга, но и к невынашиванию плода [27]. Одним из наиболее специфичных защитных механизмов является нейтрализация бактериальной инфекции иммуноглобулином (IgG). IgG - единственный класс антител, которые проникают через плаценту, обеспечивая противoinфекционную защиту плода (IgG1 и IgG2 подклассы), а также оказывая долгосрочное иммунорегуляторное действие [28]. Недавно нами была продемонстрирована коррекция репродуктивных нарушений IgG у самцов мышей, индуцированных ЛПС на ранних сроках беременности [29].

Целью данной работы было исследовать отдаленные последствия влияния системного воспаления, вызванного ЛПС, и противовоспалительного действия IgG на ранних сроках беременности на формирование афферентной иннервации ГРГ нейронов самцов крыс.

1.2.2 Материалы и методы

Животные. Исследования проводили на самках крыс Wistar (питомник «Столбовая» РАН) массой 200–250 г с датированной беременностью (день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке считали первым днём беременности – ЭД1) и

полученном от этих самок половозрелом потомстве (самцах). Количество синаптических контактов на ГРГ нейронах у самок может изменяться в зависимости от фазы эстрального цикла [21], в то время как у самцов сохраняется их относительно постоянное количество. День их рождения считали первым днем постнатального развития – (ПНД1). Животных содержали в стандартных условиях и свободном доступе к пище и воде.

Оценка иннервации ГРГ нейронов у половозрелых самцов-потомков. Беременным самкам (n=3 в каждой группе) на ЭД12 вводили внутривентально 0.5 мл 0.9% раствора NaCl (контроль), либо на ЭД12 или ЭД18 вводили ЛПС *E.coli* (Sigma, США) 50 мкг/кг в 0.5 мл 0.9% раствора NaCl. Через 40 минут после введения ЛПС (когда секреция провоспалительных цитокинов еще не достигла своего пика) вводили внутривенно IgG крысы (Sigma, США, 1 мг/кг), либо тоцилизумаб – гуманизированные моноклональные антитела (IgG1) к рецептору ИЛ-6 (2 мг/кг, Chugai Pharma Manufacturing Co, Япония). Используемые дозы препаратов были выбраны в соответствии с ранее полученными нами данными [26, 29]. У самцов-потомков (n=10 в каждой группе) на ПНД80 определяли количество синаптических афферентных терминалей, оканчивающихся на ГРГ нейронах переднего гипоталамуса и областях, прилегающих непосредственно к нейронам, при помощи двойного иммуногистохимического окрашивания на ГРГ и синапсин-1. Синапсин-1 - пресинаптический фосфопротеин, регулирующий процесс выделения нейромедиаторов в синапсах и поддерживающий структурную стабильность пресинаптических терминалей, является маркером синаптических контактов [30].

Фиксация и иммуногистохимия. Самцов (n = 10 в каждой группе) под ингаляционным наркозом препаратом Форан (Aesica Queenborough, Великобритания) перфузировали через левый желудочек сердца последовательно 0.01 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и 4% раствором параформальдегида (ПАФ) в 0.1 М фосфатном буфере. После декапитации извлекали мозг и проводили постфиксацию в 4% ПАФ в течение 2-х часов при комнатной температуре. Далее образцы мозга инкубировали в 25% растворе сахарозы (Sigma, США) в 0.01 М ФСБ (pH 7.2-7.4) при +4°C в течение 36 часов для криопротекции. Далее образцы замораживали при -40°C в гексане, охлажденном жидким азотом. Серийные фронтальные срезы мозга толщиной 10 мкм изготавливали на криостате SM1900 (Leica, Германия) при температуре -23-25°C и монтировали на предметные стекла, покрытые желатином. Срезы промывали в 0.01 М ФСБ, содержащем 0.3% тритона X-100 (ФСБТ; Sigma, США) и инкубировали последовательно в: (1) эмбриональной телячьей сыворотке 1:15 в ФСБТ; (2) смеси первичных поликлональных антител кролика к синапсину 1 (AB1543, Abcam, Великобритания; 1:500) и моноклональных антител мыши к ГРГ I (sc-32292, Santa Cruz Biotechnology, США, 1:500) в ФСБТ (pH 7.2-7.4) с 1% бычьего

сывороточного альбумина (БСА; Sigma, США); (3) смеси вторичных антител осла к Ig мыши, конъюгированных с AlexaFluor 488 (AB150105, Abcam, Великобритания; 1:500) и вторичных антител осла к Ig кролика, конъюгированных с AlexaFluor 568 (AB175470, Abcam, Великобритания; 1:500), в ФСБТ с 1% БСА (pH 7.2-7.4). Срезы промывали после инкубации с первичными антителами в ФСБТ, а после вторичных антител в 0.01 М ФСБ. После промывки в 0.01 М ФСБ образцы были заключены в Mowiol (Sigma, США).

Срезы анализировали с использованием конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica, Германия) с длиной волны 488 и 568 нм. Анализировали в среднем по 10 видимых ГРГ-иммунореактивных нейронов с видимым телом и дендритами на каждом из 8-10 срезов от каждого животного. Каждый нейрон сканировали с использованием 60× иммерсионного объектива с 4× цифровым увеличением через 0.2 мкм при постоянных параметрах интенсивности лазера и чувствительности детектора. Сканирование на каждой длине волны производили последовательно, чтобы избежать артефактов смешения эмиссии от разных флуорохромов во время детекции. Размер кадра каждого ГРГ-иммунореактивного нейрона был установлен равным 1024 × 1024 пикселям, стопки состояли из 50-80 последовательных конфокальных микрофотографий, снятых с интервалом 0.2 мкм по всей глубине каждого нейрона. Подсчёт синаптических контактов производили последовательно по оптическим срезам в проекции X-Z и Y-Z с использованием программы Leica LAS AF (Leica, Германия). Кластеры синапсин-1, демонстрирующие близкое расположение с телом клетки иммунореактивного ГРГ нейрона, определяли вручную путем сканирования отдельных Z-срезов с помощью программного обеспечения Leica LAS AF (Leica, Германия). Синапсин-1 иммунореактивные кластеры были определены, как находящиеся в контакте с ГРГ-иммунореактивными нейронами, если между зеленой и красной флуоресценцией не было видно отдельных пикселей.

Количество синапсин-1-иммунореактивных кластеров оценивали, как среднее по двум квадратным областям площадью 400 мкм², прилегающим к ГРГ-иммунореактивным нейронам с двух разных сторон, и выражалось, как число кластеров на 400 мкм², чтобы показать общее количество синапсин-1-иммунореактивных кластеров в непосредственной близости от нейронов.

Статистический анализ. Для данных по количеству синапсин-1-иммунореактивных кластеров на ГРГ нейронах и в областях, непосредственно к ним прилегающих, определяли стандартную ошибку среднего значения. Статистическую обработку данных производили с использованием программы STATISTICA версии 10 (Statsoft Inc., Tulsa, США) методом однофакторного дисперсионного анализа (one-way

ANOVA), статистически достоверной считалась величина различий средних значений при $p < 0.05$.

1.2.3 Результаты и обсуждение

Формирование синаптических контактов на ГРГ нейронах в области перегородки и преоптической области у половозрелых самцов-потомков в норме и после воздействия ЛПС на ЭД12. После воздействия ЛПС на ЭД12 у половозрелых самцов на ПНД80 обнаружено статистически значимое снижение среднего количества синапсин-1-иммунореактивных кластеров в областях, окружающих ГРГ нейроны, в септо-преоптической области переднего гипоталамуса (рисунок 1.7).

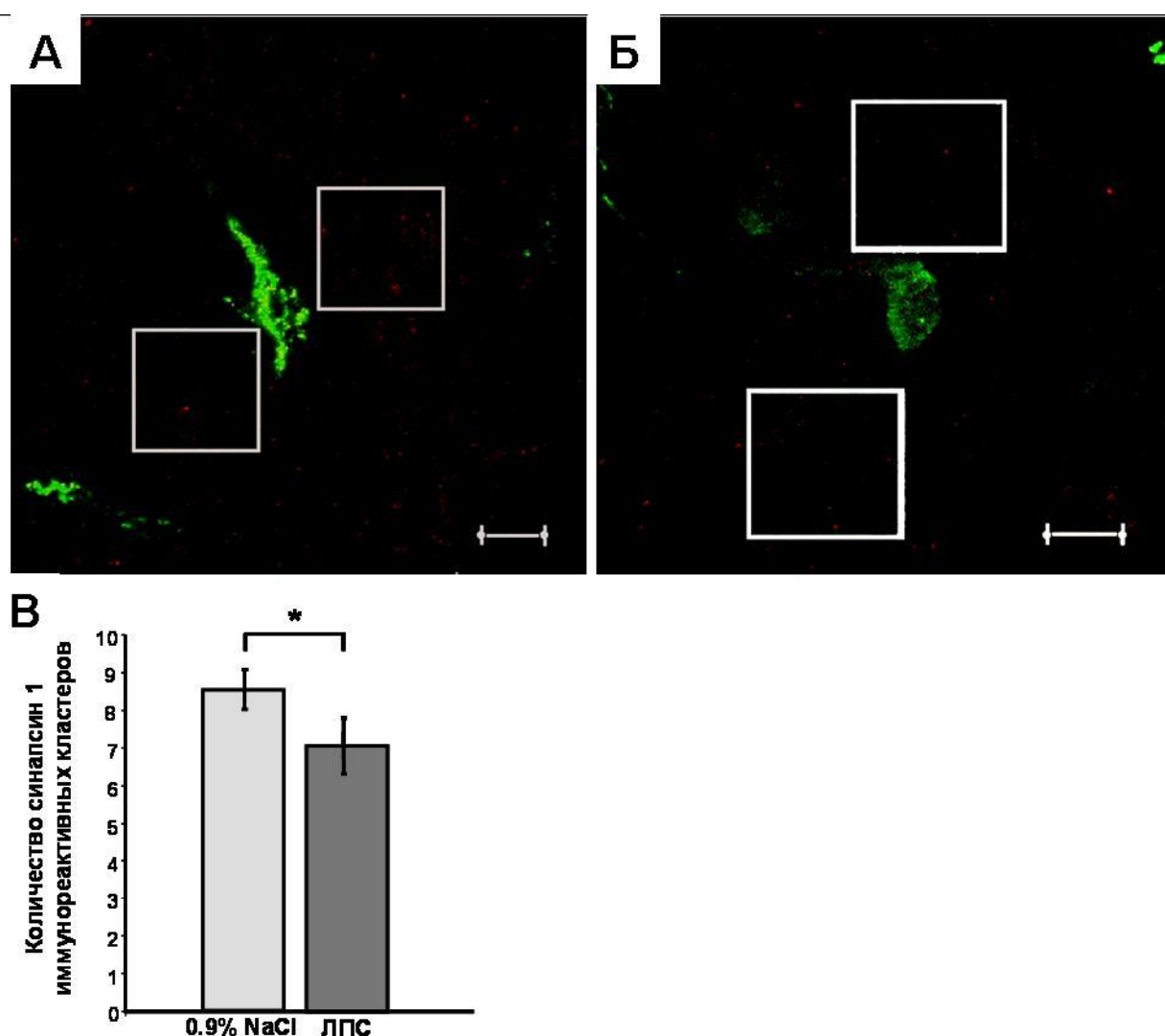


Рисунок 1.7 - Влияние ЛПС на формирование синаптических контактов в областях, окружающих ГРГ нейроны, у половозрелых самцов-потомков крыс (А) после введения 0.9% раствора NaCl (контроль), (Б) после введения ЛПС (50 мкг/кг) на ЭД12. Максимальная проекция стопки конфокальных микрофотографий нейронов, окрашенных антителами к ГРГ и синапсину 1. Масштабная линейка 10 мкм. (В) - число синапсин-1-иммунореактивных кластеров на 400 мкм². М ± SEM, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, n = 10 в каждой группе.

Формирование синаптических контактов на ГРГ нейронах у половозрелых самцов-потомков после воздействия ЛПС на ЭД12 или ЭД18. ГРГ-иммунореактивные нейроны у половозрелых самцов-потомков, матери которых подвергались воздействию ЛПС на ЭД12, и у контрольных животных были выявлены в медиальной области перегородки переднего мозга, в области сосудистого органа терминальной пластинки и переднего гипоталамуса промежуточного мозга. Синапсин-1-иммунореактивные кластеры были обнаружены как на телах, так и на дендритах ГРГ нейронов в контрольной и опытной группах. После воздействия ЛПС на ЭД12 наблюдалось достоверное снижение числа синаптических контактов приблизительно на 30% по сравнению с контрольной группой. В то же время введение ЛПС на ЭД18 не приводило к статистически достоверному снижению числа синаптических контактов на ГРГ нейронах (рисунок 1.8). Полученные данные позволяют предположить, что критическим периодом развития ГРГ системы являются именно начальные этапы их миграции из эпителия плакод в мозг на ЭД12.

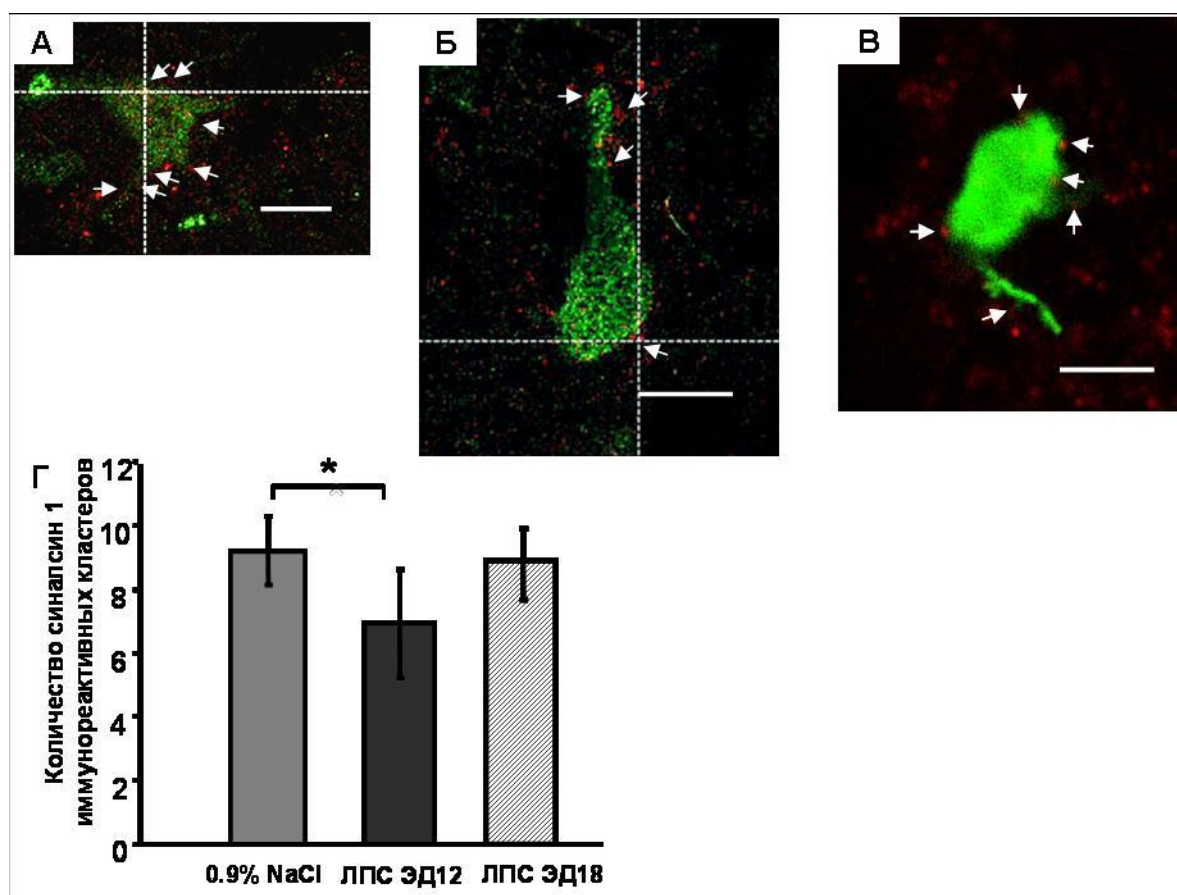


Рисунок 1.8 - Влияние ЛПС на формирование синаптических контактов на ГРГ нейронах у половозрелых самцов-потомков крыс (А) после введения 0.9% NaCl (контроль), (Б) ЛПС (50 мкг/кг) на ЭД12, (В) ЛПС на ЭД18. Максимальная проекция стопки конфокальных микрофотографий нейронов, окрашенных антителами к ГРГ (зеленый) и синапсину (красный), белые стрелки – синапсин-1-иммунореактивные кластеры. Масштабная линейка 20 мкм (А, В), 10 мкм (Б). (Г) - число

синапсин-1-иммунореактивных кластеров на ГРГ нейрон у самцов после воздействия ЛПС на ЭД12 и ЭД18; М +/- SEM, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, $n = 10$ в каждой группе.

Таким образом, воздействие бактериального ЛПС на развивающийся организм приводит к снижению общего количества афферентных терминалей, оканчивающихся на ГРГ нейронах переднего гипоталамуса и в областях, окружающих ГРГ нейроны. Снижение иннервации ГРГ нейронов может быть связано с нарушениями развития и функционирования нейротрансмиттерных систем мозга после воздействия различных стрессогенных факторов, включая бактериальное или вирусное инфицирование, в раннем онтогенезе [22]. Снижение количества дофаминергических нейронов черной субстанции, серотонинергических нейронов ядер шва продолговатого мозга [31] и ГАМК-продуцирующих нейронов гиппокампа [32] наблюдалось у половозрелого потомства после введения беременным самкам крыс и мышей бактериального ЛПС в критические периоды развития мозга плода. Следует отметить, что регуляция функциональной активности ГРГ нейронов опосредована сложной нейрогуморальной системой, расположенной не только в различных областях мозга, но и в прилежащих к ГРГ нейронам участках [33]. Пренатальное воздействие дексаметазона также вызывало снижение количества синаптических контактов, иммунопозитивных к синапсину 1, как на ГРГ нейронах, так и в окружающих их областях у потомства крыс [34]. Снижение общего количества синапсов в переднем мозге крыс, сопровождающееся изменениями экспрессии белков синаптических контактов, наблюдалось у потомства в возрасте 2-3 месяцев после различных стрессорных воздействий на мать с ЭД13 по ЭД20 [35]. Количество синапсов на ГРГ нейронах различных областей мозга мышей изменяется во время его постнатального развития и к наступлению половой зрелости увеличивается в основном за счет образования дополнительных шипиков на телах и дендритах ГРГ нейронов [36].

Наряду с нарушениями функций нейротрансмиттерных систем, индуцированными ЛПС, нарушения формирования афферентной иннервации ГРГ нейронов могут быть связаны также с подавлением их интраназальной миграции в мозг и появлением в гипоталамусе с опозданием [26]. Согласно нашим данным, снижение количества синаптических контактов на ГРГ нейронах наблюдалось после введения ЛПС на 12 день эмбрионального развития. Воздействие ЛПС на более позднем сроке, в частности на ЭД18, подобное действие не оказывало. Мы предполагаем, что данный эффект может быть опосредован провоспалительными цитокинами, регулирующими интраназальную миграцию ГРГ нейронов, и в первую очередь, ИЛ-6. Ранее нами было показано увеличение содержания ИЛ-6 в крови плодов в 60 раз через час после введения ЛПС

матери. На пути интраназальной миграции ГРГ нейронов в мозг обнаружены рецепторы к ИЛ-6 [26].

Формирование синаптических контактов на ГРГ нейронах у половозрелых самцов-потомков после воздействия ЛПС, противовоспалительного модулятора IgG и блокатора рецептора к ИЛ-6 (IgG1) на ЭД12. В последние годы предпринимаются попытки предотвратить или отменить последствия воспаления в раннем онтогенезе. Перспективными корректирующими препаратами, подавляющими воспаление на ранних стадиях развития, могут оказаться IgG человека для внутривенного введения и рекомбинантные моноклональные антитела к провоспалительным цитокинам и их рецепторам. Однако использование такого подхода у беременных женщин требует особой осторожности и необходимым этапом является апробирование использования моноклональных антител при беременности на экспериментальных животных.

Нами показано, что введение крысиного поликлонального IgG через 40 минут после ЛПС на ЭД12 приводит к восстановлению числа синаптических контактов на ГРГ нейронах до контрольного уровня (рисунок 1.9). Подобный эффект наблюдался и после блокады моноклональными антителами (IgG1) рецептора к ИЛ-6 – ключевому цитокину нейровоспаления (рисунок 1.9), что позволяет предположить участие ИЛ-6 в начальных процессах миграции ГРГ нейронов.

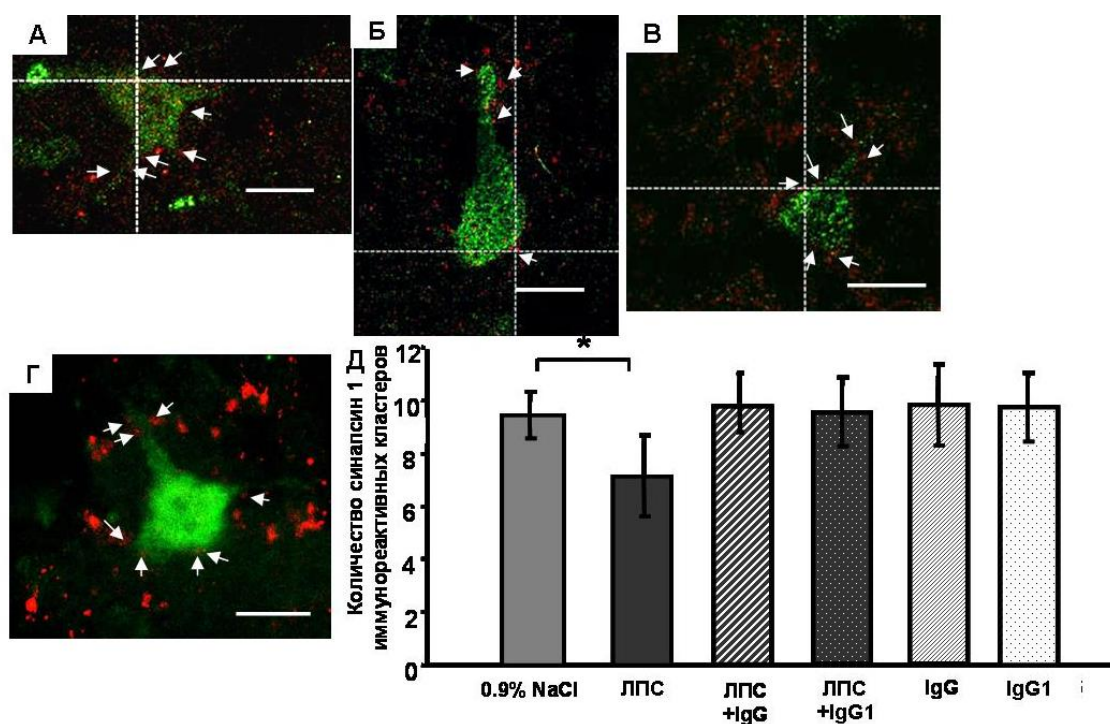


Рисунок 1.9 - Влияние поликлонального IgG и моноклональных антител (IgG1) к рецептору ИЛ 6 на формирование синаптических контактов на ГРГ нейронах (А) после введения 0.9% NaCl (контроль), (Б) ЛПС (50 мкг/кг), (В) ЛПС + IgG (1 мг/кг), (Г) ЛПС + IgG1(2 мг/кг) на ЭД12. Окраска антителами к ГРГ (зеленый) и синапсину-1

(красный), белые стрелки – синапсин-1-иммунореактивные кластеры. Масштабная линейка 20 мкм. (Д) – число синапсин-1 иммунореактивных кластеров на ГРГ нейрон у самцов крыс в контрольной группе, после воздействия ЛПС, ЛПС + IgG и ЛПС + IgG1 (антитела к рецептору ИЛ-6) на ЭД12. М $\pm$ SEM, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, $n = 10$ в каждой группе.

К настоящему времени накоплен большой опыт использования IgG человека в терапии привычного невынашивания беременности [27, 37]. Существенный вклад в их действие вносит цитокин из суперсемейства трансформирующего фактора роста (TGF- β) активин А, синтез которого увеличивается после введения IgG [38]. Согласно нашим данным, IgG мыши, введенный самкам мышей через час после введения ЛПС на ранних сроках беременности, модулирует половое созревание самцов-потомков, параметры которого оценивали в половозрелом возрасте. Кроме того, IgG модулировал дисбаланс половых стероидов у самцов, вызванный воспалением в пренатальный период: снижал повышенное содержание эстрадиола и повышал сниженное содержание тестостерона в крови в препубертатном периоде. Это приводило к увеличению числа спариваний у половозрелых самцов [29]. В совокупности, представленные данные свидетельствуют о том, что противовоспалительная терапия при беременности позволяет не только сохранить потомство, но и может быть эффективным подходом к предотвращению нарушений развития гипоталамо-гипофизарно-репродуктивной оси у потомства.

1.2.4 Заключение

Представленные в работе данные свидетельствуют о негативном влиянии системного воспаления, индуцированного у матери бактериальным ЛПС в критические периоды онтогенеза, на формирование афферентных синаптических контактов на ГРГ нейронах и в окружающих их областях у половозрелых самцов крыс. Воздействие ЛПС на начальных этапах интраназальной миграции ГРГ нейронов в мозг приводит к замедлению их миграции к конечной точке расположения нейронов в гипоталамусе, тем самым нарушая развитие и функционирование гипоталамо-гипофизарно-репродуктивной оси. При воздействии ЛПС на более позднем сроке миграции ГРГ нейронов нарушения их афферентной иннервации не происходит. Важную роль в этих процессах играет, по-видимому, провоспалительный цитокин ИЛ-6, содержание которого значительно увеличивается в организме плода под действием ЛПС. Блокада рецептора к ИЛ-6 в период, когда его секреция у плода еще не достигла своего пика, приводит к полному восстановлению афферентной иннервации ГРГ нейронов у половозрелого потомства. Подобный эффект оказывает также поликлональный IgG при воспалении у матери на

ранних сроках беременности. Таким образом, информация о нарушениях, индуцированных стрессом, в развитии физиологических систем позволит своевременно выявлять их у потомства и осуществлять коррекцию уже в раннем онтогенезе.

1.2.5 Список использованных источников

18 Taroc E.Z.M., Prasad A., Lin J.M. The terminal nerve plays a prominent role in GnRH-1 neuronal migration independent from proper olfactory and vomeronasal connections to the olfactory bulbs//*Bio.l Open*. - 2017. - Vol. 6. - P. 1552-1568.

19 Zakharova L., Sharova V., Izvolskaia M. Mechanisms of reciprocal regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing and immune systems: the role of GnRH, cytokines and their receptors in early ontogenesis in normal and pathological conditions//*Int. J. Mol. Sci.* - 2021. - Vol. 22. - P. 114.

20 Herbison A.E. The Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator//*Endocrinology*. - 2018. - Vol. 159. - P. 3723-3736.

21 Moore A.M., Prescott M, Czielesky K. Synaptic Innervation of the GnRH Neuron Distal Dendron in Female Mice//*Endocrinology*. - 2018. - Vol. 159. - P. 3200-3208.

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 Quaynor S.D., Bosley M.E., Duckworth C.G. Targeted next generation sequencing approach identifies eighteen new candidate genes in normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome//*Mol. Cell. Endocrinol.* - 2016. - Vol. 437. - P. 86-96.

24 Barabás K., Szabó-Meleg E., Ábrahám I.M. Effect of inflammation on female Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) neurons: Mechanisms and consequences//*Int. J. Mol. Sci.* - 2020. - Vol. 21. - P. 529.

25 Wan H., Yang L.L., Hu Y.F. LPS exposure during pregnancy impairs testicular development, steroidogenesis and spermatogenesis in male offspring//*PLoS One*. - 2014. - Vol. 9. - e106786.

26 Sharova V.S., Izvolskaia M.S., Zakharova L.A. Lipopolysaccharide-induced maternal inflammation affects the gonadotropin-releasing hormone neuron development in fetal mice//*Neuroimmunomodulation*. - 2015. - Vol. 22. - P. 222-232.

27 Игнатюк В.М., Извольская М.С., Захарова Л.А. Стресс при беременности и нарушения развития нейроэндокринной, иммунной и репродуктивной систем у потомства в пренатальном и постнатальном онтогенезе: от эксперимента к разработке подходов сохранения здоровья у человека//*Акушерство и гинекология*. - 2021. - Т. 8. - С. 69–74.

Английская версия: Ignatyuk V.M., Izvolskaya M.S., Zakharova L.A. Stress during pregnancy and developmental abnormalities of the neuroendocrine, immune, and reproductive systems in offspring during prenatal and postnatal ontogenesis: From the experiment to the elaboration of approaches to preserving human health//Akusherstvo i Ginekologiya (Russian Federation). - 2021. - Vol. 8. - P. 69-74.

28 Palmeira P., Quinello C., Silveira-Lessa A.L., Zago C.A., Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies//Clin. Dev. Immunol. - 2012. - 985646.

29 Izvolskaia M.S., Ignatiuk V.M., Ismailova A.H., Sharova V.S., Zakharova L.A. IgG immune modulation in male mice with reproductive failure after prenatal inflammation//Reproduction. - 2021. - Vol. 161. - P. 669-679.

30 Takei Y., Harada A., Takeda S. Synapsin I deficiency results in the structural change in the presynaptic terminals in the murine nervous system//J. Cell Biol. - 1995. - Vol. 131. - P. 1789- 1800.

31 Wang S., Yan J.-L., Lo Y.-K. Dopaminergic and serotonergic deficiencies in young adult rats prenatally exposed to the bacterial lipopolysaccharide//Brain Res. - 2009. – Vol. 1265. - P. 196-204.

32 Harvey L., Boksa P. A stereological comparison of GAD67 and reelin expression in the hippocampal stratum oriens of offspring from two mouse models of maternal inflammation during pregnancy//Neuropharmacology. - 2012. - Vol. 62. - P. 1767-1776.

33 Herbison A.E., Moenter S.M. Depolarising and hyperpolarising actions of GABA(A) receptor activation on gonadotrophin-releasing hormone neurones: towards an emerging consensus//J. Neuroendocrinol. - 2011. - Vol. 23. - P. 557-569.

34 Lim W.L., Idris M.M., Kevin F.S. Maternal Dexamethasone Exposure Alters Synaptic Inputs to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in the Early Postnatal Rat//Front. Endocrinol. (Lausanne). - 2016. - Vol. 7. - P. 117.

35 Biala Y.N., Bogoch Y., Bejar C. Prenatal stress diminishes gender differences in behavior and in expression of hippocampal synaptic genes and proteins in rats//Hippocampus. - 2011. - Vol. 21. - P. 1114-1125.

36 Cottrell E.C., Campbell R.E., Han S.K. et al. Postnatal remodeling of dendritic structure and spine density in gonadotropin-releasing hormone neurons//Endocrinology. - 2006. - Vol. 147. - P. 3652-3661.

37 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.

38 Florio P., Gabbanini M., Borges L.E., Bonaccorsi L., Pinzauti S., Reis F.M. Activins and related proteins in the establishment of pregnancy//Reprod. Sci. - 2010. - Vol. 17. - P. 320–330.

РАЗДЕЛ 2 МОДЕЛИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСОВ И АДАПТАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПОПУЛЯЦИИ

2.1 Введение

Пандемия COVID-19 распространилась по всему миру, охватив все группы населения. Вспышки продолжают наблюдаться и сейчас, в том числе среди привитых людей. Из-за этого в некоторых странах происходит откат к эпидемиологическим мерам, эффективность которых, как было показано во многих работах, является спорной: закрытию людей в домах с целью помещения на карантин, требованию ношения масок и перчаток на улице, приостановке работы торговых центров, парков и городского транспорта. В связи с этим актуальными являются новые исследования, которые могли бы пролить свет на динамику распространения коронавируса SARS-CoV-2 с помощью непрямых путей передачи и дать окончательный ответ на вопрос, на каких же все-таки эпидемиологических мерах нужно сосредоточиться правительствам по всему миру.

Ранее нами была предложена модифицированная модель SIR («восприимчивые – инфицированные – выздоровевшие») для исследования распространения вируса SARS-CoV-2 в различных типах популяций и разных пространственных и экологических окружениях [1, 2]. В текущий отчетный период мы сосредоточились на моделировании передачи вируса непрямым путем через поверхности, а также на экологическом анализе факторов, способствующих распространению пандемии.

Целями работы явилось:

- 1) предложить модель путей распространения коронавируса с учетом его передачи через твердые поверхности;
- 2) оценить экологические факторы, способствующие распространению коронавируса, в теоретическом контексте Стокгольмской парадигмы.

2.2 Материалы и методы

Тип исследования. Исследование представляет собой компьютерное моделирование и экологический анализ.

Программное обеспечение. Для моделирования, статистических расчетов и визуализации использовалась программа OriginLab Origin 8.1.

2.3 Результаты и обсуждение

Моделирование распространения SARS-CoV-2 с учетом его передачи через твердые поверхности. Одним из основных бытовых источников не прямой передачи коронавируса, равно как и других вирусных патогенов, является оборот наличных денег среди населения

[3-6]. Разумеется, наличные банкноты не являются каким-то особым путем передачи инфекции, принципиально отличным от, например, поручней в городском транспорте, дверных ручек, кнопок лифтов и тому подобных элементов инфраструктуры. Однако наличные деньги настолько часто используются в нашей жизни, что многие люди в силу несоблюдения элементарных норм персональной гигиены (например, отсутствие мытья рук после обращения с деньгами) заражаются во время пандемии именно через наличные деньги [7-10]. В связи с этим представляет интерес моделирование деактивации вирионов SARS-CoV-2 на загрязненной (например, жиром или пылью), ветхой, влажной и пористой бумаге – поверхности, которая является хорошим приближением для наличных денег.

Вирионы SARS-CoV-2 оседают на твердых поверхностях в результате кашля, чихания или иного процесса распространения слюны инфицированного человека, и поверхности, в том числе поверхности денежных купюр, становятся объектами не прямой передачи вируса.

Хотя работ, посвященных непосредственно адгезии вирионов SARS-CoV-2 на денежных купюрах, пока не проводилось, Сюэ с соавторами [7], Азума с соавторами [6] и Маркес с соавторами [8] показали, что вирусные частицы SARS-CoV-2 по-разному ведут себя на разных поверхностях. Бумага, особенно бумага со слоем пыли, жира и других загрязнителей (приближение для потрепанных наличных банкнот), может эффективно абсорбировать крупные вирионы SARS-CoV-2 (около 100-200 нм в диаметре) [9, 10]. Хироэ с соавторами подчеркнул, что во время любой эпидемии наличное денежное обращение является важным фактором передачи болезни [11].

На основании данных об основном репродуктивном числе и темпах деактивации вирусов SARS-CoV-2 и гриппа А (H1N1), опубликованных в работах [9-11], мы провели компьютерное моделирование (расчет) и сравнили поведение вирионов SARS-CoV-2 во время прикрепления к банкнотам с поведением вируса гриппа Influenza А H1N1. Результат продемонстрирован на рисунке 2.1.

Из рисунка 2.1 видно, что время полужизни активных вирионов SARS-CoV-2 $T_{1/2, \text{SARS-CoV-2}}$ на грязной и за жиренной бумаге почти в два раза больше, чем время полужизни активных вирионов гриппа А $T_{1/2, \text{грипп А}}$. Кроме того, чтобы достичь уровня активных вирионов гриппа А на грязной бумаге, соответствующее их времени полужизни, SARS-CoV-2 потребуется примерно два дня, то есть период в четыре раза больше, чем период для гриппа А (точка $Q_{\text{SARS-CoV-2}}$ на временной шкале) [12]. Это свидетельствует о большей стабильности SARS-CoV-2 на пористых поверхностях (неясно, подразумевает ли это механическую стабильность или биохимическую стабильность). При этом количество вирионов SARS-CoV-2, абсорбированных банкнотами, в момент времени 0 примерно в 2,5

раза больше, чем вирионов инфлюэнцы А в момент времени 0. Это можно объяснить большей адгезионной способностью SARS-CoV-2 по отношению к грязным, вязким и гидрофобным бумажным поверхностям, так как при моделировании исходные количества вирусов, направленных на банкноты, были равны для SARS-CoV-2 и гриппа А.

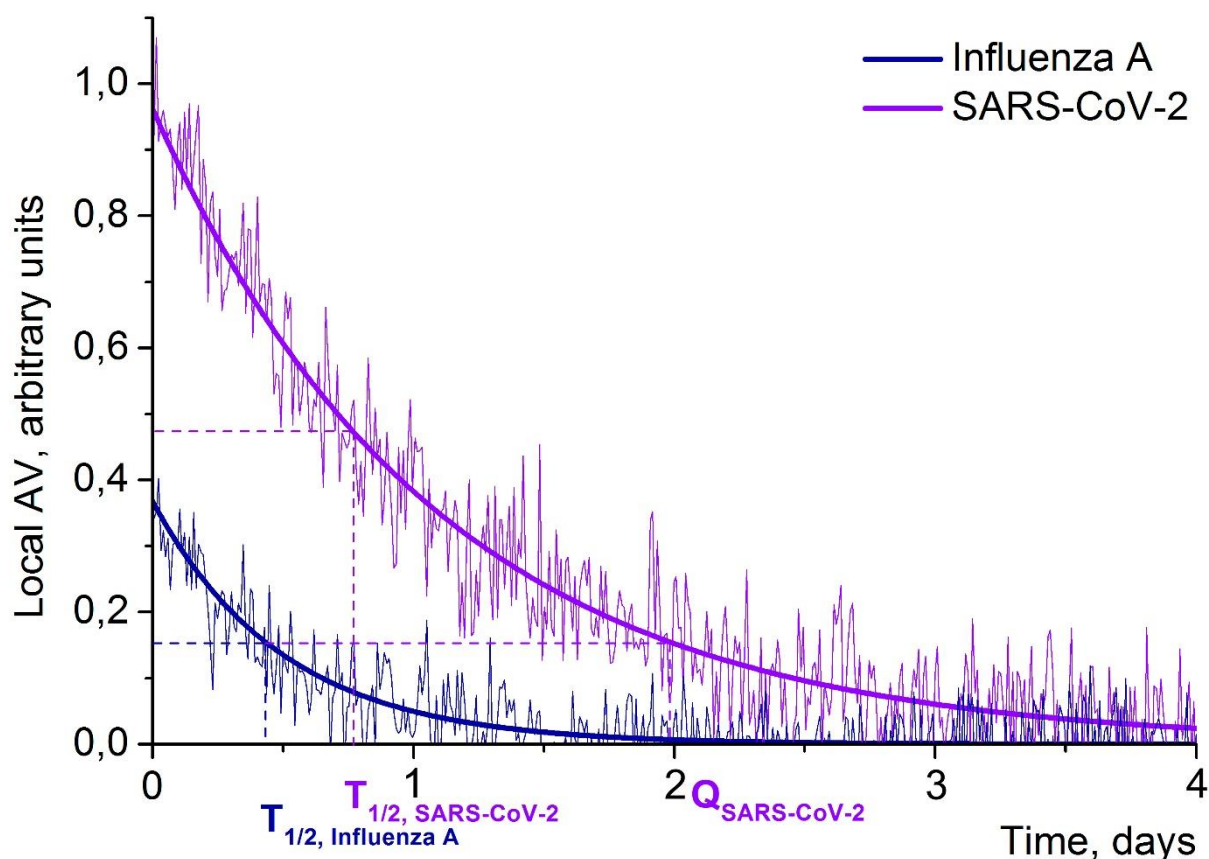


Рисунок 2.1 - Моделирование деактивации двух вирусов на грязной и за жиренной бумаге (приближение для наличных денежных купюр) в идеальных условиях без УФ-излучения и механического трения: SARS-CoV2- и инфлюэнца А (H1N1) [12].

Первоначальное количество вирионов, направленных на поверхность, у двух вирусов одинаково. Пуассоновский шум 5%. Моделирование выполнено в программе OriginPro 8.1.

Проанализировав данные, приведенные авторами монографии «Вычислительная эпидемиология» [13] по распространению коронавируса в Гонконге, мы можем сделать вывод, что наше заключение о важности учета контактного пути передачи вируса SARS-CoV-2, включая оборот наличных купюр среди населения, универсально для различных стран [14]. Разумеется, в реальной жизни распространение эпидемии намного сложнее, чем наша теоретическая модель, и может включать различные наземные и воздушные пути. Однако главный вывод будет таким же, как и для нашей идеализированной модели: во время пандемии COVID-19 и подобных пандемий наличные деньги становятся опасной субстанцией, поскольку они сильно способствуют распространению патогена. Валюты с

пластиковыми наличными деньгами, такие как гонконгские доллары или маканские патаки, менее опасны в силу того, что адгезия вируса на тонком пластике меньше, чем на грязной бумаге, но такие банкноты редко встречаются в мире, поскольку подавляющее большинство валют все еще печатается на бумаге.

Экологические факторы, способствующие распространению пандемии COVID-19. Из-за огромных темпов прироста населения на земном шаре, интенсивных миграционных и туристических потоков, а также процессов глобализации экономики и унификации образа жизни людей коронавирус SARS-CoV-2 продолжает вызывать последствия, сравнимые с полномасштабным военным конфликтом.

Пандемия сделала явным глобальный экологический кризис, который начался задолго до появления коронавируса SARS-CoV-2 как человеческого патогена. Последствия данного кризиса для биосферы и человечества будут преследовать нас в течение неопределенного времени. Почему? Человеческая цивилизация во многом полагалась на глобализацию как средство решения проблем (1) климатической катастрофы, (2) эволюции биоты, нарушенной антропогенным воздействием, (3) опасного сокращения территорий «дикой» природы и (4) новых инфекционных заболеваний. Но вера в глобализацию оказалась тщетной. Дальнейшее безоговорочное доверие к силе глобализации может только усугубить эпидемиологические кризисы – нынешние и будущие, – поскольку неограниченное усиление связей между людьми в ситуации постоянно растущего воздействия человека на биосферу будет приводить только к худшим, намного более опасным пандемиям.

Мы провели анализ литературы, касающейся экологических факторов, способствующих распространению эпидемиологических угроз, включая книгу Агосты и Брукса «Основные метафоры эволюции: Дарвинизм тогда и теперь» [15]. Основными факторами, способствующими быстрому распространению инфекций в наши дни, которые перечисляют исследователи, можно считать следующие:

- изменение климата;
- изменение путей миграций диких животных, в том числе из-за техногенных объектов;
- изменение географических границ ареалов обитания различных видов от полюсов до экватора;
- все более тесный контакт человечества с природными очагами инфекций (большинство человеческих патогенов раньше вызывали только зоонозы): вырубка лесов, фактическое исчезновение границы между природной окружающей средой и техногенной окружающей средой, кулинарные привычки населения Восточной и

Юго-Восточной Азии, в рамках которых деликатесами считается употребление сырого мяса ряда диких животных и т. п.;

- изменения состава биоты мирового океана, постоянно загрязняемого неразлагаемым пластиком;
- все более часто наблюдаемая смена хозяина организмами-паразитами.

Поскольку около 60% видов на Земле является паразитами, являющимися переносчиками огромного количества вирусных зоонозных патогенов, которые могут стать патогенами, вызывающими человеческие болезни, можно представить, к чему потенциально приведут в долгосрочной перспективе процессы, описанные выше, если не будут предприняты практические шаги по уменьшению разрушительного влияния техногенной цивилизации на окружающую среду.

Большой интерес в данном контексте представляет анализ так называемой Стокгольмской парадигмы в эволюционной экологии (рисунок 2.2) [16]. Стокгольмская парадигма – это теоретическая основа, которая объясняет отношения между (1) экспансией и изоляцией видов, (2) исследованием новых питательных ресурсов организмами и эксплуатацией текущих ресурсов и (3) генерализацией и специализацией видов. Стокгольмская парадигма является удобной системой координат для понимания распространения новых инфекционных заболеваний, включая SARS-CoV-2, в ситуации постоянно растущего антропогенного воздействия на биосферу.

На рисунке 2.2 мы видим, что теоретические основы Стокгольмской парадигмы восходят (и включают в разной степени) гипотезу таксонных импульсов, первоначально сформулированную Т. Эрвином, гипотезу осцилляций, предложенную Н. Б. Харди, и модифицированную географико-мозаичную теорию коэволюции, выдвинутую Дж. Н. Томпсоном.

Название «Стокгольмская парадигма» было первоначально предложено Дэниелом Бруксом на конференции по теории эволюции в Стокгольме в 2013 году, а затем стало широко использоваться в литературе. Данное название было призвано отразить существенный вклад нескольких поколений исследователей из Стокгольмского университета в создание парадигмы. Парадигма систематизирует факторы экологических рисков в ситуации глобального человечества, включая эпидемиологические риски, и является уместной эколого-теоретической концепцией для понимания беспрецедентного эффекта текущей пандемии коронавируса SARS-CoV-2.

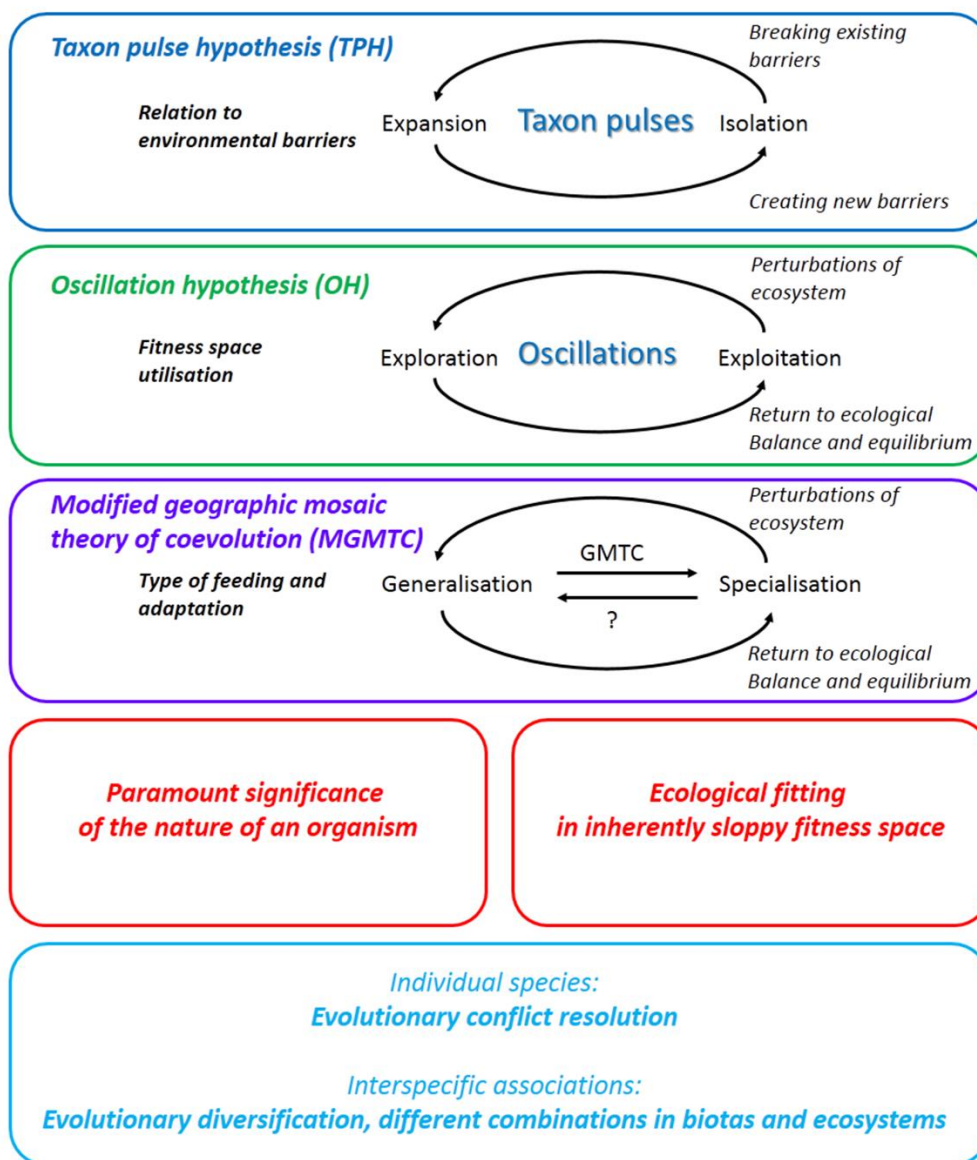


Рисунок 2.2 - Структура Стокгольмской парадигмы [15].

2.4 Заключение

С помощью компьютерного моделирования мы показали, что быстрое распространение нынешней пандемии COVID-19 в мире можно объяснить, учитывая не прямой (контактный) путь передачи вируса SARS-CoV-2 в дополнение к обычному воздушно-капельному пути. Значительная часть передачи вируса осуществляется через поверхности, в том числе в процессе циркуляции наличных банкнот.

В рамках анализа эколого-теоретической Стокгольмской парадигмы применительно к распространению пандемии COVID-19 мы установили ряд важнейших факторов, способствующих глобальному присутствию патогена SARS-CoV-2. Авторы

Стокгольмской парадигмы подчеркивают, что серьезнейшие изменения климата и эволюционных процессов, вызванные человеком, будут усилены еще большим ростом населения в ближайшие десятилетия. Этот рост, вероятно, достигнет цифры пятнадцать миллиардов человек к 2100 году и, следовательно, сотрет грань между «обществом» и «природой», создав совершенно новую эволюционную среду для *homo sapiens* («искусственная природа»). Существует опасность процветания и доминирования возбудителей новых инфекционных заболеваний в этих условиях, если уже сейчас не будут предприняты практические шаги по уменьшению разрушительного влияния техногенной цивилизации на окружающую среду.

2.5 Список использованных источников

1 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.

2 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.

3 Meyerowitz E. A., Richterman A., Gandhi R. T., Sax P. E. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors//Annals of Internal Medicine. - 2021. - Vol. 174. - No. 1. - P. 69-79. - DOI: 10.7326/M20-5008

4 Fathizadeh H., Maroufi P., Momen-Heravi M., Dao S., Köse Ş., Ganbarov K., Pagliano P., Esposito S., Kafil H. S. Protection and disinfection policies against SARS-CoV-2 (COVID-19)//Le Infezioni in Medicina. - 2020. - Vol. 28. - No. 2. - P. 185-191.

5 Sassin W. Die Grenzen der Ökonomie: Globalisierung - Vom Füllhorn zum Giftbecher?//Eurasian Crossroads. - 2020. -Vol. 1. - No. 1. - Article 010410216.

6 Azuma K., Yanagi U., Kagi N., Kim H., Ogata M., Hayashi M. Environmental factors involved in SARS-CoV-2 transmission: effect and role of indoor environmental quality in the strategy for COVID-19 infection control//Environmental Health and Preventive Medicine. - 2020. - Vol. 25. - No. 1. - P. 66. - DOI: 10.1186/s12199-020-00904-2.

7 Xue X., Ball J. K., Alexander C., Alexander M. R. All Surfaces Are Not Equal in Contact Transmission of SARS-CoV-2//Matter. - 2020. - Vol. 3. - No. 5. - P. 1433-1441. - DOI: 10.1016/j.matt.2020.10.006.

8 Marquès M., Domingo J. L. Contamination of inert surfaces by SARS-CoV-2: Persistence, stability and infectivity. A review//Environmental Research. - 2021. - Vol. 193. -

Article 110559. - DOI: 10.1016/j.envres.2020.110559.

9 Zhou L., Yao M., Zhang X., Hu B., Li X., Chen H., Zhang L., Liu Y., Du M., Sun B., et al. Breath-, air- and surface-borne SARS-CoV-2 in hospitals//Journal of Aerosol Science. - 2021. - Vol. 152. - Article 105693. - DOI: 10.1016/j.jaerosci.2020.105693.

10 Ren S. Y., Wang W. B., Hao Y. G., Zhang H. R., Wang Z. C., Chen Y. L., Gao R. D. Stability and infectivity of coronaviruses in inanimate environments//World Journal of Clinical Cases. - 2020. - Vol. 8. - No. 8. - P. 1391-1399. - DOI: 10.12998/wjcc.v8.i8.1391.

11 Hirose, R.; Ikegaya, H.; Naito, Y.; Watanabe, N.; Yoshida, T.; Bandou, R.; Daidoji, T.; Itoh, Y.; Nakaya, T. Survival of SARS-CoV-2 and influenza virus on the human skin: Importance of hand hygiene in COVID-19//Clin Infect Dis. - 2020. - Oct 3. - Article ciaa1517. - DOI: 10.1093/cid/ciaa1517.

12 Boguslavsky D.V., Sharova N.P., Sharov K.S. Cryptocurrency as epidemiologically safe means of transactions: Diminishing risk of SARS-CoV-2 spread//Mathematics. - 2021. - Vol. 9. - Article 3263. - DOI: 10.3390/math9243263.

13 Liu S., Xia S. Computational epidemiology: from disease transmission modeling to vaccination decision making. Cham: Springer, 2020.

14 Sharov K. S. Computational epidemiology//Travel Medicine and Infectious Disease. - 2021. - Vol. 43. - Article 102128. - DOI: 10.1016/j.tmaid.2021.102128.

15 Agosta S. J., Brooks D. R. The Major Metaphors of Evolution: Darwinism Then and Now. Cham: Springer, 2020.

16 Sharov K. S. The Stockholm paradigm: Specs for looking into the Pandora's box of emerging infectious diseases//Bioessays. - 2021. - Vol. 7. - Article 2100090. - DOI: 10.1002/bies.202100090.

РАЗДЕЛ 3 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ У БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

3.1 Введение

Первая часть работы посвящена изучению роли ферритинов и деацетилаз гистонов в процессах развития и морфогенеза у холодноводных морских губок. Губки (Porifera) - уникальные водные животные, клетки которых могут восстанавливать структуру тела после диссоциации и обладают способностью к переходам из одного типа в другой. Регулирование доступности железа - важная часть клеточного гомеостаза живых клеток. Биодоступность железа ограничена нерастворимостью солей трехвалентного железа, а избыток свободного железа приводит к окислительному стрессу. Обмен ионов железа в клетках опосредуется ферритинами. Члены суперсемейства ферритиноподобных белков вовлечены во множество клеточных метаболических путей, устойчивость к окислительно-восстановительному стрессу, репликацию ДНК, биосинтез хлорофилла, формирование оболочки эндоспор, метаболизм жирных кислот, модификацию тРНК, реакции монооксигеназы, детоксикацию и биоминерализацию [1-3]. Гибель клеток в результате ферроптоза характеризуется железозависимым накоплением реактивных окисленных липидов и зависит от регуляции накопления железа и экспрессии ферритина [4]. Ферритины беспозвоночных выполняют некоторые уникальные функции, которых нет у ферритинов позвоночных. Ферритин *Apis mellifera* (пчелы) участвует в образовании магнетита в их трофоцитах [5]. Ферритин-подобные белки суперсемейства связаны с иммунными функциями у морских беспозвоночных [6], а ферритин ChF морского трубочника *Chaetopterus* sp. участвует в генерации биолюминесценции секретируемой слизи [7]. Кристаллическая структура ферритина из морского двустворчатого моллюска *Sinonovacula constricta* предсказала сайты связывания железа в 3-кратном канале, ферроксидазном центре и предполагаемых сайтах нуклеации, подобных ферритинам млекопитающих [8]. Особый интерес представляет изучение функций ферритинов у эволюционно древних животных, к которым относятся губки. Гистоновые деацетилазы (HDACs) снижают уровень ацетилирования гистонов, что приводит к подавлению транскрипции. У позвоночных животных хорошо задокументировано участие гистоновых деацетилаз в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, эмбриональном развитии, возникновении и прогрессии злокачественных опухолей. Механизмы регуляции экспрессии генов, связанные с активностью гистоновых деацетилаз, в развитии губок не изучены.

Вторая часть работы посвящена исследованию регуляции 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 2021 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 [9, 10], протеасом [11] и сегрегазы VCP/p97 [12] необходима для протекания вирусного цикла и формирования первого типа зрелых вирусов BV (Budded Virions - выпочковывающийся вирус). В отчетный период проводили исследование поздних стадий вирусной инфекции, приводящих к формированию белковых тел включения правильной формы (полиэдров) и второго типа зрелых вирусов ODV (Occlusion Derived 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

Образцы холодноводных морских губок *H. dujardinii* и *H. panicea* были собраны в разные сезоны, соответствующие разным периодам жизненного цикла губок, на Беломорской биологической станции МГУ. Кроме того, для *H. dujardinii* были получены также образцы диссоциированных клеток и клеточных агрегатов. 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 [13, 14]. 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* [13, 14].

Рекомбинантные вирусы для экспрессии рекомбинантных белков были сконструированы с учетом опубликованных ранее результатов по анализу агрегационной способности фрагментов полиэдрина [15]. 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

Ферритины морских губок и эволюция ферритинов. Мы обнаружили, что у морских губок *Halisarca dujardinii* консервативный ферритин HdF1a/b входит в топ-10 наиболее экспрессирующихся генов наряду с такими генами, как актин и тубулин, в то время как атипичный HdF2 имеет уровень экспрессии на три порядка ниже [16]. Чтобы выявить особенности структуры ферритинов беспозвоночных и охарактеризовать атипичные неконсервативные ферритины, подобные HdF2, который обнаружен нами у холодноводной морской губки *Halisarca dujardinii*, был собран большой набор последовательностей из аннотированных и неаннотированных транскриптомных баз данных, который включал 533 последовательности ферритинов, принадлежащих 264 видам беспозвоночных из более чем 30 классов. Обнаружено, что у гребневигов во всех доступных базах данных, имеются только отдаленные гомологи ферритина, поэтому они не были включены в анализ. Среди проанализированных ферритинов 70% последовательностей у насекомых и только 25% последовательностей у других беспозвоночных имеют сигнальные пептиды (SP), тогда как все проанализированные

ферритины губок их не имеют. SP-ферритины имеют низкую идентичность с человеческим HuHF. Ферритины без SP обычно имеют более высокую идентичность с HuHF, но распределение уровней идентичности искажено, что предполагает неоднородную консервацию и присутствие инфраклассов. Мы определили два таких подкласса ферритинов без SP, консервативный и атипичный (атипичный определяется как имеющий менее 49% идентичности последовательности с HuHF или более пяти аминокислотных замен в трех функциональных доменах). Атипичные ферритины занимают промежуточное положение между консервативными не-SP ферритинами и SP-ферритинами по значениям идентичности с HuHF, обогащения мотива xRGG и длины последовательности. Соотношение консервативных и атипичных классов в анализируемых ферритинах различается для насекомых (8% и 23%) и других беспозвоночных (57% и 18%). В губках атипичные ферритины представлены HdF2 (37,7% идентичности (id) с HuHF), *E. muelleri* EmF2 (46,4% id) и всеми ферритинами *S. ciliatum*: SycF1a/b, SycF2, SycF3 (44,3–45,4% id). Почти во всех атипичных ферритинах отсутствует железо-чувствительный элемент (IRE), некоторые исключения можно рассматривать как маргинальные случаи консервативных ферритинов (47–49% id). Общий уровень присутствия IRE составляет 47% для ферритинов беспозвоночных, не являющихся насекомыми, и 29% для ферритинов насекомых. IRE чаще всего встречаются в классах ферритина с наибольшим представительством в группе: 63% консервативных ферритинов вне класса насекомых и 41% SP-ферритинов насекомых [16].

Ферритины губок, атипичный HdF2, SycF1a/b, SycF2, консервативный HpF1, SdF1, SdF2, SIF2 находятся на периферии кластера консервативного ферритина, а также HuLF человека (рисунок 3.1). В то же время атипичные EmF2 и SycF3 находятся ближе к центру кластера вместе с консервативными HdF1a/b, AqF1a/b и HuHF человека. Ферритин двустворчатого моллюска ScF расположен рядом с HdF1a/b. Для филогенетического анализа использовали 131 последовательность при сохранении представителей всех основных классов, поскольку большинство аннотированных последовательностей ферритина принадлежит к одному классу Insecta (58% от всего набора данных).

Филогенетическое дерево, построенное с выбранным подмножеством 131 ферритина беспозвоночных с ферритинами человека, используемыми в качестве внешней группы, показывает, что последовательности имеют тенденцию группироваться не только по соответствующей таксономии, но также часто по определенным классам ферритина (рисунок 3.2).

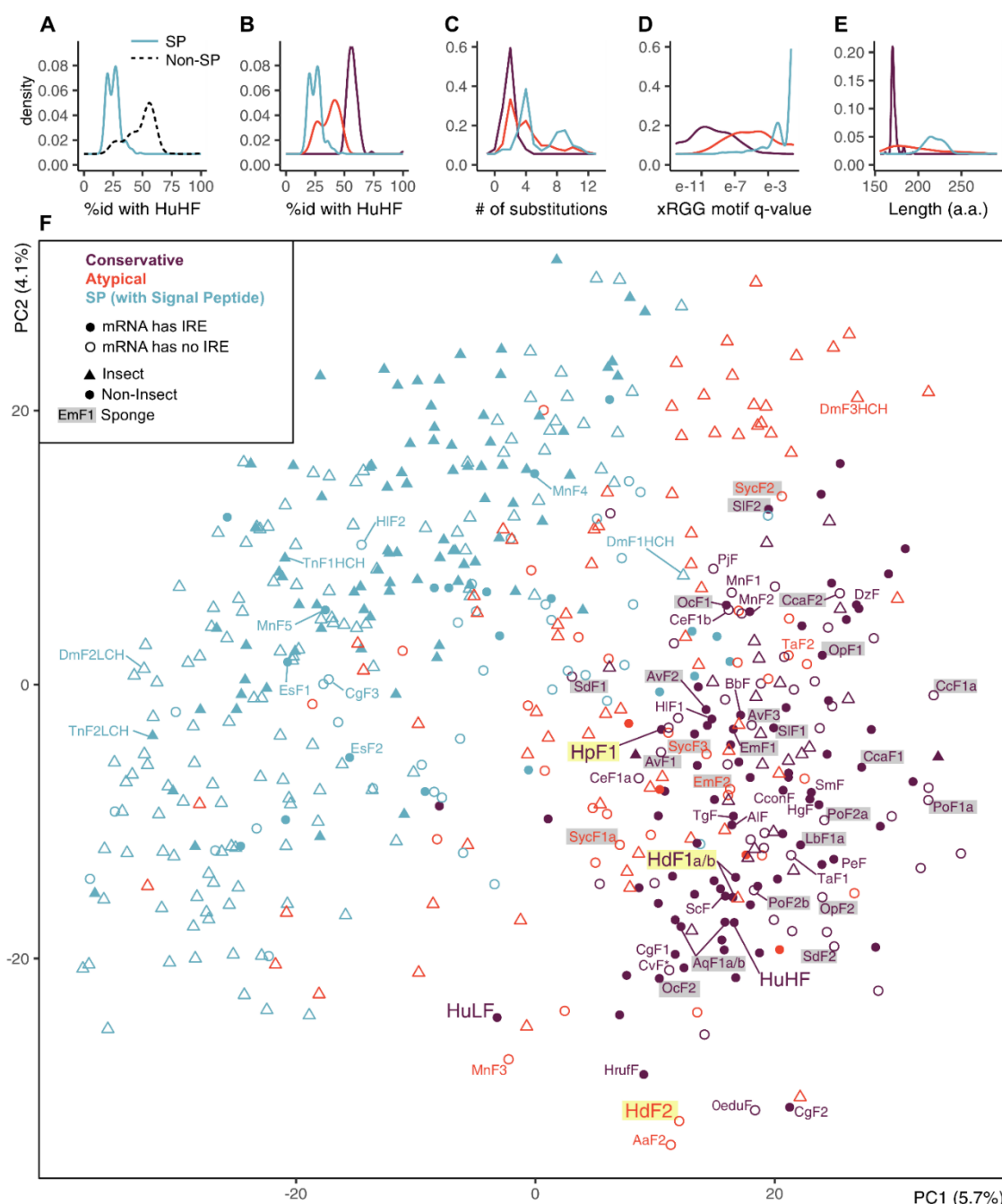


Рисунок 3.1 - Анализ главных компонент (PCA) для набора ферритинов животных с использованием 474 признаков последовательностей, выбранных неконтролируемыми алгоритмами

(A, B) Распределение процентных значений идентичности с HuHF в ферритинах беспозвоночных с SP и без SP и после разделения ферритинов без SP на консервативные и атипичные классы. (C – E) Распределение количества замен в трех функциональных доменах, q-значение мотива xRGG и длины белковых последовательностей в ферритинах трех классов. (F) График PCA 533 проанализированных последовательностей ферритина беспозвоночных и человека, построенный по выбранному подмножеству признаков (474 из 6567 признаков последовательности, объединенных из 100 лучших признаков, выбранных пятью алгоритмами выбора неконтролируемых признаков и показывая предыдущие метки класса. Ферритины морских холодноводных губок выделены серым цветом, ферритины *H. dujardinii* и *H. panicea* - желтым.

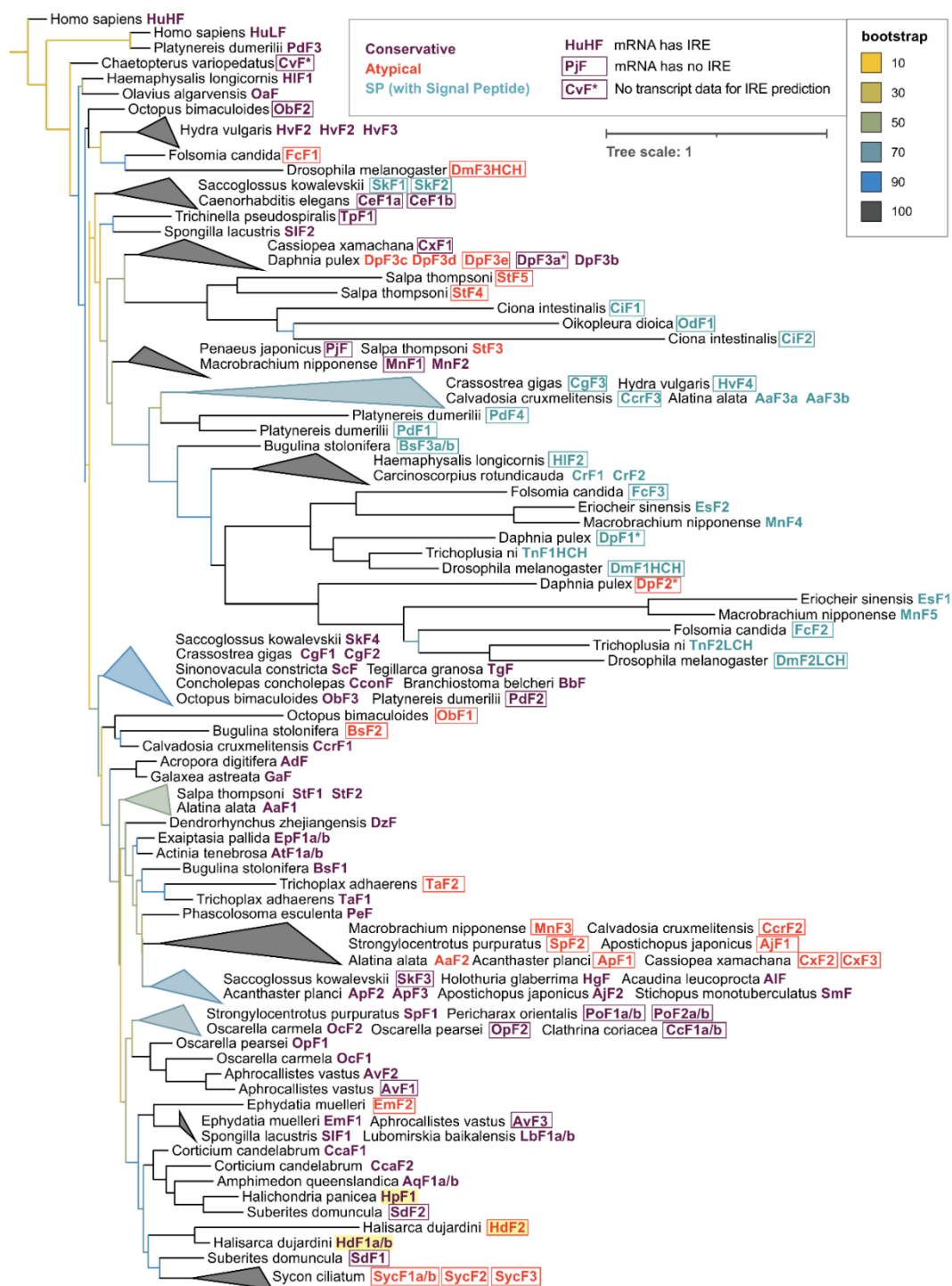


Рисунок 3.2 - Филогенетическое дерево ферритинов беспозвоночных и человека 131 репрезентативных ферритинов из 56 видов 32 классов беспозвоночных вместе с ферритинами человека были сопоставлены с использованием алгоритма clustalo. Данные были обработаны с помощью алгоритма Garrouout с использованием программного обеспечения trimal v. 1.2 для удаления вариабельных концов и областей. сигнального пептида (осталось 132 остатка ядра). Дерево было построено с использованием подхода максимального правдоподобия с 1000 повторных попыток быстрой начальной загрузки с помощью IQ-Tree v. 1.6.12 и визуализировано с помощью сервера iTOL с последовательностями ферритина Homo sapiens, используемыми в качестве внешней группы. Треугольники представляют собой свернутые клады с верхней и нижней точками, показывающими диапазон длин ветвей внутри клады.

Интересными примерами группировки по классу ферритина являются моллюски (включая ScF двустворчатых моллюсков) и консервативные ферритины книдарий, атипичные ферритины из различных типов морских беспозвоночных и большой кластер SP-ферритинов.

Ферритины губок образуют на дереве отдельный кластер, при этом пресноводные виды образуют кластеры вместе. К числу наиболее эволюционно далеких ферритинов губок относятся атипичные HdF2, EmF2, ферритины *Calcarea sponge* S. ciliatum; консервативные HpF1, SdF2 и ферритины губки Hexactinellida A. Astus, AvF1, AvF2 [16].

Гистоновые диацетилазы губок в процессах морфогенеза. Мы изучили экспрессию гистоновых диацетилаз у губки *Halisarca dujardinii* (Demospongia) в процессе диссоциации/реагрегации. На основе анализа транскриптомов губки *H. dujardinii* и генома губки *Amphymedon queenslandica* (Demospongia) были идентифицированы представители всех классов Zn²⁺-зависимых деацетилаз гистонов губок. У губок (на примере *H. dujardinii*, *A. queenslandica* и *Sycon ciliatum*) имеются представители всех классов Zn²⁺-зависимых деацетилаз гистонов (HDACs), характерных для животных [17]. Наибольший уровень экспрессии в теле губки обнаружен у принадлежащей к классу I деацетилазе HDAC1, которая экспрессируется у животных в тканях всех типов и имеет большее значение для выживания клеток и пролиферации, чем HDACs других классов [18]. Именно деацетилазы класса I губок, HDAC1 и 3, имеют наибольшее сходство в аминокислотной последовательности с гомологичными белками человека, что говорит об эволюционной консервативности их структуры и, вероятно, функции. Очевидно, модификация «гистонного кода» за счет активности деацетилаз является ключевым звеном в эпигенетической регуляции функционирования генома [19]. Далее мы использовали модель реагрегации клеток губок для оценки дифференциальной экспрессии деацетилаз гистонов в клетках губок в ходе морфогенеза (рисунок 3.3).

Было обнаружено, что экспрессия деацетилаз разных классов изменяется в ходе реагрегации клеток *H. dujardinii* дифференциально – экспрессия HDAC1 и 6 увеличивается, а экспрессия HDAC3, 8 и 11 уменьшается. Эти результаты позволили сделать предположение о том, что деацетилазы гистонов могут быть вовлечены в регуляцию процесса реагрегации. Для проверки этого предположения были проведены эксперименты по реагрегации с использованием селективных ингибиторов HDACs I класса [17].

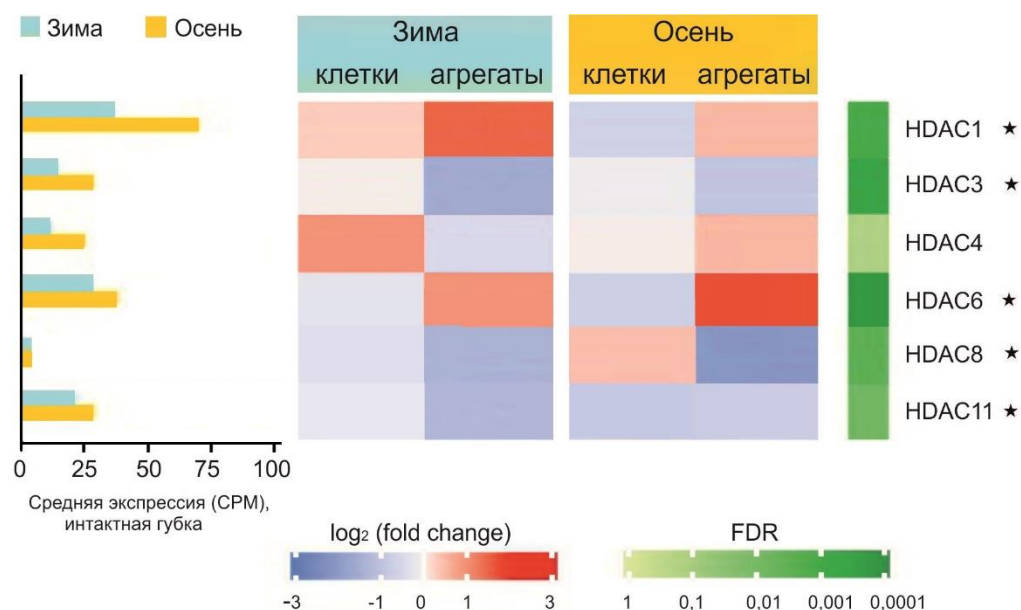


Рисунок 3.3 - Анализ дифференциальной экспрессии гистоновых деацетилаз (HDACs) во время диссоциации и реагрегации губки *H. dujardinii*

Слева показан средний уровень экспрессии в интактных губках для зимних и осенних образцов, рассчитанный в CPM (число прочтений, отнесённых к данному транскрипту, на миллион прочтений) после нормализации методом TMM (усеченное среднее М-значений). На тепловой карте справа показаны логарфмированные уровни изменения экспрессированных клетках и агрегатах по отношению к интактной ткани и скорректированные уровни значимости FDR (false discovery rate, доля ложноположительных результатов). *, FDR < 0.01.

Обнаружено дозозависимое влияние двух селективных ингибиторов HDAC класса I (бутирата натрия и вальпроевой кислоты) на процесс реагрегации клеток. Добавление селективных ингибиторов HDAC класса I в инкубационную среду при реагрегации приводит к изменению морфологических характеристик клеточных агрегатов губки (рисунок 3.4). Можно предположить, что участие гистоновых деацетилаз в регуляции трансдифференцировки клеток является эволюционно древним механизмом, использовавшимся многоклеточными животными ещё до становления тканевой организации [17].

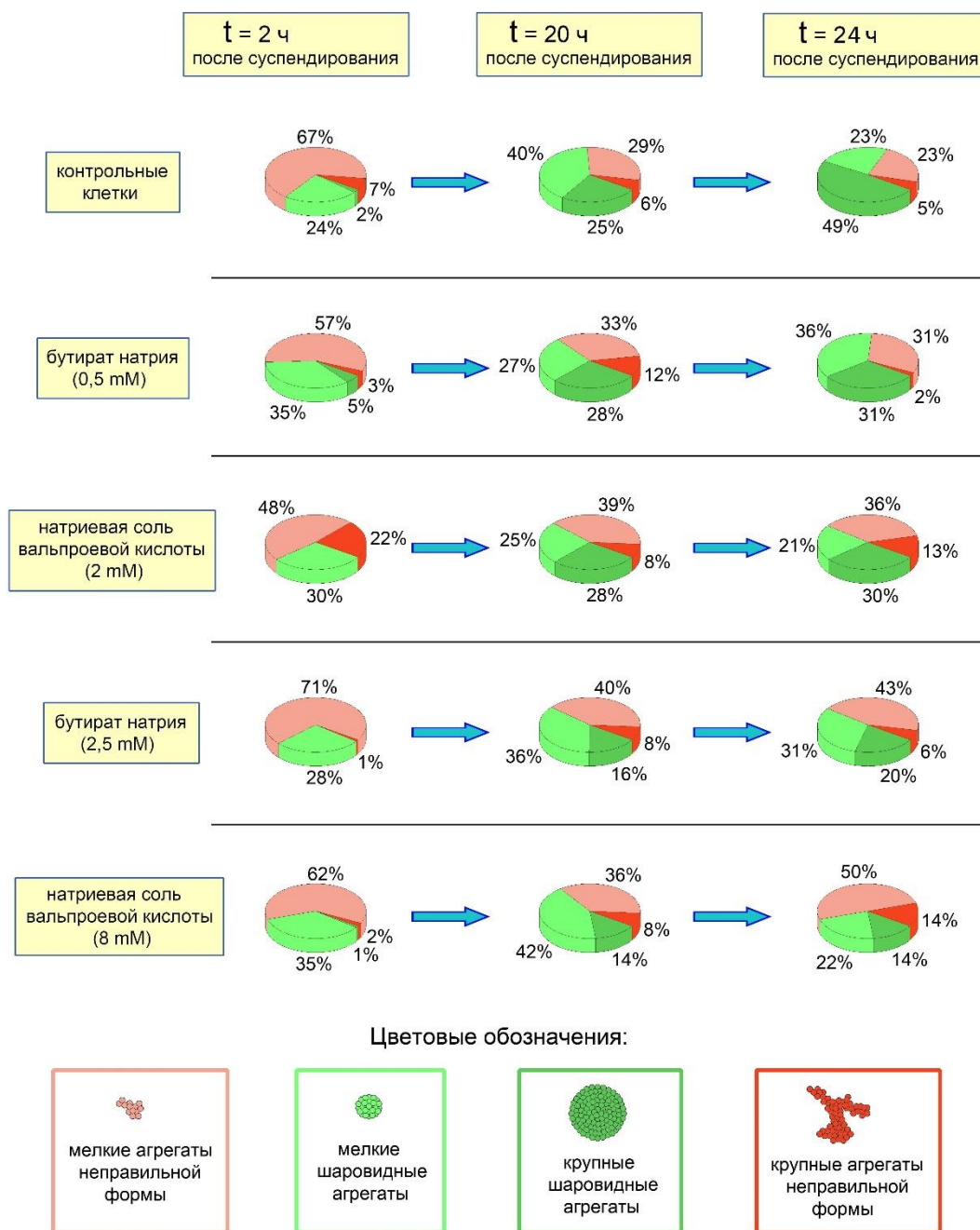


Рисунок 3.4 - Образование клеточных агрегатов губки в присутствии ингибиторов HDACs

Регуляция протеома клеток насекомых при инфекции бакуловирусами. Для изучения поздних стадий вирусной инфекции и процесса формирования полиэдров были получены рекомбинантные вирусы AcMNPV для продукции белков, в которых фрагменты полиэдрина Ph (245 aa, 28,6 кДа) слиты в единой рамке трансляции на N-конце зеленого флуоресцентного белка (GFP). Роль ключевых факторов поддержания клеточного протеостаза, шаперонов семейства HSP/HSC70 и сегрегазы VCP/p97, в синтезе и процессинге рекомбинантных белков изучали с помощью специфических ингибиторов, VER-155008 и NMS-873 соответственно. Опыты с рекомбинантным вирусом vPh(1-110)-

GFP, который кодирует химерный белок с N-концевым фрагментом полиэдрина (1-110 аа) слитым с GFP, показали высокую чувствительность синтеза белка на поздних стадиях инфекционного цикла к ингибиторам шаперонов HSP/HSC70 и сегрегазы VCP/p97. Специфический ингибитор активности шаперонов VER-155008 в концентрации 10 мкМ, добавленный к инфицированным клеткам на 48 ч после инфицирования, эффективно уменьшал количество рекомбинантного белка на стадиях 72 и 96 ч после инфицирования (рисунок 3.5). При добавлении 20 мкМ VER-155008 ингибирование на стадиях 72 и 96 ч после инфицирования было практически полным.

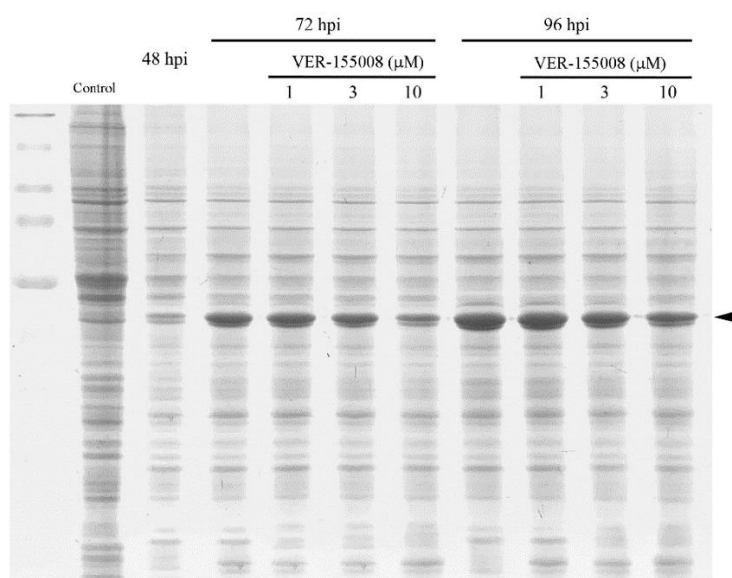


Рисунок 3.5 - Влияние VER-155008 на синтез рекомбинантного белка Ph(1–110)-GFP. Ингибитор в указанной концентрации добавляли к клеткам Sf9 через 48 ч после инфицирования вирусом vPh(1-110)-GFP. Клетки собирали на 72 и 96 ч после инфицирования (hpi) и анализировали электрофорезом SDS-10%PAGE с последующей окраской Кумасси.

Синтез рекомбинантного белка показал исключительно высокую чувствительность к NMS-873, специфическому ингибитору сегрегазы VCP/p97. Добавленный на стадии 48 ч после инфицирования NMS-873 существенно подавлял синтез белка Ph(1–110)-GFP к 72 и 96 ч уже в концентрации 0,1 мкМ и почти полностью ингибировал синтез в концентрации 0,2 мкМ (рисунок 3.6). На ранних стадиях инфекционного цикла ингибитор оказывал менее выраженный эффект и частичное подавление репликации вируса наблюдалось при 3 мкМ NMS-873 [12].

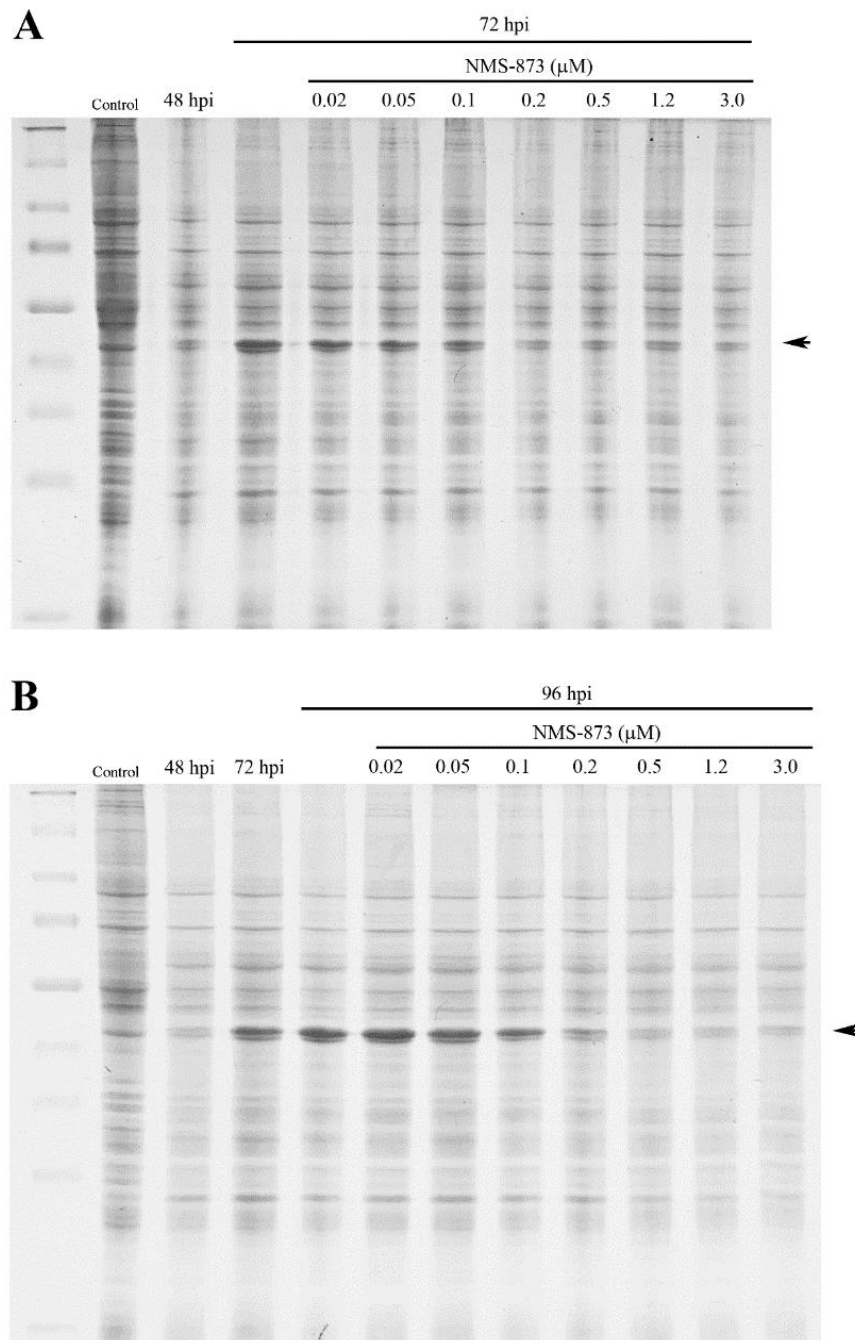


Рисунок 3.6 - Влияние NMS-873 на синтез рекомбинантного белка Ph(1–110)-GFP. Ингибитор в указанной концентрации добавляли к клеткам Sf9 через 48 ч после инфицирования вирусом vPh(1-110)-GFP. Клетки собирали на 72 (**A**) и 96 ч (**B**) после инфицирования (hpi) и анализировали электрофорезом SDS-10%PAGE с последующей окраской Кумасси.

Из скрининга ингибиторов основных систем контроля протеома в клетках Sf9 можно сделать вывод о том, что шапероны HSP/HSC70 и сегрегаза VCP/p97 играют важную роль в синтезе белка и регуляции протеома на поздних стадиях инфекционного цикла бакуловирусов. Проведенные опыты позволили найти рабочие концентрации ингибиторов, вызывающие умеренное подавление синтеза белка для последующего

анализа процесса сборки полиэдров в условиях селективного подавления активности систем контроля протеома. Анализ субклеточной локализации рекомбинантных белков с помощью конфокальной микроскопии показал, что белок Ph(1–110)-GFP уже на стадиях 48 и 72 ч после инфицирования формирует в инфицированных клетках высокомолекулярные агрегаты (рисунок 3.7).

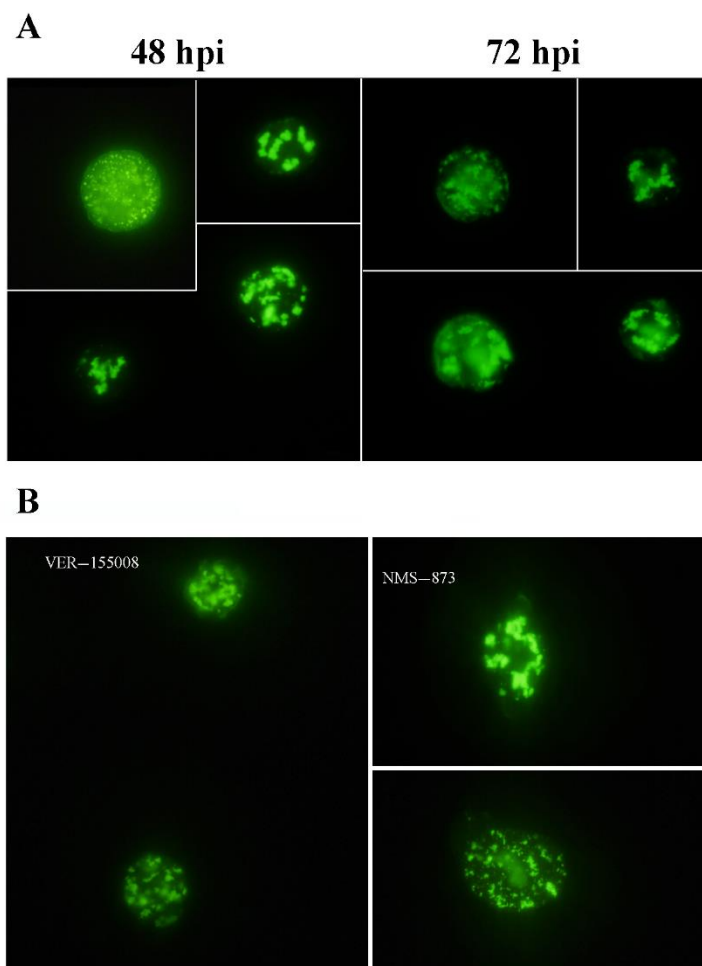


Рисунок 3.7 - Флуоресценция клеток Sf9 на стадии 48 и 72 ч (А) и 72 ч (В) после инфицирования (hpi) рекомбинантным вирусом vPh(1–110)-GFP. Ингибиторы добавляли на 48 ч в концентрациях 10 мкМ VER-155008 и 3 мкМ NMS-873. Фотографии получены на флуоресцентном микроскопе Leica DRM.

При этом ни один из изучаемых ингибиторов не оказывает видимого эффекта на формирование агрегатов. Для белка Ph(58–110)-GFP наблюдается как диффузное распределение, так и формирование агрегатов, тогда как для белка GFP характерно диффузное распределение в клетке (данные не приведены). Эти опыты подтвердили высокую агрегационную способность белка Ph(1–110)-GFP и предполагают существенно менее выраженную способность к агрегации белка Ph(58–110)-GFP. Ингибиторы

основных систем контроля протеома не предотвращают формирование агрегатов, что согласуется с предложенным ранее механизмом самосборки полиэдров.

3.4 Заключение

Проведенный нами транскриптомный анализ клеток губок в процессах диссоциации/реагрегации показал, что ферритины и биохимические пути метаболизма железа высших позвоночных имеют древнее происхождение и играют важную роль в морфогенезе эволюционно древних беспозвоночных. Помимо консервативных ферритинов у губок обнаружены атипичные ферритины, функция которых в обмене ионов железа остается неизвестной и требует дальнейшего изучения. Деацетилазы гистонов участвуют в регуляции трансдифференцировки клеток в ходе морфогенетических процессов у губок. Факторы контроля протеома, шапероны HSP/HSC70 и сепрегаза VCP/p97, необходимы для синтеза рекомбинантных белков на поздних стадиях инфекционного цикла бакуловирусов, но не влияют на формирование полиэдров.

3.5 Список использованных источников

- 1 Chen P., De Meulenaere E., Deheyn D.D., Bandaru P.R. Iron Redox Pathway Revealed in Ferritin via Electron Transfer Analysis//Sci. Rep. – 2020. -Vol. 10:e4033. DOI: 10.1038/s41598-020-60640-z.
- 2 Yévenes A. The Ferritin Superfamily// In Macromolecular Protein Complexes; Harris, J.R., Marles-Wright, J., Eds.; Subcellular Biochemistry; Springer International Publishing: Cham, Germany, 2017. - Vol. 83. – P. 75–102. ISBN 978-3-319-46501-2.
- 3 Zarjou A., Black L.M., McCullough K.R., Hull T.D., Esman S.K., Boddu R., Varambally S., Chandrashekar D.S., Feng W., Arosio P., et al. Ferritin Light Chain Confers Protection Against Sepsis-Induced Inflammation and Organ Injury//Front. Immunol. – 2019. - Vol. 10: e131. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00131
- 4 Fuhrmann D.C., Mondorf A., Beifuß J., Jung M., Brüne B. Hypoxia Inhibits Ferritinophagy, Increases Mitochondrial Ferritin, and Protects from Ferroptosis//Redox Biol. – 2020. -Vol. 36: e101670. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101670.
- 5 Hsu C.-Y., Chan Y.-P. Identification and Localization of Proteins Associated with Biomineralization in the Iron Deposition Vesicles of Honeybees (*Apis Mellifera*)//PLoS ONE - 2011, -Vol. 6: e19088. DOI: org/10.1371/journal.pone.0019088.
- 6 De Meulenaere E., Bailey J.B., Tezcan F.A., Deheyn D.D. First Biochemical and Crystallographic Characterization of a Fast-Performing Ferritin from a Marine Invertebrate//Biochem. J. – 2017. -Vol. 474. -P. 4193–4206. DOI: 10.1042/BCJ20170681.

7 Rawat R., Deheyn D.D. Evidence That Ferritin Is Associated with Light Production in the Mucus of the Marine Worm *Chaetopterus*//Sci. Rep. – 2016. -Vol. 6: e36854. DOI: 10.1038/srep36854.

8 Su C., Ming T., Wu, Y., Jiang Q., Huan H., Lu C., Zhou J., Li Y., Song H., Su X. Crystallographic Characterization of Ferritin from *Sinonovacula Constricta*//Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2020. -Vol. 524. -P. 217–223. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.01.069.

9 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.

10 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.

11 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.

12 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.

13 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. 644652. doi: 10.1038/nbt.1883.

14 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.

15 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.

16 Adameyko K.I., Burakov A.V., Finoshin A.D., Mikhailov K.V., Kravchuk O.I., Kozlova O.S., Gornostaev N.G., Cherkasov A.V., Erokhov P.A., Indeykina M.I., Bugrova A.E., Kononikhin A.S., Moiseenko A.V., Sokolova O.S., Bonchuk A.N., Zhegalova I.V., Georgiev

A.A., Mikhailov V.S., Gogoleva N.E., Gazizova G.R., Shagimardanova E.I., Gusev O.A., Lyupina Yu.V. Conservative and Atypical Ferritins of Sponges//International Journal of Molecular Sciences. - 2021. - Vol. 22. Is. 16. Art no. 8635. DOI: 10.3390/ijms22168635.

17 Кравчук О.И., Бураков А.В., Горностаев Н.Г., Михайлов К.В., Адамейко К.И., Финошин А.Д., Георгиев А.А., Михайлов В.С., Ерюкова Ю.Э., Рубиновский Г.А., Заиц Д.В., Газизова Г.Р., Гусев О.А., Шагимарданова Е.И., Люпина Ю.В. Деацетилазы гистонов в процессе реагрегации клеток губки *Halisarca dujardini*//Онтотенез. 2021. Т. 52. № 5. С. 367-383. DOI: 10.31857/S0475145021050050.

18 Marks P.A. The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs//Expert Opinion on Investigational Drugs - 2010. -Vol. 19. -P. 1049–1066. DOI: 10.1517/13543784.2010.510514.

19 Wang Z., Zang C., Rosenfeld J.A., et al. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome//Nat Genet. - 2008. -Vol. 40. - P. 897–903. DOI: 10.1038/ng.154.

РАЗДЕЛ 4 МЕХАНИЗМЫ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ВЫБОРА И РАЗВИТИЯ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

4.1 Введение

Исследования по разделу 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.

Сенсорное обеспечение поведения имеет существенное значение как в механизмах запуска адекватных поведенческих программ, так и при формировании функционального состояния нервной системы. В силу этого, в рамках настоящего раздела программы проводится исследование механизмов анализа слуховой информации у комаров, для которых этот канал является ключевым для запуска и реализации сложного комплекса полового поведения. Комары слышат своими антеннами - парой перьевидных придатков на голове. Колебания антенн, вызванные звуком передаются к многим тысячам высокочувствительных сенсорных клеток органа Джонстона [2, 3]. Слух комаров связан с брачным поведением, а также предположительно участвует в избегании хищников [4] и поиске хозяина у кровососущих самок [5]. Недавнее исследование показывает, что самки комаров *Aedes* слышат и могут быть привлечены звуковыми частотами из диапазона человеческой речи [6].

Использование стеклянных микроэлектродов для регистрации сигналов от слуховых интернейронов [7], а затем от аксонов сенсорных клеток джонстонова органа (Ю) [8, 9], позволило выявить разнообразие индивидуальных частот настройки рецепторов Ю. Эта техника записи, дополненная методом акустической стимуляции с положительной обратной связью, позволила выявить несколько различных групп сенсорных клеток, в диапазоне от 85 до 490 Гц и описать их индивидуальные частоты

настройки [9]. Оказалось, что частоты рецепторных клеток имеют большой диапазон значений и различаются у самцов и самок.

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

Объекты. В серии экспериментов с модуляцией сенсорной системы был выбран *Aedes communis* De Geer как наиболее распространенный вид комаров в европейской части России. Этот вид имеет один гонотрофный цикл в год и образует большие рои на открытом воздухе (100–300 особей на рой).

Молекулярно-генетические исследования производились на голожаберных моллюсках.

Рассматривались особенности эмбриогенеза медоносной пчелы *Apis mellifera* L как перспективного объекта биологии развития.

Анализ поведения роящихся комаров. Акустические исследования естественных скоплений комаров требовали низких уровней антропогенный шум, которого легче было добиться в малонаселенной местности.

Реакции роящихся комаров-самцов на акустическую стимуляцию были изучены в дикой природе с использованием двух независимых установок, расположенные на расстоянии не менее 100 м друг от друга.

Каждый акустический стимул представлял собой тональный импульс длительностью 1 с с плавным нарастанием и спадом (по 0,1 с). Серия импульсов с переменной амплитудой и частотой (90–1000 Гц) излучалась каждые 4–5 с. Шаг частоты был на 10 Гц ниже 600 Гц.

Источниками звуковой стимуляции служили самодельные портативные колонки (динамик MJ420, Mystery; усилитель мощности на базе микросхемы TDA2005R, STMicroelectronics). Сигналы либо синхронизировались в реальном времени с помощью ноутбука, либо предварительно синтезировались и воспроизводились с медиа плеера iRiver S100.

Для видеотрекинга использовалось видео в реальном времени. Основной массив поведенческих данных составляла оценка слухового порога, для чего рой записывается с помощью видеокамеры, установленной на одном штативе с громкоговорителем. Для записи использовался либо Panasonic NV-G5500 со скоростью 50 кадров в секунду (чересстрочная), либо TheImagingSource DMC 23UV024 с объективом Computar

Записанные видео были деинтерлейсированы (только для камеры Panasonic), инвертированы, с поправкой на яркость и контраст в VirtualDUB 1.10.4, а затем проанализированы в FIJI [10]. с использованием специального скрипта . Плагин TrackMate в FIJI [11] использовался для отслеживания летающих комаров (рисунок 4.1 В).

Электрофизиология. Электрофизиологические эксперименты проводились на комарах-самцах *Aedes communis* De Geer. Для проведения измерений на месте слуховых порогов нейронов использовали переносную электрофизиологическую лабораторию. Оборудование было смонтировано на виброизолированной платформе.

Комара приклеивали на покрытую медью пластину размером 10×5 мм. С применением токопроводящего клея из мучной пасты с добавлением 0,15 М хлорида натрия. Комар располагался таким образом, чтобы акустические волны вызывали дорсо-вентральную деформацию жгутика антенны. Звуковые стимулы подавались через пару динамиков Visaton WS 13 BF. Чтобы имитировать вибрацию, сопровождающую полет комара, подавался сигнал соответствующий частоте полета. Вторым стимулом, исходящим от тех же двух динамиков, был непрерывный тон, частота и амплитуда которого варьировалась во время пороговых измерений. Сигналы стимуляции были произведены с помощью ноутбука и программного обеспечения SineGen (E-Cat).

Записи с нерва усика были сделаны боросиликатными стеклянными микроэлектродами (1B100F-4, WPI Inc.), заполненными 0,15 М хлористым натрием. После прокола мягкого слоя кутикулы у основания капсулы Ю сопротивление составляло микроэлектрода составляло 5–20 МОм. Ответы нейронов усиливались самодельным усилителем переменного тока (входное сопротивление 5 ГОм, полоса пропускания 50–5000 Гц) и записывались с помощью портативного двухканального цифрового записывающего устройства ZOOM H1n.

В экспериментах на сенсорной системе комаров применялся разработанный нами уникальный метод акустической стимуляции (рисунок 4.2) с положительной обратной связью, который позволяет зарегистрировать ответы отдельных сенсорных нейронов [8, 9].

Результаты измерений представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение (s.d.).

4.3 Результаты и обсуждение

*Нейронные механизмы настройки частоты восприятия акустических сигналов роящихся комаров-самцов (*Aedes communis*, Culicidae).* В проведенном исследовании получены данные о слуховых порогах в широком диапазоне звуковых частот (рисунок

4.1).

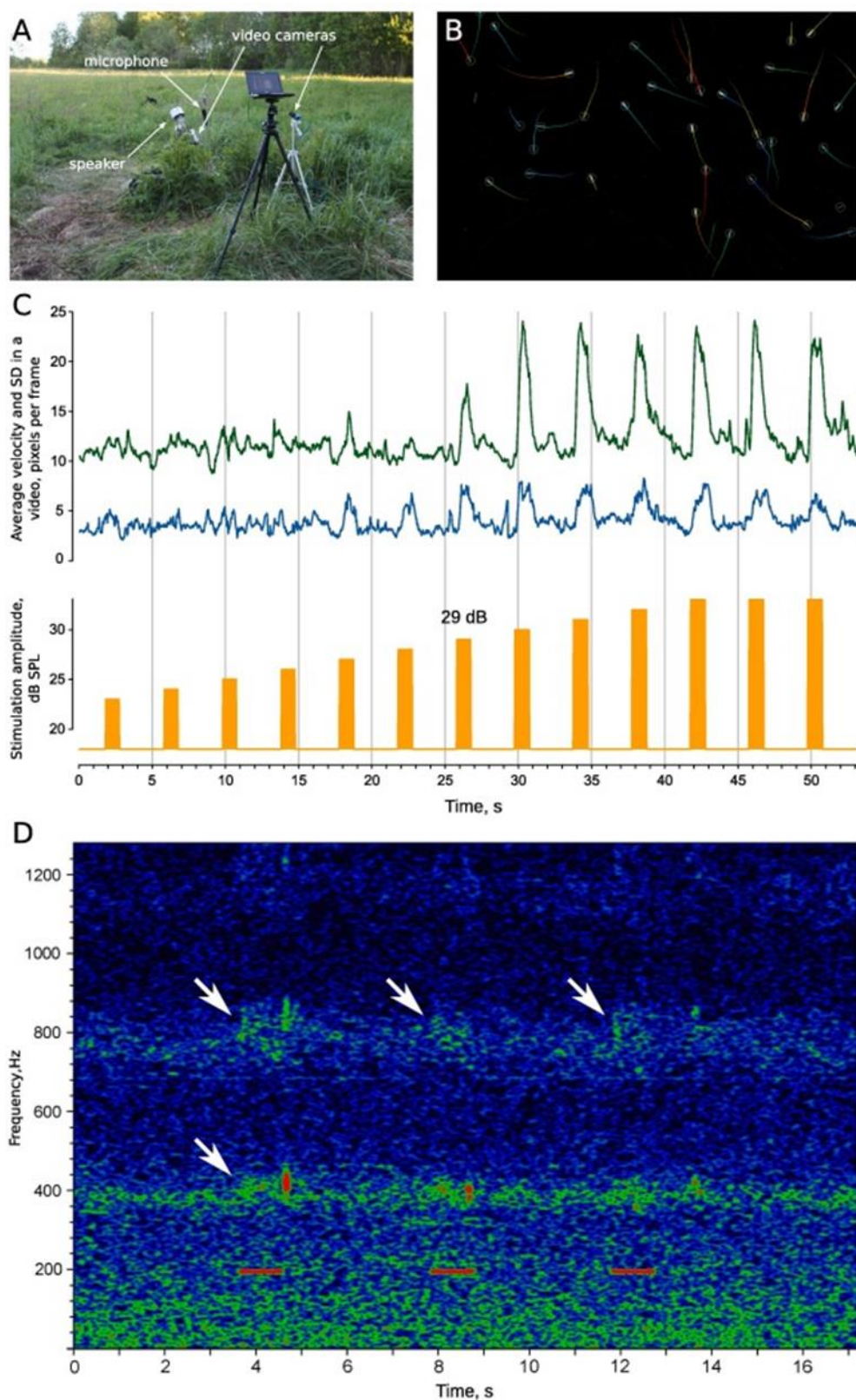


Рисунок 4.1 - Акустическая стимуляция вызывает увеличение средней скорости полета и тон, вызываемый полетом роящихся комаров *Aedes*

А. Фотография полевой установки. Динамик направлен на рой комаров на высоте около 2 м от земли. Рой записывается видеокамерой (или двумя камерами одновременно) на фоне яркого неба. Сигналы стимуляции подаются каждые 4-5 с, их амплитуда и частота

управляется с ноутбука или портативного носителя. Немедленная оценка слухового пороговые значения выполняется визуально экспериментатором, а затем контролируется путем анализа видеозаписи.

Б. Один видеокادر, показывающий результаты автоматического отслеживания летающих комаров. В исходном видео темные комары против яркое небо. Изображение перевернуто, медленные изменения вроде движущихся на заднем плане облаков удаляется с помощью специальных скриптов. Каждый комар на кадре обозначен кружком, цветная дорожка сзади соответствует индивидуальной средней скорости (от синего до красного).

С. Стимуляция тонами (180 Гц) возрастающей амплитуды. Зеленый след - средняя скорость в каждом кадре видео. Синий след - стандартное отклонение индивидуальные скорости. При уровне звукового давления 29 дБ отчетливо выраженный ответ появляется в смене средняя скорость, но это видно даже на более низкие уровни стимуляции за счет увеличения дисперсия индивидуальных скоростей.

Д. Сонограмма акустического отклика роя до сверхпороговой стимуляции на 200 Гц. Стрелки указывают смещение тонов полета в рое к более высоким частотам (сдвиг лучше виден на гармонике полетный тон, около 800 Гц). Цвет представляет уровень спектральных составляющих, от синего к красному. Горизонтальные красные полосы показывают импульсы стимуляции 200 Гц, излучаемые с 3 с интервалы. Вертикальные красные полосы на ок. 400 Гц возле концов импульсов стимуляции соответствуют к полетам отдельных комаров привлекает стимуляция ближе к динамик и микрофон.

Параллельно измеряли электрофизиологически слуховую чувствительность самцов комаров, взятых из той же стаи (рисунок 4.2).

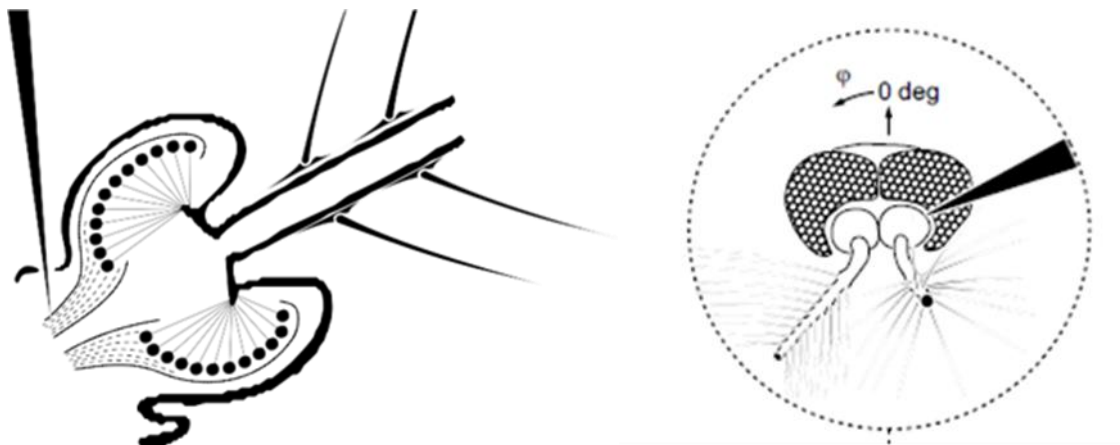


Рисунок 4.2 – Экспериментальная процедура

Голова комара фиксировалась, электрофизиологическая регистрация производилась через отверстие в основании антенны, сигнал от нерва усиливался, оцифровывался и анализировался. Были обнаружены сенсорные элементы высокой акустической чувствительности; В среднем 26 дБ SPL в диапазоне частот 180–220 Гц (температура окружающей среды 12°C) (рисунок 4.3). Кроме того, ответы были обнаружены в

высокочастотном диапазоне 500–700 Гц (так называемый «зеркальный канал») (рисунок 4.3).

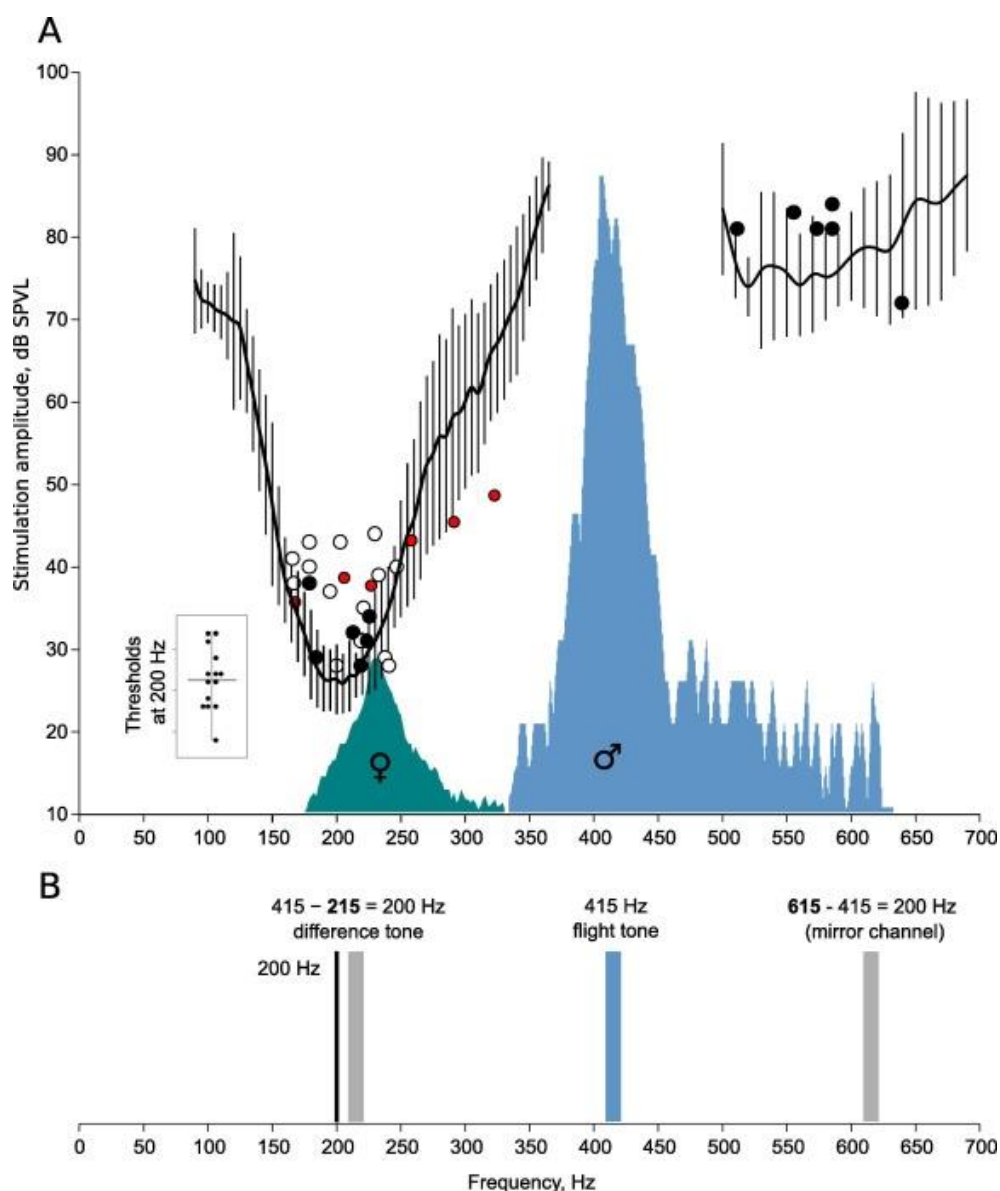


Рисунок 4.3 - Частотно-пороговые данные из поведенческих и электрофизиологических экспериментов

А. Кривая показывает среднее значение $\pm$ стандартное отклонение для поведенческих данные по всем экспериментам ($n = 14$ ниже 400 Гц и $n = 10$ выше 500 Гц), с поправкой на температуру (12 °C). Врезка в нижнем левом углу показывает распределение индивидуальных пороговых значений при 200 Гц. Черные и пустые кружки показывают минимальные пороги из электрофизиологических экспериментов, с имитацией полета и без, соответственно; красные кружки показывают пороги узкополосных сенсорных элементов для той же температуры. Пороги узкополосных сенсорных элементов примерно на 10 дБ выше в сравнии как с поведенческими измерениями, так и нижними порогами, измеренными у нейронов Ю. На частотах 165–240 Гц наблюдается основной диапазон акустической чувствительности. От 350 до 500 Гц мы не смогли найти никаких поведенческих реакций до уровня 90 дБ SPL. Типичный спектр звука роя показан синим цветом, а пример спектра женского летного звука показан зеленым цветом.

Б. Иллюстрация эффекта «зеркального канала». Если главное окно чувствительности Ю с

центром на 200 Гц, а тон крыльев при 415 Гц, то прогнозируемый "зеркальный канал" будет около 615 Гц.

Таким образом были зарегистрированы два типа слуховых единиц: более чувствительные широкополосные нейроны и менее чувствительные единицы с отчетливыми узкими (добротность $Q_b = 7,4$) частотными настройками в диапазоне 180–350 Гц. Сопоставляя поведенческие и электрофизиологические данные можно предложить объяснение, что первые - обеспечивают обнаружение сигнала, в то время как последние используются для частотной идентификации, чтобы сделать правильный поведенческий выбор [12].

Молекулярно-генетические и онтогенетические исследования голожаберных моллюсков. В 2021 г. продолжались исследования, посвященные отбору модельных объектов, удобных для экспериментального анализа клеточных механизмов перестроек поведения и сравнительных онтогенетических исследований [13]. Сравнительное исследование клеточных механизмов организации поведения на родственных группах животных 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. Так были на целом ряде голожаберных моллюсков были обнаружены и описаны гомологичные нейроны, которые у *Tritonia diomedea* обеспечивают видоспецифическое плавательное поведение, а в нервной системе животных, не имеющих такого поведения, выполняют иные функции [14].

Polycera quadrilineata - крупный голожаберный моллюск, один из наиболее массовых моллюсков, широко распространенных в европейских морях. Наряду с нейробиологическими исследованиями других крупных голожаберных моллюсков (*Tritonia*, *Tochuina*, *Dendronotus*, *Coryphella*), центральная нервная система полицерид является объектом для изучения эволюционных аспектов нейронального контроля поведения [14 -16]. Развитие молекулярно-генетических методов дало возможность более точно атрибутировать эти модельные объекты, уже несколько десятилетий используемые для экспериментального анализа нейрохимических механизмов регуляции поведения и сравнительных онтогенетических исследований. Недавние работы показали, что широко используемые модельные объекты - голожаберные моллюски *Tritonia*, являются комплексом трех разных видов [17]. Другой модельный объект *D. frondosus* представляет комплекс из, минимум, семи видов, некоторые из которых только недавно описаны, как новые для науки виды [18].

На основе большого набора данных молекулярно-филогенетической и морфологической информации по голожаберным моллюскам рода *Polycera* в комплексе “*Polycera quadrilineata*” идентифицированы четыре отдельных вида (рисунок 4.4), в том числе один новый для науки вид *Polycera kernowensis* sp. nov.

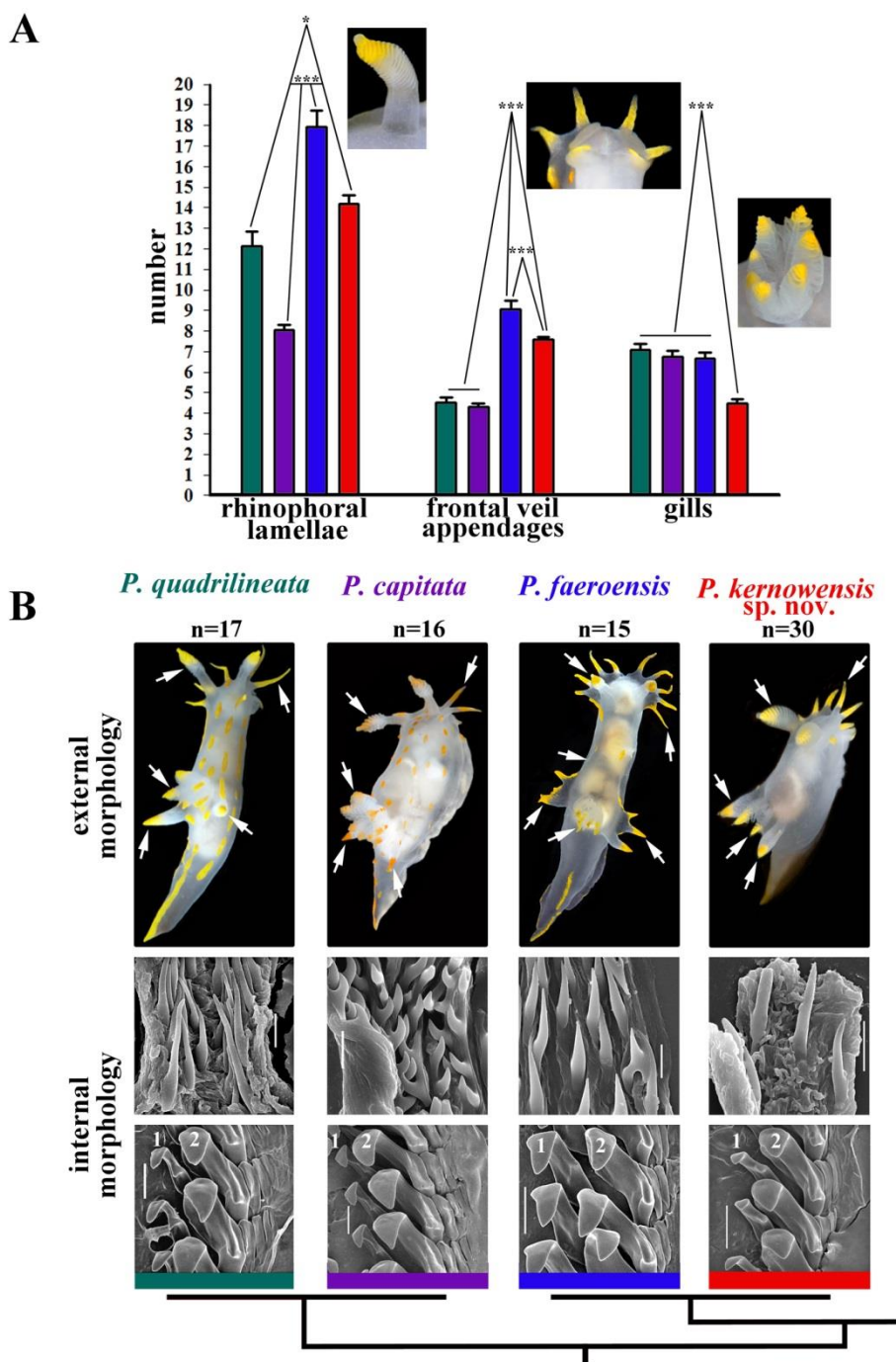


Рисунок 4.4 - Анализ четырех видов рода *Polycera* на основе комплекса внешних и внутренних морфологических признаков и молекулярно-филогенетических данных

Отсутствие тщательного таксономического анализа недавно привело к значительным ошибкам в оценке видовой принадлежности таксонов этого комплекса.

Основные выводы исследования заключаются в том, что разделение биологического разнообразия на «криптическое» и «не криптическое» контрпродуктивно. Предлагается, что центральный биологический феномен вида может быть универсально обозначен, как многоуровневое разнообразие организмов. Дается практический набор методов для подобных исследований, позволяющий эффективно различать нейробиологические модельные объекты [19].

Особенности эмбриологии медоносной пчелы Apis mellifera L. Биология развития медоносных пчел изучается уже более 150 лет и накоплено множество данных об эмбриогенезе *Apis mellifera* L., но в современной эмбриологии насекомых пчелы как объект исследования используются очень мало. Пока еще ограничена информация о развитии эмбрионов медоносных пчел на молекулярном и клеточном уровне. Помимо значения пчел как опылителей и продуцентов биологически активных веществ, представляет большой интерес участие социальных отношений в контроле за ходом индивидуального развития этих перепончатокрылых. Онтогенез одного из самых известных перепончатокрылых насекомых – *Apis mellifera* L. обладает рядом особенностей, придающих, медоносной пчеле уникальность как объекту биологии развития. Важнейший фактор биологии медоносной пчелы - это ее существование как общественного насекомого в структурированной колонии-семье. Социальные взаимодействия регулируют структуру колонии пчел. В основе колонии *Apis mellifera* L. находится пчелиная матка – в норме единственная яйцекладущая особь, которая откладывает от нескольких до 3000 яиц в сутки в период с февраля по октябрь [20]. Яйцекладущая матка не способна ни собирать пищу, ни кормить личинок, ни устраивать жилище. Все эти функции в семье выполняют рабочие пчелы. При этом, биологический цикл колонии во многом определяется циклом жизни пчелиной матки.

Геном медоносной пчелы полностью секвенирован и опубликован в 2006 году (The Honey Bee Genome Sequencing, 2006 г.). Эти данные стимулируют исследования эпигенетических механизмов регуляции индивидуального развития пчел, а также формирования поведенческих программ, специфичных для пчелиных каст. Личиночная стадия развития пчелы особенно популярна в качестве модели эпигенетических перестроек [19], однако исследования зародышевого развития – эмбриогенеза медоносной пчелы на молекулярном и генетическом уровне пока еще немногочисленны и неполны.

Если на личиночной стадии онтогенеза пчелы важнейший механизм управления направлением развития – это специфическое питание личинки, которое используют рабочие пчелы, то на эмбриональной стадии важный фактор социального контроля – выбраковка, элиминация яйца посредством его поедания. Этот механизм носит название

оофагии и является одним из проявлений каннибализма в колониях социальных видов насекомых [21].

Медоносная пчела как объект эмбриологии имеет множество преимуществ перед другими модельными организмами: возможность получения большого количества яиц, простота инкубирования. Значительное влияние на эмбриологию медоносных пчел оказывает их социальное поведение – поддержание постоянной температуры и влажности, ревизия яиц и оофагия, регуляция яйцекладки матки и размера яиц. Это существенно отличает эмбриологию пчел от других насекомых [22]. Изучение эмбриогенеза отдельных видов насекомых важно для понимания их эволюции, в том числе эволюции социальности. В обзоре приведены сведения об особенностях эмбрионального развития медоносной пчелы *Apis mellifera* L, факторах, влияющих на эмбриогенез, в особенности, связанных с социальными взаимодействиями.

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.

В 2021 году продолжались ранее начатые 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].

В 2021 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.

4.5 Список использованных источников

- 1 Дьяконова В.Е., Сахаров Д.А. Пострефлекторная нейробиология поведения. Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. – М.: Издательский дом ЯСК, 2019, – 589 с. – (Разумное поведение и язык). Послесловие проф. А.Г. Асмолова. – ISBN 978-5 907117-52-5.
- 2 Trischner H., Schieff A. Fluggerausch " und Schallwahrnehmung bei *Aedes aegypti* L. (Culicidae)// Zool. Anz. - 1955. - Vol. 18. - P. 453–460.
- 3 Gopfert M.C., Robert D. Nanometre-range acoustic sensitivity in male and female mosquitoes//Proc. Biol. Sci. – 2000. - Vol. 267. – P. 453–457.
- 4 Lapshin D.N., Vorontsov D.D. Low-frequency sounds repel male mosquitoes *Aedes diaantaeus* N.D.K. (Diptera, Culicidae)//Entomol. Rev. - 2018. - Vol. 98. – P. 266–271.
- 5 Borkent A., Belton P. Attraction of female *Uranotaenia lowii* (Diptera: Culicidae) to frog calls in Costa Rica//Can. Entomol. - 2006. - Vol. 138. – P. 91–94.
- 6 Menda G., Nitzany E.I., Shamble P.S., Wells A., Harrington L.C., Miles R.N., Hoy R. R. The long and short of hearing in the mosquito *Aedes aegypti*//Curr. Biol. - 2019. - Vol. 29. - P. 709–714.e4.
- 7 Lapshin D.N. Frequency threshold curves of auditory interneurons of male mosquitoes *Culex pipiens pipiens* L. (Diptera, Culicidae)//Dokl. Biol. Sci. Proc. Acad. Sci. USSR Biol. Sci. Sect. Transl. Russ. - 2011. - Vol. 439. – P. 191–193.
- 8 Lapshin D.N. The auditory system of blood-sucking mosquito females (Diptera, Culicidae): Acoustic perception during flight simulation//Entomol. Rev. - 2013. - Vol. 93. – P. 135–149.
- 9 Lapshin D.N., Vorontsov D.D. Frequency organization of the Johnston's organ in male mosquitoes (Diptera, Culicidae)//J. Exp. Biol. - 2017. - Vol. 220, - P. 3927–3938.
- 10 Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.-Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis//Nat. Methods.- 2012. - Vol. 9. – P. 676–682.

- 11 Tinevez J.-Y., Perry N., Schindelin J., Hoopes G.M., Reynolds G.D., Laplantine E., Bednarek S.Y., Shorte S.L., Eliceiri K.W. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking//Methods Image Process. Biol. - 2017. - Vol. 115. – P. 80–90.
- 12 Lapshin D.N., Vorontsov D.D. Frequency tuning of swarming male mosquitoes (*Aedes communis*, Culicidae) and its neural mechanisms//Journal of Insect Physiology. 2021. Vol.132. Art. no. 104233. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2021.104233.
- 13 Katz P. S. Neural mechanisms underlying the evolvability of behavior//Phil. Trans. R. Soc. B -2011. - Vol. 366. – P. 2086-2099.
- 14 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.
- 15 Chase R. Behavior and its neural control in gastropod molluscs. Oxford, U.K.:Oxford University Press. - 2002.
- 16 Вепринцев Б.Н., Крастс И.В., Сахаров Д.А. Нервные клетки голожаберного моллюска *Tritonia diomedea* Bergh //Биофизика. - 1964. - Т. 9. - № 3. - С. 327.
- 17 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.
- 18 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.
- 19 Korshunova T.A., Driessen F.M.F., Picton B.E., Martynov A.V. The multilevel organismal diversity approach deciphers difficult to distinguish nudibranch species complex//Scientific Reports. – 2021. - Vol. 11.(1) DOI: 10.1038/s41598-021-94863-5
- 20 Seeley T.D. The Wisdom of the Hive: The Social Physiology of Honey Bee Colonies. – 1995.
- 21 Stark R.E., Hefetz A., Gerling D. et. al. Reproductive competition involving oophagy in the socially nesting bee *Xylocopa sulcatipes* // Naturwissenschaften. - 1990. - Bd 77. - H.1. - S.38-40.
- 22 Богуславский Д.В., Захаров И.С. Роль внешних факторов в эмбриогенезе *Apis mellifera* //Онтогенез. 2021. Т. 52. Т. 6. С. 476-484. DOI: 10.31857/S0475145021060021.

РАЗДЕЛ 5 РЕЦЕПТОРЫ И СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ В КЛЕТКАХ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

5.1 Введение

В 2021 г. в лаборатории продолжались исследования, направленные на выяснение функциональной роли рецепторов и других поверхностных белков эндотелиальных клеток кровеносных сосудов. Многие белки плазмы крови имеют участки связывания на поверхности эндотелия. К их числу относится фактор Виллебранда и белки системы комплемента. Интерес к фактору Виллебранда и комплементу обусловлен их участием в патогенезе многих сердечно-сосудистых, аутоиммунных и других заболеваний. В настоящее время исследования в этой области приобрели особую актуальность, поскольку нарушения обмена фВ и системы комплемента представляют собой одни из главных причин осложнений при коронавирусной инфекции.

Фактор Виллебранда (фВ), ключевой компонент гемостаза, синтезируется в эндотелиальных клетках и мегакариоцитах и высвобождается в кровь в виде высокомолекулярных мультимерных гликопротеинов с массой до 20 миллионов дальтон. Металлопротеаза плазмы крови ADAMTS13 расщепляет сверхкрупные мультимеры фВ до более мелких мультимерных и олигомерных молекул. Угнетение активности ADAMTS13 результате образования аутоантител против этого фермента, снижение производства этого фермента звездчатыми клетками печени и эндотелиальными клетками либо избыточная секреция фВ эндотелием при воспалении приводит к накоплению тромбогенных высокомолекулярных форм фВ. Гипермультимеры фВ присоединяются к поверхности артериол и капилляров и разворачиваются в условиях быстрого кровотока. На развернутой молекуле фВ экспонируются участки, взаимодействующие с рецепторами на мембране тромбоцитов. После связывания с нитями фВ тромбоциты активируются, к ним дополнительно присоединяются циркулирующие в сосудах тромбоциты и в итоге происходит формирование тромбов и закупорка микрососудов. Это приводит к развитию крайне тяжелого состояния, тромботической микроангиопатии, характеризующейся нарушением кровоснабжения органов, что может привести в итоге к полиорганной недостаточности и гибели больного. Тромботическая микроангиопатия является одним из клинических проявлений при COVID-19 [1, 2].

5.2 Материалы и методы исследования

Активность металлопротеазы ADAMTS-13 определяли по гидролизу флуоресцентного субстрата металлопротеиназы пептида FRET-S-VWF73 с помощью планшетного ридера Synergy 4 (BioTec, USA).

Мультимеры фактора Виллебранда разделяли методом электрофореза в 1% агарозе. Для этого плазму крови разводили в 2× буфере для нанесения (50 mmol/L Tris, pH 6.8, 9 mol/L urea, 2% SDS, 10% Glycerol, 0,1% Bromphenol blue). В качестве буфера для разделения использовали TBE (89 mM Tris-Borate, 2mM EDTA, pH 8.3) с 0,1% SDS. Разделенные в агарозе мультимеры переносили на мембрану PVDF в буфере для переноса белков (47,9 mM Tris, 38,6 mM Glycine, 10% Ethanol) с применением камеры X-cell 2 (Invitrogen). После переноса мембрану PVDF инкубировали в 5% растворе сухого молока в буфере PBS. Для окрашивания мультимеров фактора Виллебранда использовали поликлональные кроличьи антитела к фактору Виллебранда человека (A0082, Dako) и козы антитела к иммуноглобулинам кролика, меченые пероксидазой хрена (Bio-Rad). Окрашенные антителами мультимеры проявляли раствором диаминобензидина.

5.3 Результаты и обсуждение

Обмен фВ при тромботических микроангиопатиях. Повышенная активность фВ в плазме крови, вызванная увеличением доли тромбогенных высокомолекулярных мультимеров фВ при нормальном уровне его секреции или общим ростом поступления фВ в плазму, является причиной тромбозов при тромботических микроангиопатиях [3, 4]. Тромботические микроангиопатии (ТМА) включают наследственную (синдром Апшоу-Шульмана) или аутоиммунную формы тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), вторичную ТТП, вызванную раком, инфекциями, трансплантацией, химиотерапией и некоторыми лекарствами, атипичный гемолитико-уремический синдром, вызванный наследственными или приобретенными нарушениями в системе комплемента [5]. При беременности и в послеродовой период встречаются случаи ТМА, ассоциированной с HELLP-синдромом и преэклампсией [6]. При аутоиммунной ТТП активность ADAMTS13 падает ниже 10% от нормального уровня. Снижение вызвано выработкой ингибиторных аутоантител против ADAMTS13. При других формах ТМА уровень активности ADAMTS13 не падает ниже 20% [7]. Мы исследовали мультимерный состав фВ у больной с вторичной ТТП неясной этиологии и у больной аутоиммунной ТТП, развившейся на поздних сроках беременности и после родоразрешения, а также у онкологического больного в терминальной стадии [8]. Данные представлены на рисунке 5.1. Активности ADAMTS13 у больных с вторичной ТТП и аутоиммунной ТТП составляли соответственно 53% и менее 5% от нормы (рисунок 5.2 а). Эти показатели были определены в остром периоде болезни. У больной с вторичной ТТП в плазме крови наблюдалось заметное увеличение содержания фВ, что видно по яркости полос мультимеров фВ (рисунок 5.1 а). Нарастание уровня фВ в плазме данной больной, по всей вероятности, есть результат его

повышенного производства, вызванного воспалительной реакцией в эндотелии. Но при этом отчетливо видно, что относительное содержание сверхкрупных мультимеров резко снижено. Причиной уменьшения доли сверхкрупных мультимеров на фоне общего повышенного уровня антигена фВ является потребление их во время тромбообразования в микрососудах. Аналогичная картина может наблюдаться при терминальной стадии онкологического заболевания (рисунок 5.1 в). В плазме больного было существенно повышено содержание антигена фВ, но при этом доля тромбогенных сверхкрупных мультимеров фВ резко снижена (рисунок 5.1 в).

На рисунке 5.1 б приведены электрофореграммы мультимеров фВ в плазме больной с аутоимунной ТТП на высоте клинических проявлений и через 10 и 20 дней после проведения интенсивных плазмаобменов. Клиническая картина ТТП проявилась в конце беременности и нарастала после родоразрешения: гемолитический криз с активностью лактатдегидрогеназы (ЛДГ), превышающей 20 норм, тромбоцитопения, шистоцитоз в мазке крови, неврологические нарушения завершились комой. В этот момент анализ мультимерного состава фВ показал снижение относительного содержания сверхкрупных и крупных мультимеров (рисунок 5.1 б). Однако при этом не было повышения уровня антигена фВ по сравнению с контролем, как в случае вторичной ТТП неясной этиологии (рисунок 5.1 а). Наоборот, содержание антигена фВ в острой фазе не превышало средний уровень в норме, который составляет, по разным данным, от 6.1 [9] до 10 мкг/мл [4]. Через 10 дней после эффективных плазмаобменов стали заметны изменения мультимерного состава фВ. Появились полосы сверхкрупных мультимеров, выросло их относительное содержание, что было расценено как торможение тромбообразования. Об этом же говорило прекращение гемолиза, увеличение числа тромбоцитов в крови больной с $20-30 \times 10^9/\text{л}$ до $120 \times 10^9/\text{л}$, нормализация активности ЛДГ. Через 20 дней после начала плазмаобменов мультимерный состав фВ ещё более приблизился к норме. Яркость полос уменьшилась, что свидетельствовало о понижении содержания антигена фВ, но сохранялся повышенный уровень сверхкрупных мультимеров. Изменения мультимерного состава фВ коррелировало с данными количественного определения антигена и активности фВ (рисунок 5.2 б). Как уже отмечено выше, в момент пика болезни содержание в плазме антигена фВ и активность фВ, которую определяли в тесте агглютинации с ристоцетином, практически не превышали норму. Небольшой рост концентрации антигена фВ происходил через 10 дней после начала плазмаобменов. Но в это же время происходило резкое увеличение активности фВ, что отражает появление в плазме тромбогенных сверхкрупных мультимеров. Через 20 дней отмечалось постепенное снижение активности фВ, спустя 2.5

месяца активность фВ вернулась к исходной практически нормальной величине, а содержание антигена опустилось ниже первоначального уровня.

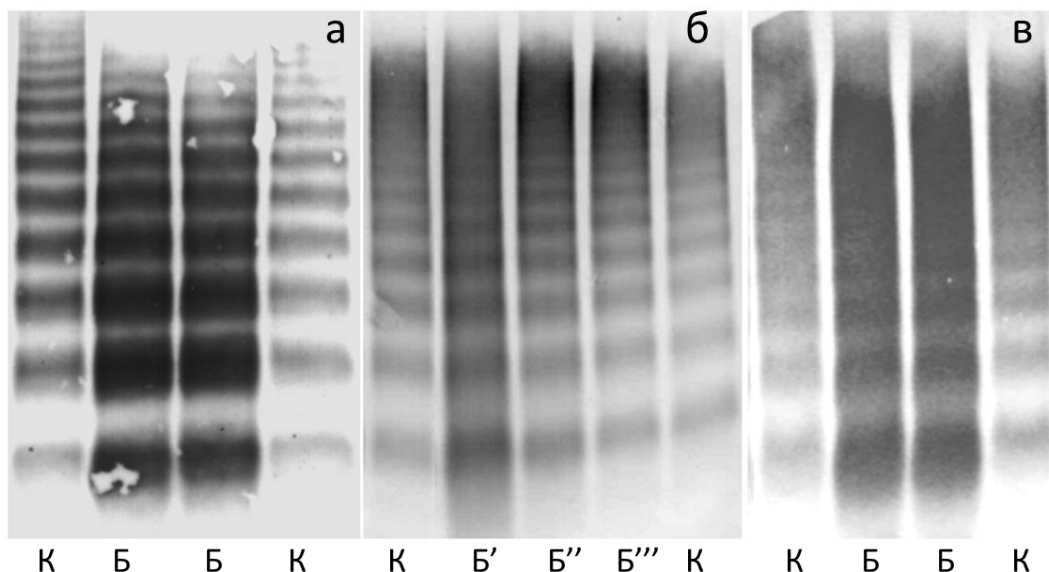


Рисунок 5.1 - Мультимерный состав фВ в плазме крови (а) - больной с тромботической микроангиопатией неясной природы; (б) - больной с тромботической тромбоцитопенической пурпурой; (в) - онкологического больного в терминальной стадии. Б – плазмы больных, К – контрольные плазмы здоровых доноров. Б', Б'', Б''' – плазма больной до и через 10 и 20 дней после начала плазмаобменов. Условия электрофореза и анализа мультимерного состава фВ приведены в подписи к рисунку 5.3.

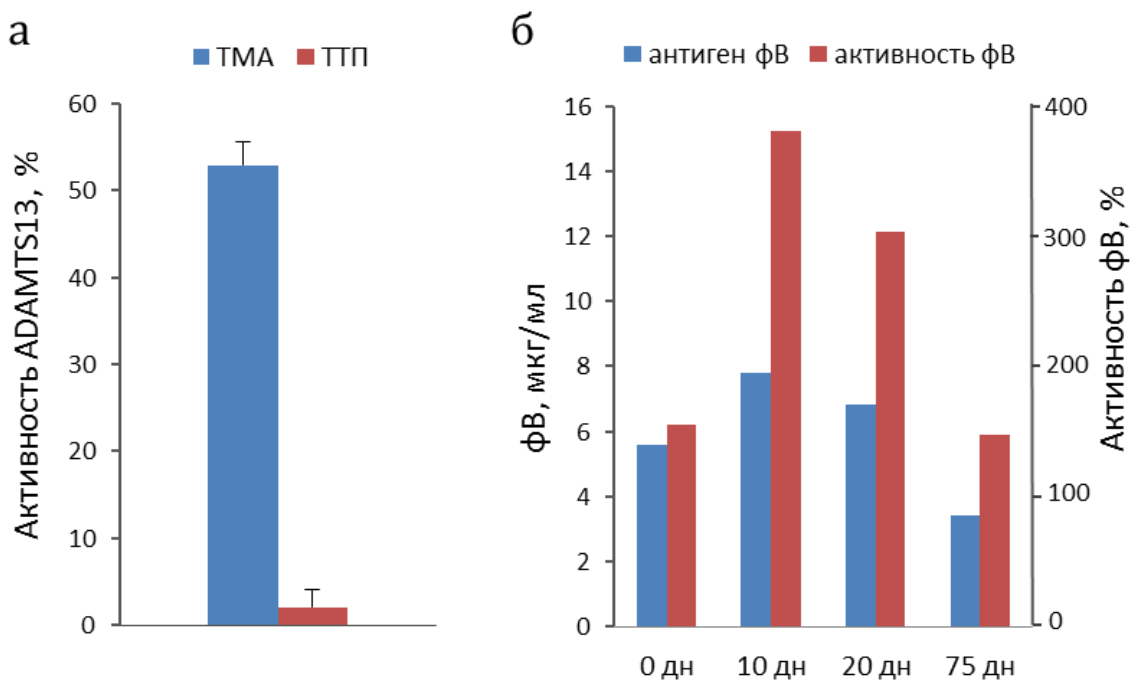


Рисунок 5.2 - а – активность ADAMTS13 в плазме крови больной с ТМА неясной этиологии и больной с ТТП; б – содержание антигена фВ и активность фВ в плазме больной с ТТП до начала и через 10, 20 и 75 дней после начала плазмообменов

Активности ADAMTS13 и фВ выражены в % от среднего значения этих показателей у здоровых доноров. Активность фВ определяли в тесте агрегации лиофилизированных тромбоцитов с ристоцетином с использованием агрегометра НПФ «Биола» и диагностического набора НПО «Ренам».

Общим признаком всех трех описанных патологических состояний является снижение доли сверхкрупных мультимеров фВ, которые потребляются в процессах тромбообразования. Причины исходного повышения уровня сверхкрупных тромбогенных мультимеров фВ различны. При аутоиммунной ТТП количество секретируемого фВ, судя по приведенным данным, не превышает норму, но на фоне нулевой активности ADAMTS13 система менее устойчива, т.к. исходно соотношение мультимеров сдвинуто в сторону сверхкрупных форм, и тромбозы инициируются легче. При вторичной ТТП и при онкологическом заболевании в финальной стадии, по-видимому, происходит гиперпродукция фВ. Остается не ясным, что является триггером, запускающим тромбообразование, поскольку для этого недостаточно только наличия сверхкрупных мультимеров. Есть данные о связи тромбозов и воспалительных процессов в сосудах [1]. В частности, известно, что фактор комплемента C5a вызывает экзоцитоз Р-селектина и фВ. В 2021 г. нами совместно с сотрудниками Гематологического научного центра были проведены исследования генетических нарушений в гене ADAMTS13 у пациентов с тромботической тромбоцитопенической пурпурой [10]. Среди 10 пациентов с ТТП выявлено 3 человека (2 женщины и 1 мужчина) с наследственной формой этого заболевания – синдромом Апшоу-Шульмана. У женщин манифестации наследственной ТТП отмечены при первой беременности. Установлены следующие генетические нарушения: две мутации сдвига рамки считывания - c.1066_1067del и c.4143insA (3 пациента) и две миссенс-мутации: p.Arg1060Trp (2 пациента) и p.Trp387Ser. Среди этих мутаций p.Trp387Ser ранее не была описана.

Нарушения обмена фактора Виллебранда при коронавирусной инфекции. Как отмечено выше, эндотелиальные клетки постоянно секретируют фВ в апикальном направлении в плазму крови и в базальном направлении в межклеточное пространство. В норме в условиях кровотока нити фВ, выходящие из секреторных пузырьков, в которых аккумулируется фВ из нескольких телец Вейбеля-Паладе, расщепляется протеазой ADAMTS13 [11]. Сверхкрупные мультимеры частично расщепляются и в плазме при разворачивании их в быстром потоке. Благодаря этому поддерживается баланс между крупными мультимерными, средними и мелкими олигомерными формами фВ. В обзоре Садлера [4] приводится среднее значение для уровня антигена фВ в плазме, которое составляет около 100 МЕ/дл. По данным других исследователей [9] концентрация

антигена фВ у здоровых доноров составляет в среднем 61 МЕ/дл (95%CI:51-91 МЕ/дл). Одна международная единица соответствует 10 мкг фВ. Если выражать содержание фВ в других единицах (мкг в мл), среднее значение концентрации составляет около 10 мкг/мл (1 МЕ/мл), причем у людей с группой крови O(I) оно на 20-25% ниже [11, 12]. Для простоты содержание фВ легче выражать в размерности МЕ/мл. За норму принято считать диапазон 0.5-1.5 МЕ/мл (5-15 мкг/мл).

При активации клеток агонистами секреция фВ в кровь увеличивается. Десмопрессин, аналог вазопрессина с заменой L-аргинина на D-аргинин, действующий через V2-рецепторы, вызывает практически немедленный 2-х кратный подъем уровня антигена фВ в плазме крови человека, сохраняющийся в течение не менее 2 часов и возвращающийся к норме через 24 часа [14]. Введение здоровым донорам гистамина или эндотелина-1 повышало уровень фВ в плазме на 11% [15] и 19% [16] соответственно. Гораздо более выраженные изменения наблюдаются при системном воспалении, вызванном внутривенным введением 2 нг/кг эндотоксина здоровым добровольцам. Через 4 часа уровень антигена фВ возрастал на 259%, через 24 часа на 192% и через 7 дней возвращался к норме [17].

При коронавирусной инфекции у больных, проходящих лечение в отделении интенсивной терапии и реанимации (ОРИТ), по данным разных исследований, несмотря на проведение антикоагулянтной терапии, в 17-22% случаев развиваются тромбозмболические осложнения [18]. Нами совместно с М.В. Бычининым было проведено исследование содержания фВ в плазме больных с коронавирусной инфекцией, проходивших лечение в общем отделении и в ОРИТ Федерального научно-клинического центра специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России (рисунок 5.3) [19]. Установлено, что уровень антигена фВ в плазме больных с тяжелым течением COVID-19 в среднем в 3.56 ± 0.27 выше по сравнению с уровнем антигена фВ в плазме больных со средней тяжестью течения этой болезни. В последнем случае этот показатель соответствовал норме. Важно отметить, что активность ADAMTS-13 в плазме больных с COVID-13 в среднем не выходила за рамки референсных показателей активности этого фермента у здоровых.

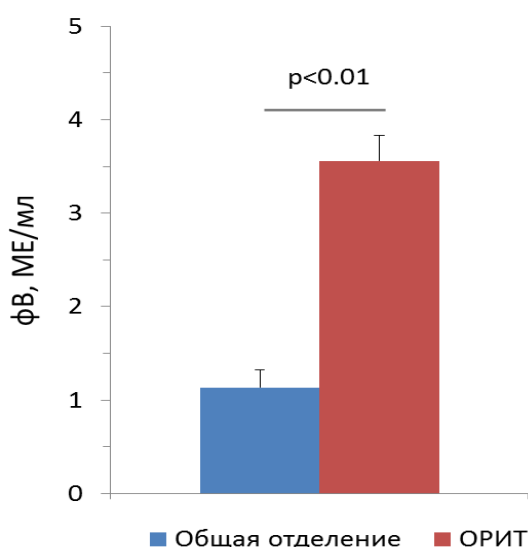


Рисунок 5.3 - Содержание фВ в плазме крови больных коронавирусной инфекцией, проходивших лечение в общем отделении (n=19) и в отделении реанимации и интенсивной терапии (n=57).

5.4 Заключение

В результате проведенных в 2021 году исследований нами получены новые данные относительно характера обмена фВ при отдельных видах тромботических микроангиопатий и при коронавирусной инфекции. Согласно нашим результатам, подъем уровня антигена фВ при тяжелой форме COVID-19 не обусловлен подавлением активности ADAMTS-13. Причиной является повышенная секреция фВ эндотелием и, возможно, снижение его клиренса макрофагами и клетками печени. По этим же причинам, по-видимому, происходят избыточное накопление фВ в плазме крови больных с ТМА, вызванном сосудистым воспалением. Вывод, который можно сделать из этих данных, заключается в том, что эндотелий является мишенью терапии при COVID-19 для предотвращения тромбоэмболических осложнений, особенно в мелких сосудах (артериолах и капиллярах).

5.5 Список использованных источников

1 Sweeney, J. M., Barouqa, M., Krause, G. J., Gonzalez-Lugo, J. D., Rahman, S., and Gil, M. R. Evidence for secondary thrombotic microangiopathy in COVID-19//medRxiv : the preprint server for health sciences. - 2020. - doi: 10.1101/2020.10.20.20215608.

2 Diorio, C., McNerney, K. O., Lambert, M., Paessler, M., Anderson, E. M., Henrickson, S. E., Chase, J., Liebling, E. J., Burudpakdee, C., Lee, J. H., Balamuth, F. B., Blatz, A. M., Chiotos, K., Fitzgerald, J. C., Giglia, T. M., Gollomp, K., Odom John, A. R., Jasen, C., Leng, T.,

Petrosa, W., et al. Evidence of thrombotic microangiopathy in children with SARS-CoV-2 across the spectrum of clinical presentations//Blood advances. - 2020. - Vol. 4. - P. 6051-6063. doi: 10.1182/bloodadvances.2020003471.

3 Moake, J. L., and McPherson, P. D. (1989) Abnormalities of von Willebrand factor multimers in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome//Am J Med. - 1989. - Vol. 87. - P. 9N-15N.

4 Sadler, J. E. New concepts in von Willebrand disease//Annu Rev Med. - 2005. - Vol. 56. - P. 173-191. doi: 10.1146/annurev.med.56.082103.104713.

5 Sadler, J. E. Thrombotic thrombocytopenic purpura: a moving target, Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 415-420, doi: 10.1182/asheducation-2006.1.415.

6 Gupta, M., Feinberg, B. B., and Burwick, R. M. Thrombotic microangiopathies of pregnancy: Differential diagnosis, Pregnancy hypertension//2018. - Vol. 12. - P. 29-34. doi: 10.1016/j.preghy.2018.02.007.

7 Zheng, X. L. ADAMTS13 and von Willebrand factor in thrombotic thrombocytopenic purpura//Annu Rev Med. - 2015. - Vol. 66, - P.211-225. doi: 10.1146/annurev-med-061813-013241.

8 Авдонин П. П., Цветаева Н. В., Гончаров Н. В., Рыбакова Е. Ю, Труфанов С. К., Цитрина А. А., Авдонин П. В.. Фактор Виллебранда в норме и при патологии//Биологические мембраны. - 2021. - Том 38. - № 4. - С. 1-20.

9 Jilma, B., Eichler, H. G., Vondrovec, B., Breiteneder, H., Kyrle, P. A., Kitzweger, E., Kapiotis, S., and Speiser, W. Effects of desmopressin on circulating P-selectin // Br J Haematol. - 1996. - Vol. 93. - P. 432-436. doi: 10.1046/j.1365-2141.1996.5031040.x.

10 Poznyakova, J., Pshenichnikova, O., Surin, V., Tsvetaeva, N., Avdonin, P., Stolyar, A., Klebanova, E., Galstyan, G. Mutations in ADAMTS13 gene in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) in Russia // HAEMOPHILIA. 2021. - Vol. 27. - P. 161-161. Приложение: 2 Специальный выпуск: SI Аннотация к встрече: ABS257. Meeting Abstract.

11 Dong, J. F., Moake, J. L., Nolasco, L., Bernardo, A., Arceneaux, W., Shrimpton, C. N., Schade, A. J., McIntire, L. V., Fujikawa, K., and Lopez, J. A. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions // Blood. - 2002. - Vol. 100. - P. 4033-4039. doi: 10.1182/blood-2002-05-1401 2002-05-1401 [pii].

12 Murphy, S. J. X., Lim, S. T., Hickey, F., Kinsella, J. A., Smith, D. R., Tierney, S., Egan, B., Feeley, T. M., Murphy, S. M., Collins, D. R., Coughlan, T., O'Neill, D., Harbison, J. A., Madhavan, P., O'Neill, S. M., Colgan, M. P., O'Donnell, J. S., O'Sullivan, J. M., Hamilton, G., and McCabe, D. J. H. von Willebrand Factor Antigen, von Willebrand Factor Propeptide, and

ADAMTS13 in Carotid Stenosis and Their Relationship with Cerebral Microemboli // *Thromb Haemost.* - 2021. - Vol. 121. P. 86-97. doi: 10.1055/s-0040-1715440.

13 Vischer, U. M., Ingerslev, J., Wollheim, C. B., Mestries, J. C., Tsakiris, D. A., Haefeli, W. E., and Kruithof, E. K. (1997) Acute von Willebrand factor secretion from the endothelium in vivo: assessment through plasma propeptide (vWf:AgII) Levels // *Thromb Haemost.* - 1997. - Vol. 77, P. 387-393.

14 Kaufmann, J. E., and Vischer, U. M. (2003) Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP) // *J Thromb Haemost.* 2003. - Vol. 1. - P. 682-689.

15 Jilma, B., Pernerstorfer, T., Dirnberger, E., Stohlawetz, P., Schmetterer, L., Singer, E. A., Grasseli, U., Eichler, H. G., and Kapiotis, S. Effects of histamine and nitric oxide synthase inhibition on plasma levels of von Willebrand factor antigen // *J Lab Clin Med.* - 1998. - Vol. 131. - P. 151-156. doi: 10.1016/s0022-2143(98)90157-3.

16 Leitner, G. C., Schmetterer, L., Kapiotis, S., and Jilma, B. Effects of endothelin-1 and phenylephrine on plasma levels of von Willebrand factor and protein S // *Thromb Res.* - 2010. - Vol. 125 - P. e5-8. doi: 10.1016/j.thromres.2009.08.004.

17 Reiter, R. A., Varadi, K., Turecek, P. L., Jilma, B., and Knobl, P. Changes in ADAMTS13 (von-Willebrand-factor-cleaving protease) activity after induced release of von Willebrand factor during acute systemic inflammation // *Thromb Haemost.* - 2005. - Vol. 93. - P. 554-558. doi: 10.1160/TH04-08-0467.

18 Choudry, F. A., Mathur, A., and Jones, D. A. (2021) Editorial commentary: Understanding thrombosis in COVID-19 - A long way to go // *Trends Cardiovasc Med.* - 2021. Vol. 31. - P. 161-162. doi: 10.1016/j.tcm.2020.12.006.

19 Бычинин М.В., Мандель И.А., Клыпа Т.В., Авдонин П.В.1, Коршунов Д.И., Бобровицкая Т.С., Андрейченко С.А. Венозные тромбоэмболические осложнения у пациентов с тяжелым и крайне тяжелым течением COVID-19 // *Анестезиология и реаниматология.* - 2021. - Вып. 4. - С. 41-47. DOI 10.17116/anaesthesiology202104141.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За отчетный период проведено исследование роли системного воспаления, вызванного бактериальным ЛПС, вирусов, иммуноглобулина G, отдельных форм протеасом и других факторов в раннем онтогенезе и развитии различных адаптивных и паталогических процессов у беспозвоночных и позвоночных (млекопитающих). Получен ряд важнейших результатов в соответствии с запланированными задачами и проанализирована возможность их практического применения.

Обнаружено значительное увеличение экспрессии субъединицы LMP2 (но не LMP7), а также повышение ее активности в субтипе протеасом, содержащем регулятор PA28 $\alpha\beta$, в ректальной аденокарциноме пациентов. Эти характеристики совпадают с характеристиками протеасом при приживлении аллотрансплантатов. Результаты указывают на роль субтипа протеасом с субъединицей LMP2 и регулятором PA28 $\alpha\beta$ в выживании чужеродных клеток, включая злокачественные, и открывают перспективы применения этого субтипа в качестве мишени для терапии ректального рака. Кроме того показано, что выявленные в опухоли изменения пула протеасом затрагивают и прилежащую ткань (0,7 см от опухоли), но не участки кишечника, удаленные от опухоли на расстоянии 2–20 см. Этот результат свидетельствует в пользу сохранения сфинктера при хирургическом вмешательстве, даже при локализации опухоли в 2–4 см от сфинктера. Тем не менее, нельзя забывать, что для решения этого вопроса требуются исследования дополнительных факторов помимо протеасом.

Представленные в работе данные свидетельствуют о негативном влиянии системного воспаления, индуцированного у крысы на ранних стадиях беременности бактериальным ЛПС, на формирование афферентных синаптических контактов на ГРГ нейронах и в окружающих их областях у половозрелых самцов-потомков. Блокада рецептора к интерлейкину-6 или введение иммуноглобулина G в период развития воспаления приводит к восстановлению афферентной иннервации ГРГ нейронов у половозрелых самцов. Эти результаты могут быть полезными для своевременного выявления нарушений у потомства и их коррекции уже в раннем онтогенезе.

Выявлены ключевые факторы, регулирующие морфогенетические процессы и развитие инфекции у беспозвоночных. Так, транскриптомный анализ клеток губок в процессах диссоциации/реагрегации показал, что ферритины и деацетилазы гистонов участвуют в регуляции трансдифференцировки клеток. Обнаружено, что факторы контроля протеома, шапероны HSP/HSC70 и сегрегаза VCP/p97, необходимы для синтеза рекомбинантных белков на поздних стадиях инфекционного цикла бакуловирусов, но не

влияют на формирование полиэдров в клетках чешуекрылого насекомого *Spodoptera frugiperda*.

Получены результаты, подтверждающие развиваемую коллективом оригинальную гипотезу о координирующей роли нейроактивного состава межклеточной среды, который социализирует индивидуальные нейроны и удерживает их в актуальном поведенческом контексте.

Два раздела исследований по теме посвящены распространению вируса SARS-CoV-2 в популяции и молекулярным механизмам его действия. Так, разработана модель передачи вируса SARS-CoV-2 через твердые поверхности и показано, что его адгезионная способность на бумаге, например, на наличных денежных купюрах, выше в 2,5 раза, а время полужизни выше в 4 раза, чем у гриппа А (H1N1). Данное свойство необходимо учитывать при борьбе с распространением пандемии по миру.

Получены новые данные относительно характера обмена фВ при коронавирусной инфекции. Показано, что подъём уровня антигена фВ при тяжелой форме COVID-19 не обусловлен подавлением активности металлопротеазы ADAMTS-13, но связан с повышенной секрецией фВ эндотелием. Эндотелий может быть мишенью терапии при COVID-19 для предотвращения тромбоэмболических осложнений, особенно в мелких сосудах (артериолах и капиллярах).

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.

ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ

Раздел 1 Подраздел 1.1

1 **Erokhov P.A., Kulikov A.M., Karpova Y.D., Rodoman G.V., Sumedi I.R., Goncharov A.L., Razbirin D.V., Gorelova V.S., Sharova N.P., Astakhova T.M.** Proteasomes in Patient Rectal Cancer and Different Intestine Locations: Where Does Proteasome Pool Change?//Cancers. - 2021. - Vol. 13. - P. 1108. DOI: 10.3390/cancers13051108. – Q1.

Раздел 1 Подраздел 1.2

2 **Zakharova L., Sharova V., Izvolskaia M.** Mechanisms of reciprocal regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing and immune systems: the role of GnRH, cytokines and their receptors in early ontogenesis in normal and pathological conditions//Int. J. Mol. Sci. - 2021. - Vol. 22. - P. 114. DOI: 10.3390/ijms22010114. – Q1.

3 **Izvolskaia M.S., Ignatiuk V.M., Ismailova A.H., Sharova V.S., Zakharova L.A.** IgG immune modulation in male mice with reproductive failure after prenatal inflammation//Reproduction. - 2021. - Vol. 161. - P. 669–679. DOI: 10.1530/REP-20-0386. – Q2.

4 **Игнатьюк В.М., Извольская М.С., Захарова Л.А.** Стресс при беременности и нарушения развития нейроэндокринной, иммунной и репродуктивной систем у потомства в пренатальном и постнатальном онтогенезе: от эксперимента к разработке подходов сохранения здоровья у человека//Акушерство и гинекология. - 2021. - Т. 8. - С. 69–74. DOI: 10.18565/aig.2021.8.69-74. – R. **Ignatyuk V.M., Izvolskaya M.S., Zakharova L.A.** Stress during pregnancy and developmental abnormalities of the neuroendocrine, immune, and reproductive systems in offspring during prenatal and postnatal ontogenesis: From the experiment to the elaboration of approaches to preserving human health//Akusherstvo i Ginekologiya (Russian Federation). - 2021. - Vol. 8. - P. 69–74. DOI:10.18565/aig.2021.8.69-74. – S.

Раздел 2

5 **Sharov K. S.** Computational epidemiology//Travel Medicine and Infectious Disease. - 2021. - Vol. 43. - Article 102128. - DOI: 10.1016/j.tmaid.2021.102128. – Q1.

6 **Sharov K. S.** The Stockholm paradigm: Specs for looking into the Pandora's box of emerging infectious diseases//Bioessays. - 2021. - Vol. 7. - Article 2100090. - DOI: 10.1002/bies.202100090. – Q1.

7 **Boguslavsky D.V., Sharova N.P., Sharov K.S.** Cryptocurrency as epidemiologically safe means of transactions: Diminishing risk of SARS-CoV-2 spread//Mathematics. - 2021. - Vol. 9. - Article 3263. - DOI: 10.3390/math9243263. – Q1.

Раздел 3

8 **Adameyko K.I.**, Burakov A.V., **Finoshin A.D.**, Mikhailov K.V., **Kravchuk O.I.**, Kozlova O.S., **Gornostaev N.G.**, Cherkasov A.V., **Erokhov P.A.**, Indeykina M.I., Bugrova A.E., Kononikhin A.S., Moiseenko A.V., Sokolova O.S., Bonchuk A.N., Zhegalova I.V., Georgiev A.A., **Mikhailov V.S.**, Gogoleva N.E., Gazizova G.R., Shagimardanova E.I., Gusev O.A., **Lyupina Yu.V.** Conservative and Atypical Ferritins of Sponges//International Journal of Molecular Sciences. - 2021. - Vol. 22. - Is. 16. Art no. 8635. DOI: 10.3390/ijms22168635. – Q1.

9 **Кравчук О.И.**, Бураков А.В., **Горностаев Н.Г.**, Михайлов К.В., **Адамейко К.И.**, **Финошин А.Д.**, Георгиев А.А., **Михайлов В.С.**, **Ерюкова Ю.Э.**, **Рубиновский Г.А.**, **Заиц Д.В.**, Газизова Г.Р., Гусев О.А., Шагимарданова Е.И., **Люпина Ю.В.** Деацетилазы гистонов в процессе реагрегации клеток губки *Halisarca dujardini*//Онтогенез. - 2021. - Т. 52. - № 5. - С. 367-383. DOI: 10.31857/S0475145021050050. – R. – **Kravchuk O.I.**¹, Burakov A.V., **Gornostaev N.G.**¹, Mikhailov K.V., **Adameyko K.I.**¹, **Finoshin A.D.**¹, Georgiev A.A., **Mikhailov V.S.**¹, Yeryukova Y.E., Rubinovsky G.A., Zayts D.V., Gazizova G.R., Gusev O.A., Shagimardanova E.I., **Lyupina Y.V.**¹ Histone deacetylases in the process of *Halisarca dujardini* cell reaggregation//Russian Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 52. № 5. P. 319–333. DOI: 10.1134/S1062360421050052. – Q4.

Раздел 4

10 Lapshin D.N., **Vorontsov D.D.** Frequency tuning of swarming male mosquitoes (*Aedes communis*, Culicidae) and its neural mechanisms//Journal of Insect Physiology. 2021. Vol.132. Art. no. 104233. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2021.104233. – Q2.

11 **Korshunova T.A.**, Driessen F.M.F., Picton B.E., Martynov A.V. The multilevel organismal diversity approach deciphers difficult to distinguish nudibranch species complex//Scientific Reports. – 2021. Vol. 11.(1) DOI: 10.1038/s41598-021-94863-5. – Q1.

12 **Богуславский Д.В.**, **Захаров И.С.** Роль внешних факторов в эмбриогенезе *Apis mellifera* //Онтогенез. 2021. Т. 52. Т. 6. С. 476-484. DOI: 10.31857/S0475145021060021. – R. - **Boguslavsky D.V.**¹, **Zakharov I.S.**¹ Role of External Factors in Embryogenesis of *Apis mellifera*//Russian Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 52. № 6. P. 476–484. DOI: 10.1134/S1062360421060023. – Q4.

Раздел 5

13 **Авдонин П. П.**, Цветаева Н. В., Гончаров Н. В., **Рыбакова Е. Ю.**, **Труфанов С.К.**, **Цитрина А.А.**, **Авдонин П.В.** Фактор Виллебранда в норме и при

патологии//Биологические мембраны. - 2021. - Том 38. - № 4. - С. 1-20. DOI: 10.31857/S0233475521040034. – R. – **Avdonin P.P.**, Tsvetaeva N.V., Goncharov N.V., **Rybakova E.Y.**, **Trufanov S.K.**, **Tsitrina A.A.**, **Avdonin P.V.** Von Willebrand Factor in Health and Disease//Biologicheskie Membrany. - 2021. - Vol. 38. - Is. 4. - P. 237-256. DOI: 10.31857/S0233475521040034. – Q4.

14 **Авдонин П.П.**, **Труфанов С.К.**, **Цитрина А.А.**, **Рыбакова Е.Ю.**, Гончаров Н.В., **Авдонин П.В.** Использование конъюгированного с флуоресцентной меткой аптамера ARC1779 для оценки влияния H₂O₂ на экзоцитоз фактора Виллебранда//Биохимия. - 2021. - Т. 86. - № 2. - С. 147-157. DOI: 10.31857/S0320972521020019. – R. – **Avdonin P.P.**, **Trufanov S.K.**, **Rybakova E.Y.**, **Tsitrina A.A.**, Goncharov N.V., **Avdonin P.V.** The Use of Fluorescently Labeled ARC1779 Aptamer for Assessing the Effect of H₂O₂ on von Willebrand Factor Exocytosis//Biochemistry (Moscow). - 2021. - Vol. 86. - Is. 2. - P. 123-131. DOI: 10.1134/S0006297921020012. – Q4.

15 Бычинин М.В., Мандель И.А., Клыпа Т.В., **Авдонин П.В.**, Коршунов Д.И., Бобровицкая Т.С., Андрейченко С.А. Венозные тромбоэмболические осложнения у пациентов с тяжелым и крайне тяжелым течением COVID-19//Анестезиология и реаниматология. - 2021. - Вып. 4. - С. 41-47. DOI: 10.17116/anaesthesiology202104141. - Bychinin M.V., Mandel I.A., Klypa T.V., **Avdonin P.V.**, Korshunov D.I., Bobrovitskaya T.S., Andreichenko S.A. Venous thromboembolic complications in patients with severe and extremely severe covid-19//Russian Journal of Anesthesiology and Reanimatology /Anesteziologiya i Reanimatologiya. - 2021. - Is. 4. - P. 41-47. DOI: 10.17116/anaesthesiology202104141. – S.

Отчет утвержден на заседании Ученого совета, протокол № 14 от 28 декабря 2021 г.