

На правах рукописи



Кузнецов Виктор Петрович

**Генерация эндогенного электрического потенциала
в новой модельной системе**

Специальность 1.5.8 —
«математическая биология, биоинформатика»

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте проблем передачи информации им. А. А. Харкевича Российской академии наук (ИППИ РАН).

Научный руководитель: **Панчин Юрий Валентинович**
доктор биологических наук, зав. лабораторией
(Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича
Российской академии наук)

Официальные оппоненты: **Дунин-Барковский Виталий Львович,**
доктор физико-математических наук, профессор, заведующий
отделом нейроинформатики
(Центр оптико-нейронных технологий. Федеральное
государственное учреждение Федеральный научный центр
Научно-исследовательский институт системных
исследований Российской академии наук)

Дьяконова Варвара Евгеньевна
доктор биологических наук, профессор, главный научный
сотрудник
(Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской
академии наук)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии
Российской академии наук.

Защита состоится 9 декабря 2024 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.101.01 при Институте проблем передачи информации имени А. А. Харкевича Российской академии наук (ИППИ РАН) по адресу: 127051, г. Москва, Большой Каретный переулок, д. 19, стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИППИ РАН, а также на сайте ИППИ РАН по адресу: <http://iitp.ru/ru/dissertation/1704.htm>

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
24.1.101.01,
доктор биологических наук



Казенников Олег Васильевич

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Исследования генерации и передачи ритмических сигналов между клетками и сравнение свойств и механизмов такой передачи у разных организмов – актуальная научная проблема. Практически у всех организмов ритмическим поведением управляет нервная система. Впрочем, генерация и контроль ритмической дефекации модельного организма — нематоды *Caenorhabditis elegans* представляют удивительное исключение из этого правила и практически не зависят от работы нервной системы. Это ритмическое поведение изучено при помощи различных генетических и молекулярных методов биологии и представляет большой интерес для современной науки.

Ритмическая программа в энтодерме нематод практически не вовлекает в работу нервную систему, однако исследования работы подобных внутриклеточных «минутных часов» важны для ответа на вопросы о генерации и управлении ритмическими процессами классическими возбудимыми клетками, многие из которых долгое время оставались открытыми.

В ходе исследований было показано, что дефекационная моторная программа (ДМП) нематоды *Heterorhabditis megidis* управляется центральным генератором паттернов (ЦГП), связанным с необычным гиперполяризационным потенциалом действия (ГПД), который работает по принципу все-или-ничего. Исследуемый механизм ритмического поведения обладает двойственной природой: хотя некоторые аспекты работы ЦГП зависят от уровня мембранного потенциала (МП), осцилляции продолжают в опытах фиксации МП даже при длительном поддержании потенциала на различных уровнях.

Классическое определение возбудимой ткани не включает в себя возможность энтодермальных клеток генерировать ГПД и тем самым, исследуемая необычная активность клеток кишечника нематоды, требует пересмотра данного определения.

Степень разработанности темы

В 1964 году в журнале Nature появилась работа, описавшая у аскариды необычный гиперполяризационный потенциал действия (ГПД) – противоположный по знаку классическому ПД, и впоследствии ставшая основой для изучения этого явления. Хотя процессы сходные с ГПД играют значительную роль в работе самых разных систем не только у нематод, но и у большого количества организмов, включая человека, это явление весьма скудно описано в современной литературе. ГПД тесно связаны с механизмами Ca^{2+} сигнализации и нарушения в работе этих систем могут быть причинами серьезных заболеваний. Увеличение проводимости клеточной мембраны за счет открытия K^+ каналов создает ГПД, приводящий к засасыванию Ca^{2+} по градиенту возникающего потенциала.

Наиболее интересным проявлением передачи сигналов, основанным на ГПД, можно назвать управление энтодермальными клетками сложного поведенческого процесса. ЦГП представляют собой единичные клетки или системы взаимосвязанных клеток, например, нейронные сети, способные производить ритмически упорядоченные моторные сигналы при отсутствии сенсорной обратной связи. Одним из известных минутных ритмов, в основе работы которого стоит ЦГП является ДМП нематоды *C. elegans*.

При температуре 20-25С, постоянно питаясь, *C. elegans* ритмически осуществляет процесс дефекации со стабильным периодом в 45-60 секунд. Дефекация нематод сложный ритмический процесс, вовлекающий разные типы клеток. Генерация ритма внутри кишечника, а также первый такт работы мышц, полностью автономны и не требуют вовлечения нервной системы. Роль

нейронов выполняют клетки кишечника нематоды, тесно связанные ЩК и генерирующие ГПД и Ca^{2+} волны

Показано, что ДМП представляет собой последовательную серию сокращений различных мышц тела нематоды. ДМП можно разделить на три этапа, осуществляемые один за другим. Первый этап – сокращение дорзальных и вентральных мышц задней части тела (pVoc). Вторым этапом – сокращение дорзальных и вентральных мышц передней части тела (aVoc). Третьим – сокращение энтеральных и кишечных мышц (Exp).

Было показано, что ДМП контролируется внутриклеточными кальциевыми волнами, начинающимися в апикальной клетке и распространяющимися вдоль всего кишечника от задней части к передней, а важным посредником распространения кальциевых осцилляций, являются ЩК. Участие же нервной системы минимально. Мотонейроны AVL и DVB необходимы для второй (aVoc) и третьей (Exp) стадии дефекации. Генерация ритмичного дефекационного ритма в *C. elegans* не зависит от работы нервной системы, и система является полностью автономной.

Наряду с обработкой пищи, извлечением питательных веществ и переносом их в другие ткани, энтодермальные клетки нематод могут регулировать деятельность различных систем организма, реагировать на изменения внутренней и внешней среды и даже управлять сложным запрограммированным механизмом гибели целого организма.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы является исследование механизма генерации и передачи сигналов в цикле дефекации у нематод, в том числе электрофизиологическое исследование характеристик и механизмов ритмического изменения МП клеток кишечника.

Для достижения этих целей были поставлены следующие **задачи**:

1. введение и использование нового модельного организма для электрофизиологических исследований – нематоды *H. megidis*. Получение параметров гиперполяризационного потенциала действия;
2. регистрация изменений МП клеток кишечника в ответ на использование электрофизиологических стимулов. Проведение исследований в различных типах препаратов;
3. создание модели работы ионных каналов. Предсказание участников процесса на основе биоинформатического анализа данных, прогнозирование их функций;
4. эволюционное исследование наличия и характеристик ДМП у различных видов нематод.

Научная новизна

Исследования на *C. elegans* ограничены сложностью применения различных электрофизиологических методов из-за малого размера клеток этого животного, что в итоге не дает возможность получить полную картину работы исследуемой системы. Нами предложено новое модельное животное для исследования распространяющегося сигнала в кишечнике нематоды стандартными методами нейрофизиологии – нематода *H. megidis*.

В работе впервые были обнаружены совершенно новые и неожиданные свойства электрических потенциалов при генерации кальциевой волны. Показано как многообразие возможных вариантов траектории изменения МП при генерации ДМП, так и единый ее паттерн с отчетливо выраженными участками, такими как плато и ГПД. В сравнении с обычными ПД,

связанными со входом натрия и кальция в нейронах, мышечных или сердечных клетках, мы обнаружили, что в клетках кишечника нематоды пороговый распространяющийся ПД имеет противоположную полярность. В рамках проекта мы впервые исследовали с помощью различных электрофизиологических методов механизмы передачи такой волны между клетками кишечника *H. megidis*, предсказали механизмы генерации этих волн и роль белков, потенциально задействованных в этот процесс.

При помощи мультieleктродной регистрации электрофизиологических параметров клеток кишечника и введения маркерных молекул показано, что между клетками кишечника *H. megidis* есть электрическая связь с высоким, близким к 1 коэффициентом связи. Впервые проведено комплексное электрофизиологическое исследование ультрадианного ритма дефекации нематоды. На основе большого количества собранных данных изменения различных характеристик энтодермальных клеток с течением времени была показана сложность и двоякость работы генератора паттернов.

Измерение проводимости клеточной мембраны позволило показать зависимости МП клетки и самой проводимости от времени и предположить потенциальную роль мембранных белков в генерации необычных ритмических осцилляций в *H. megidis* и сравнить механизмы генерации и распространения ритма в цикле дефекации нематоды с процессами, происходящими в «классических» возбудимых тканях (нервных и мышечных). Результаты данной работы способствуют пониманию механизмов генерации паттернов дефекации нематод и переосмыслению определения возбудимых клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты, полученные в ходе описываемой работы, имеют теоретическую значимость, так как позволяют переосмыслить имеющиеся знания как о ГПД в частности, так и о возбудимых тканях в целом. Результаты представленных электрофизиологических исследований дополняют уже имеющиеся молекулярные исследования необычного ультрадианного цикла дефекации нематоды *C. elegans*.

В мире широко распространены исследования генерации и передачи сигналов между клетками, изучаются эволюционные аспекты этих процессов, в том числе свойства и механизмы передачи информации у разных организмов в разных тканях. Помимо исследования механизма ДМП для одной конкретной нематоды *H. megidis*, работа предоставляет изучение и сравнение проявлений ритмического процесса у разных представителей нематод.

Клеточные и молекулярные механизмы циркадных, околосоточных и быстрых ритмов хорошо изучены, в то время как исследований ультрадианных ритмов крайне мало. Нам удалось создать модель изменения МП энтодермальных клеток кишечника нематоды во времени – сложной околominутной моторной программы, практически не вовлекающей в работу нервную систему. Ожидается, что новый тип электрической активности, представленный в кишечнике *H. megidis* и других нематод и отвечающий за ритмический процесс дефекации может быть использован для изучения иных ультрадианных биологических механизмов.

Исследования свойств и роли ЩК, ионных каналов и транспортеров клеточной мембраны и эндоплазматического ретикулума (ЭПР) в генерации и распространении сигнальной волны в клетках кишечника нематоды крайне важны для понимания работы нервной системы и сердечно-сосудистой системы. Таким образом, полученные в результате работы данные и подходы определяют практическую значимость проекта.

Методология и методы исследования

В данной работе нами были использованы различные методы экспериментальной биологии, физиологии, в том числе электрофизиологии в сочетании с методами биоинформатики и сравнительной геномики.

Основным модельным организмом в ходе описываемых исследований была нематода *H. megidis*. Помимо этого исследования проводились на свободноживущей нематоде *Enoplus brevis* и энтомопатогенных нематодах *Romanomermis culicivorax*. В качестве модельных объектов были использованы как целые организмы, так и полученные при помощи методов микрохирургии препараты единичных кишечных клеток или групп клеток.

Для регистрации электрофизиологических данных использовалась микроэлектродная установка. Подача тока через один или несколько микроэлектродов позволяет воздействовать на исследуемый объект. Так, например, для перезапуска ритма был использован короткий сильный гиперполяризационный импульс, а при помощи продолжительной деполяризации клеток кишечника нематоды удавалось замедлять ритм. Эксперименты с фиксацией потенциала помогли установить двоякую природу наблюдаемого процесса. Получение необходимых данных для подсчета сопротивления и проводимости клеточной мембраны производилось при помощи повторяющихся импульсов тока и высчитывалась по закону Ома.

Для исследования проводимости клеток помимо электрофизиологических методов с применением нескольких микроэлектродов использовалась методика инъекции флуоресцентных красителей, при определенном подборе которых, позволяющая оценить размер межклеточных контактов. Для наблюдения за частотой первой фазы ДМП рВос нематоды *H. megidis*, записывались видеоданные фиксированной в агаре нематоды. Обработка видеоматериала проводилась вручную. Для подсчета количества клеток кишечника нематод и анализа их размера производилась окраска бромистым этидием.

Идентификацию белков исследуемых нематод, гомологичных белкам генов, известным по литературным данным, проводили путем анализа последовательностей с помощью программы BLASTP и баз данных белков. Проверка на ортологичность производилась методом двунаправленного поиска лучших совпадений (ВВН).

Филогенетическое дерево было построено с помощью алгоритма neighbor-joining на основе коллекции белков выровненной с помощью программы MUSCLE. На основе данных секвенирования РНК единичных клеток был проведен анализ дифференциальной экспрессии, построен UMAP и тепловые карты.

Анализ физиологических экспериментов сокращения мышц производился на основе обработки видеоданных. Видеофрагменты разбивались на последовательности кадров, на основе которых финальное изображение генерировалось по алгоритму Z-projection FIJI.

Статистика, и построение графиков проводились с использованием OriginPro 9.1 (OriginLab), Microsoft Excel 2019 и SimInTech (simintech.ru).

Положения, выносимые на защиту

1. обнаружен новый тип ритмического распространяющегося электрического потенциала. Изменения МП схожи с классическим потенциалом возбудимых клеток, но имеют обратную полярность и более протяженные длительность и период. Сходно с классическими возбудимыми тканями, энтодермальный потенциал способен передаваться от клетки к клетке. Передача осуществляется за счет электрических связей между клетками, опосредованными ШК, как в электрических синапсах нервной системы;

2. механизм ритмического поведения имеет двоякую природу. Некоторые характеристики работы ЦГП являются потенциал-зависимыми (перезапуск, замедление/ускорение ритма), другие потенциал-независимыми (сохранение осцилляций при фиксации потенциала на различных уровнях);

3. построены траектории изменения базовых характеристик ритмического процесса в энтодермальных клетках нематоды *H. megidis*. Создана простейшая модель работы ионных каналов, включающая три типа проводимости. Представлены возможные молекулярные участники данного процесса, описан возможный механизм ГПД, учитывая известные литературные данные и биоинформатический анализ баз данных и scRNA-seq. Подсчитан коэффициент связи клеток;

4. сделано предсказание наличия и разнообразия механизма у эволюционно отдаленных видов нематод. Проведено фармакологическое физиологическое исследование, подтверждающее полученные в ходе анализа данные. Показано наличие схожего ритма изменения МП в ходе электрофизиологического эксперимента на *E. brevis*.

Степень достоверности и апробация результатов

По материалам диссертации опубликовано семь статей в рецензируемых научных журналах. Результаты работы были представлены на международной междисциплинарной школе-конференции «Информационные технологии и системы» в 2015, 2016, 2017, 2018 и 2019 годах (ИТиС 2015 – Сочи, Россия; Россия; ИТиС 2017 – Уфа, Россия; ИТиС 2018 – Казань, Россия; ИТиС 2019 – Пермь, Россия; ИТиС 2020 – Москва, Россия), на 11-м Международном нематологическом симпозиуме «Нематоды и другие Ecdysozoa», Чебоксары, Россия в 2015 году, XI конференции «Простые нервные системы» Международного общества нейробиологии беспозвоночных (International Society of Invertebrate Neurobiology, ISIN), Звенигород, Россия в 2016 году, Московской международной конференции по вычислительной молекулярной биологии в 2017 году (Moscow Conference on Computational Molecular Biology, MCCMB'17 – Москва, Россия) и на 5й Московской международной конференции «Molecular phylogenetics and biodiversity biobanking», Москва, Россия в 2018 году.

Объем и структура работы

Полный объем диссертации составляет 139 страниц, включая 28 рисунков. Список литературы содержит 144 наименования.

Основное содержание работы

Глава 1 содержит обзор литературы по теме диссертации, включающий восемь разделов. В разделе 1.1 описывается разнообразие ритмических процессов и место дефекационной моторной программы нематод, как ультрадианного ритма.

В разделе 1.2 описываются особенности механизма дефекационной моторной программы нематоды *C. elegans* известные из литературных данных и составлена общая молекулярная схема процесса (Рисунок 1).

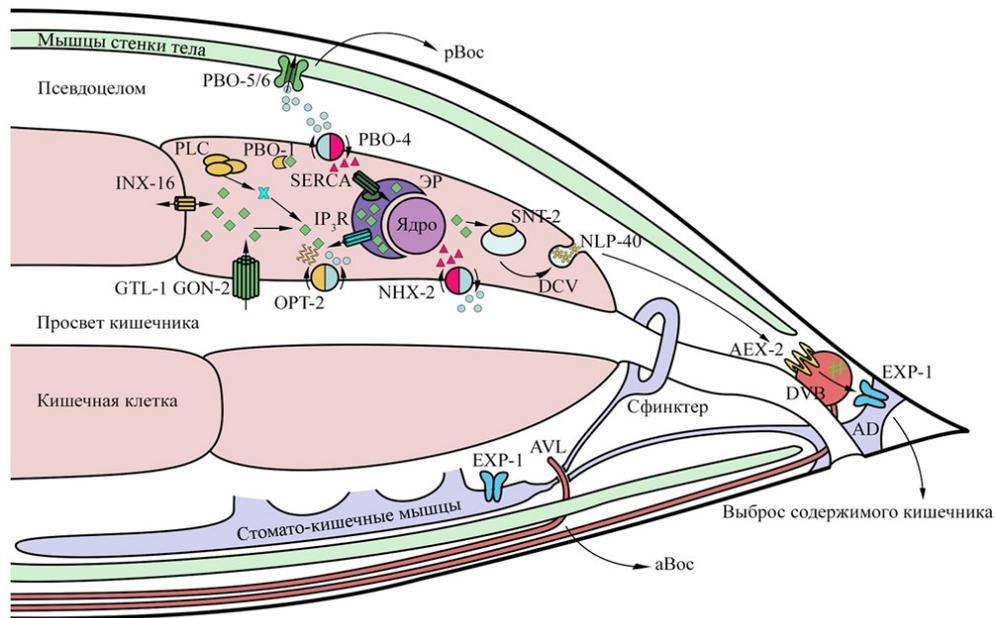


Рисунок 1 – Схематическое изображение задней части тела нематоды *Caenorhabditis elegans* показывающее заднюю часть кишечника, окружающие мышцы и нейроны, участвующие в сигнальных путях, регулирующих поведение дефекации. Инозитол-(1,4,5)-трифосфат (IP₃) (голубой крест) образуется гидролизом фосфолипида PIP₂ (фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат) фосфолипазой C (PLC) и активирует рецепторы IP₃R, что вызывает высвобождение ионов Ca²⁺ (зеленый ромб) из эндоплазматического ретикулума (ЭР). Кальциевая волна распространяется от задней части к передней через ЩК (INX-16). TRPM-каналы GTL-1/GON-2 повышают внутриклеточную концентрацию Ca²⁺. Ca²⁺-АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA) восстанавливает концентрацию Ca²⁺ до исходного уровня. Ca²⁺ белок PBO-1 координирует выброс протонов H⁺ (серый кружок) и изменение концентрации ионов Na⁺ (пурпурный треугольник) с колебаниями Ca²⁺. Ионообменник PBO-4/NHX-7 переносит через базолатеральную мембрану клетки H⁺ в псевдоцелом и Na⁺ в клетку, а ионообменник NHX-2 переносит через апикальную мембрану H⁺ в просвет кишечника и Na⁺ в клетку. NHX-2 связан с транспортером олигопептидов OPT-2/PEPT-1, который симпортирует дипептиды (желтые волны) и H⁺ из просвета кишечника. Гетеродимер протон-управляемого ионного канала PBO-5/PBO-6 деполяризует мышцы задней стенки тела, вызывая рВос. Мотонейрон AVL контролирует передние мышцы тела. Синаптотагмин (SNT-2), способствует высвобождению нейропептидоподобного белка NLP-40 связываясь с ионами кальция. NLP-40 активирует рецептор AEX-2/GPCR на нейронах AVL и DVB, вызывая возбуждение и выброс ГАМК (зеленый октоторп). ГАМК связывается с рецептором EXP-1 на кишечных мышцах, вызывая сокращение и завершающую стадию ДМП – выброса содержимого кишечника.

Раздел 1.3 посвящен роли инозитолтрифосфата в запуске дефекационной моторной программы.

Раздел 1.4 посвящен роли кальция в генерации и распространении возникающего в исследуемом процессе сигнала.

Раздел 1.5 описывает взаимосвязь изменения концентрации различных ионов и уровня МП клеток, в том числе такие явления как потенциал действия и феномен гиперполяризационного потенциала действия.

Раздел 1.6 содержит информацию о мембранных белках, участвующих или потенциально участвующих как в генерации, так в распространении измерений МП в ходе дефекационной моторной программы нематод.

Раздел 1.7 описывает два модельных организма нематод: *C. elegans* и *H. megidis*; особенности строения их кишечника и значимые различия, позволяющие проводить внутриклеточные электрофизиологические записи.

Раздел 1.8 посвящен сходству энтодермальных клеток кишки нематоды с нейронами и описанию сложных поведенческих программ, регулируемых работой этих клеток.

В **Главе 2** вводится новый модельный организм – *Heterorhabditis megidis* в качестве объекта для исследования электрофизиологических особенностей дефекационной моторной программы нематод. Производится сбор и анализ электрофизиологических параметров ритмических изменений МП и производится разбиение процесса на фазы, необходимые для последующего построения модели.

Нематода *H. megidis* близкородственна к *C. elegans*, но имеет больший размер и тонкую кутикулу, что облегчает электрофизиологические исследования. В рамках исследований было показано, что ДМП управляется необычным ГПД, который работает по принципу все-или-ничего. Средний период генерации сигнала ЦПП сильно зависит от большого количества параметров, а также зависит от уровня МП и меняется при продолжительных искусственных гипер- и деполяризациях (Рисунок 2). Среднее значение со среднеквадратичным отклонением (SD) периода колебаний МП у препаратов изолированных клеток кишечника составляет (5,1 (2,1) минуты, n=41). Максимальная зарегистрированная амплитуда наблюдаемых колебаний составила 87,5 мВ, максимальный наблюдаемый период колебаний – более 10 минут, а самый короткий период – около 2 минут.

Первоначальный МП находится на уровне небольшой деполяризации в районе 10mV, и затем переходит в быструю гиперполяризацию, особый ПД, сменяющийся медленным возвращением к потенциалу покоя. Фаза гиперполяризации коррелирует с выбросом содержимого кишечника. Наблюдаемое нами синхронное изменение МП подтверждает гипотезу о том, что изменение МП в одной клетке может стимулировать активность соседней клетки через прямую электрическую связь, минуя механизмы диффузии сигнальных молекул (например, IP₃ или Ca²⁺).

В ходе исследования щелевых контактов нематоды *H. megidis* было проведено исследование с использованием электрофоретически введенных флуоресцентных красителей (Рисунок 3). Флуоресцентный краситель люцифер желтый СН диффундирует из исходно инъецированной клетки во все связанные с ней клетки в течение нескольких минут (Рисунок 3А, n=4). В то же время другой краситель – карбоксифлуоресцеин – не переходит в соседние клетки и остается исключительно в клетке, где был введен, даже спустя продолжительное время (Рисунок 3Б, n=5). Такие результаты указывают на наличие селективных межклеточных каналов между клетками кишечника.

Электрофизиологическими методами было обнаружено, что все клетки кишечника нематоды *H. megidis* имеют сильную электрическую связь. В частности, средний подсчитанный коэффициент связи между двумя соседними клетками составляет $0,95 \pm 0,012$ (n = 10).

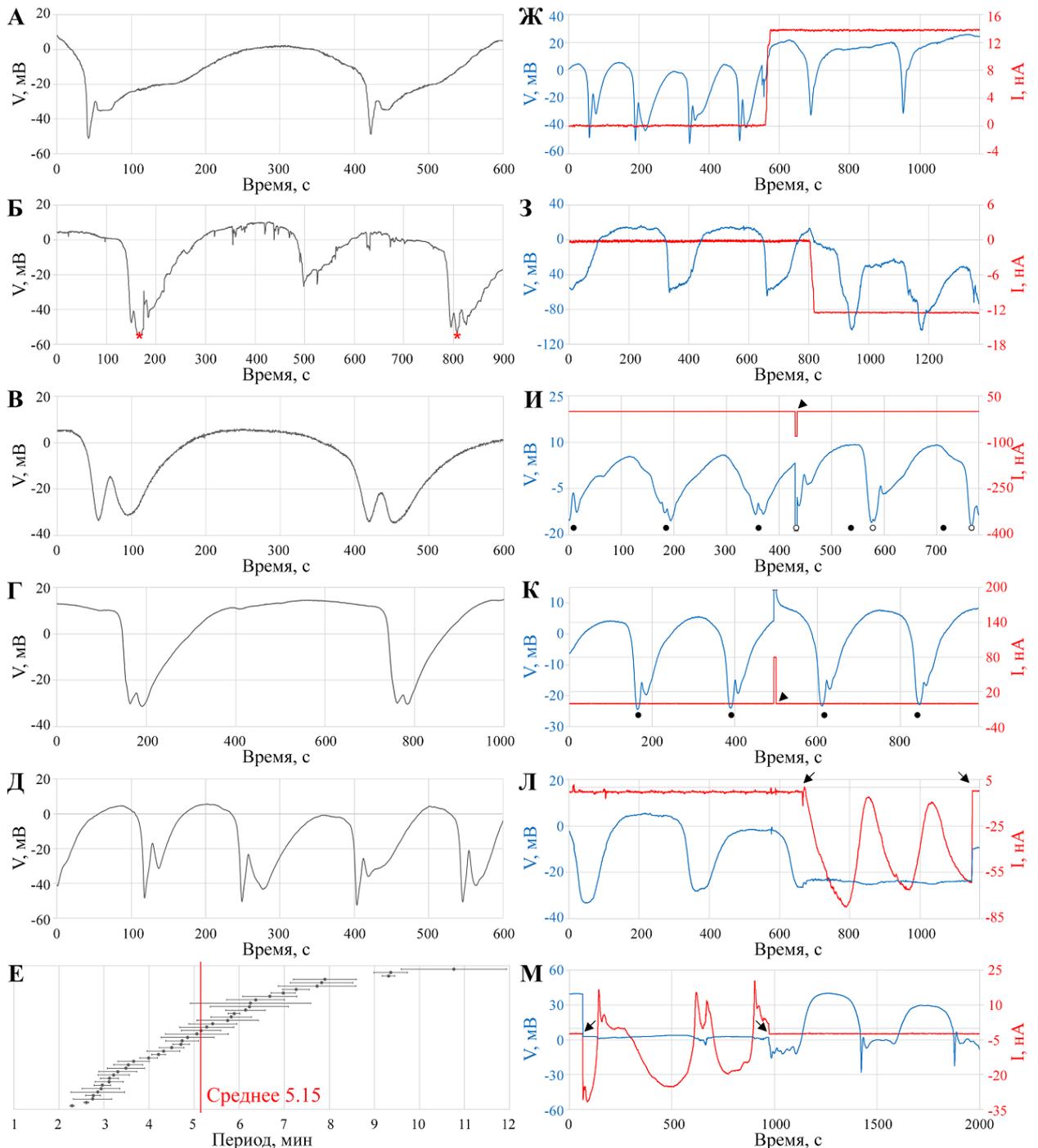


Рисунок 2 – Электрическая активность в клетках кишечника нематоды *Heterorhabditis megidis* А. Классическое проявление регистрируемого ритмического изменения МП с ярко выраженным деполяризационным плато и гиперполяризационным спайком. Б. Изменения МП в препарате целого животного, иммобилизованного в тонком слое агара. Звездочками указаны моменты выброса содержимого кишечника, регистрируемые визуально. В. Изменения МП в препарате изолированного фрагмента кишечника, состоящего всего из четырех клеток. Примеры А. средних Г. длительных и Д. коротких по продолжительности периодов цикла. Е. Вариабельность периода ДМП *H. megidis*, выраженная через среднее значение со среднеквадратичным отклонением (SD) периодов изменений МП для 41 эксперимента с зарегистрированными минимум четырьмя циклами ДМП, ранжированная в соответствии со средней продолжительностью периода. Ж-М. Одновременные внутриклеточные отведения двух электродов. Первый электрод регистрирует потенциал – синий, второй инжектирует ток – красный. Ж. Продолжительная деполяризация посредством подачи тока увеличивает период

наблюдаемых колебаний. 3. Продолжительная гиперполяризация уменьшает период колебаний. И. Короткий сильный импульс гиперполяризующего тока (стрелка) перезапускает ритм ДМП, а импульс деполяризующего тока К не имеет эффекта. Черными точками отмечен начальный период ДМП. Белыми точками отмечена период после сброса. Описанные эффекты воспроизводились по меньшей мере три раза. Л-М. Метод фиксации потенциала в двух экспериментах с различными уровнями фиксации (Л -25 мВ и М 0 мВ). Стрелками показывают включение и выключение фиксации потенциала.

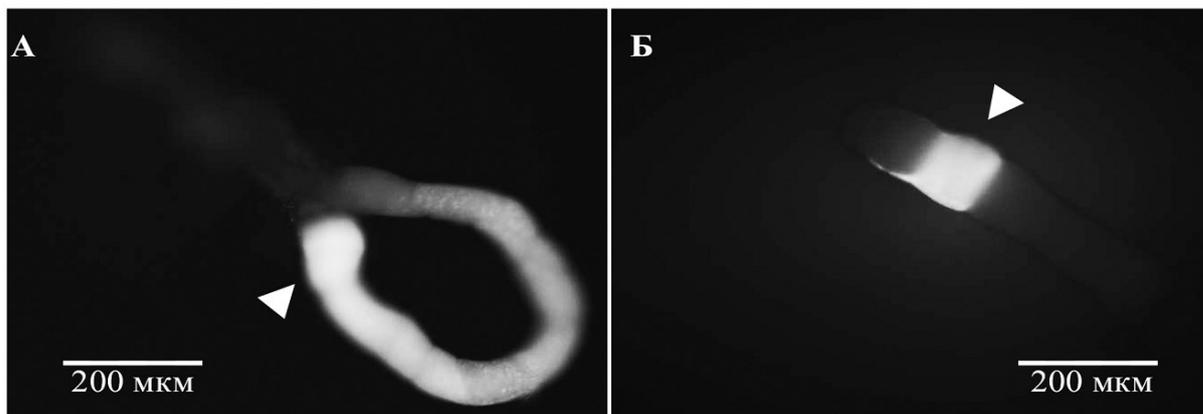


Рисунок 3 – Различия распространения флуоресцентного красителя из инъецированной клетки в препарате изолированного кишечника нематод *Heterorhabditis megidis* А. Флуоресцентный краситель люцифер желтый СН быстро диффундирует в соседние клетки (3 минуты после инъекции). Б. Флуоресцентный краситель карбоксифлуоресцеин сохраняется в одной клетке спустя длительное время (два часа после инъекции). Инъецированная клетка отмечена белой стрелкой.

В ходе дальнейших исследований, было проведено 14 измерений проводимости мембраны на разных особях с использованием препарата изолированного кишечника. Анализируя изменения МП и проводимости, а также зависимости $V(t)$, $g(t)$ и $g(V)$, в цикле ДМП нами было выделено шесть фаз (1-6) (Рисунок 4АБВ). Каждая фаза определяется временем между двумя экстремальными значениями изменения МП или ее проводимости. Так как рост проводимости сопровождается как гиперполяризацией, так и деполяризацией в разных этапах цикла, для создания полного фазового портрета периодических изменений параметров клеток кишечника (кривая $g(V)$) необходимы по крайней мере два различных типа ионных каналов (Рисунок 4А).

Исходя из наблюдения о наличии как минимум двух типов ионных каналов для оценки простейшей модели исследуемого процесса регистрируемая мембранная проводимость (g_r) была разделена на два компонента. Первый компонент (g_a) связан с ионами, концентрация которых снаружи клетки значительно превышает внутриклеточную (вероятно, это Na^+ или Ca^{2+}). Второй компонент (g_b) связан с ионами, для которых внутриклеточная концентрация превосходит внеклеточную (предположительно, K^+).

Форма функции $g_b(t)$ проста и характеризуется наличием одного пика, в то время как $g_a(t)$ имеет более сложный профиль с двумя пиками (Рисунок 4Б). Такая сложная форма функции $g_a(t)$ может быть объяснена комбинированным влиянием двух различных типов ионных каналов с проводимостями g_{a1} и g_{a2} . Эта теория находит подтверждение при анализе специфических случаев электрофизиологических записей, имеющих нетипичный ход изменений МП с отсутствием компонента с проводимостью g_{a1} или g_{a2} .

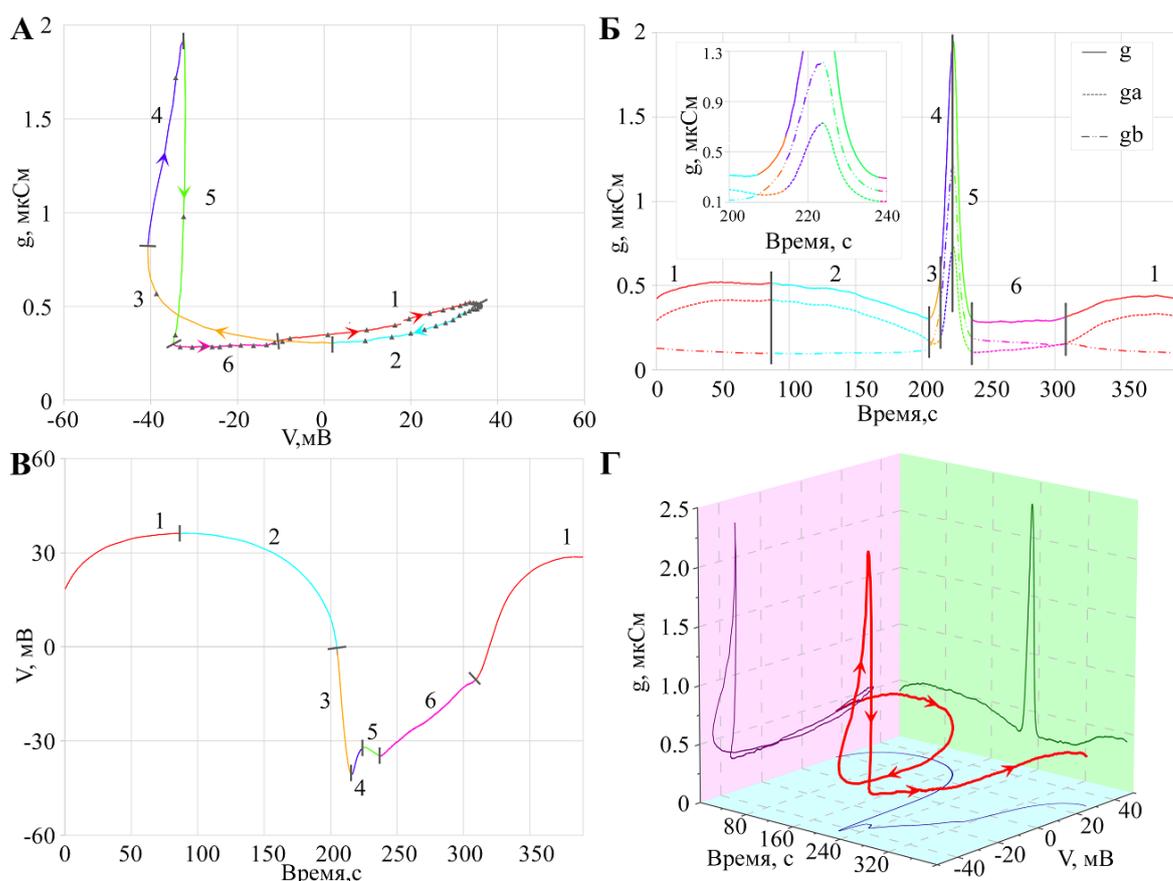


Рисунок 4 – Изменение мембранного потенциала клеток кишечника (V) и проводимости (g) с течением времени (t) в ходе одного цикла ДМП нематоды *Heterorhabditis megidis* Графики АБВ разделены на 6 фаз, различающихся суперпозицией изменений $V(t)$ и $g(t)$. А. График функции $g(V)$. Координаты функции, устанавливаются каждые 7 секунд и обозначены треугольниками. Стрелками показано направление хода времени во время изменений функции $g(V)$. Б. График функции $g(t)$. Полная проводимость мембраны g (сплошная линия) равная суперпозиции двух компонент g_a (пунктирная линия) и g_b (штрихпунктирная линия) в соответствии с моделью, изложенной в тексте. Подробные изменения $g(t)$ в фазах 3-5 показаны во вставке. В. График функции $V(t)$. Г. Трехмерное представление траектории изменения параметров g , V , t в ходе одного цикла ДМП (красная линия). На проекциях представлены графики функций: $g(V)$ – пурпурный, $g(t)$ – зеленый и $V(t)$ – синий. Стрелками показано направление хода времени.

В Главе 3 описываются шаги, приводящие к созданию модели процесса изменения МП в ходе дефекационной моторной программы нематоды *H. megidis*. Продолжительная небольшая искусственная деполяризация клеток кишечника нематоды замедляет ритм изменений МП, увеличивая длительность периода колебаний. Продолжительная небольшая искусственная гиперполяризация ускоряет генерацию ритма, создавая более интенсивную активность и сокращая период колебаний (Рисунок 2ЖЗ).

В ходе исследования возможности перезапуска ритма было обнаружено, что короткий, но интенсивный гиперполяризационный импульс может вызвать ГПД в клетках кишечника нематоды *H. megidis*, но аналогичный импульс деполяризационного тока не оказывает никакого влияния на период ритмических изменений МП. Это указывает на вовлеченность в процесс

генерации ритма потенциал зависимых механизмов и асимметрию реакции клеток кишечника нематоды на воздействие разных типов импульсов. Однако в условиях экспериментов с двухэлектродной фиксацией потенциала на изолированных клетках кишечника, осцилляции тока продолжают продолжаться при стабильном заданном МП. Учитывая эти результаты, представляется вероятным наличие двух различных механизмов водителя ритма, регулирующих как ритмическое изменение МП, так и ДМП в целом: связанный с потенциал-зависимыми ионными каналами, и основанный на работе внутриклеточных молекулярных механизмов.

Не исключено, что зарегистрированные Ca^{2+} осцилляции преимущественно зависят только от внутриклеточного IP_3 -индуцированного механизма, циклично осуществляющего высвобождение кальция из ЭПР и его последующую реабсорбцию, и не имеют никакого воздействия на изменение уровня МП (Рисунок 5А).

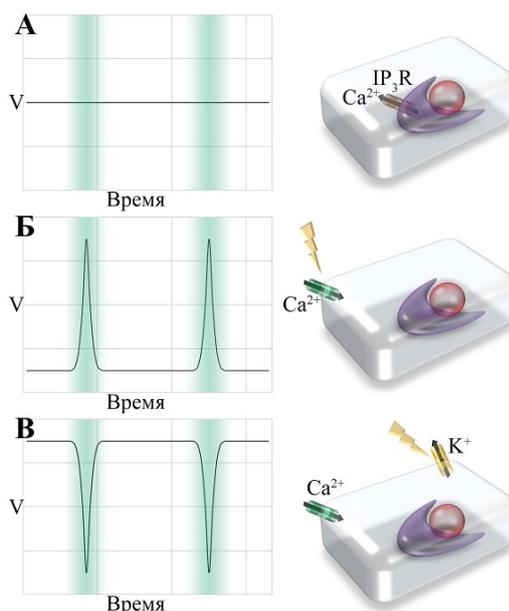


Рисунок 5 – Вариации механизма изменения мембранного потенциала клеток кишечника нематоды синхронизованного с Ca^{2+} волнами На графиках (слева) отмечен МП $V(t)$ и повышение концентрации Ca^{2+} в клетке (циановая полоса) для трех теоретических механизмов (справа). А. IP_3R зависимое высвобождение Ca^{2+} из ЭПР. Увеличение концентрации Ca^{2+} за счет внутриклеточных запасов не имеет существенного влияния на МП. Б. Потенциал зависимый механизм возникновения Ca^{2+} волны. Открытие потенциал зависимых Ca^{2+} каналов приводит к деполяризации мембраны клетки. В. Механизм, основанный на свойствах каналов утечки. Открытие потенциал зависимых K^+ каналов приводит к гиперполяризации мембраны клетки, а по каналам утечки из-за возникшей разницы потенциала происходит вход ионов Ca^{2+} .

Механизмом, обуславливающим изменение МП в зависимости от изменения концентрации Ca^{2+} аналогично возбудимым клеткам, является деполяризационный спайк (ДПД). Его действие основывается на работе потенциал-зависимых каналов, способных индуцировать ПД (Рисунок 5Б).

Иным механизмом, является гиперполяризационный спайк. Вероятно, механизм ГПД связан с работой K^+ каналов, так открытие K^+ каналов, способно вызвать быстрый вывод калия из клетки приводить к гиперполяризации мембраны (Рисунок 5В). Параллельно этому, за счет возникающего электрического градиента, Ca^{2+} активно проникает в клетку через каналы утечки.

Мы предполагаем, что ГПД создается благодаря специфическим потенциал-зависимым ионным каналам в плазматической мембране клетки, и что для исследуемого процесса изменения МП у нематод, первый и второй механизмы изменения МП от изменения концентрации Ca^{2+} , имеют определенный вклад и взаимодействуют между собой. На основе собранных данных была создана простейшая модель исследуемой системы, состоящей из трех типов ионных каналов плазматической мембраны с проводимостями g_{a1} , g_{a2} и g_b (Рисунок 6). На Рисунке 8 проводимость канала (зеленым) моделируется в соответствии с экспериментальными данными, что позволяет получить рассчитанное значение МП (синим). Суперпозиция всех трех проводимостей g_{a1} , g_{a2} , g_b и рассчитанный МП схожи (Рисунок 6Д) на паттерн реальной записи (вставки на Рисунке 6Д).

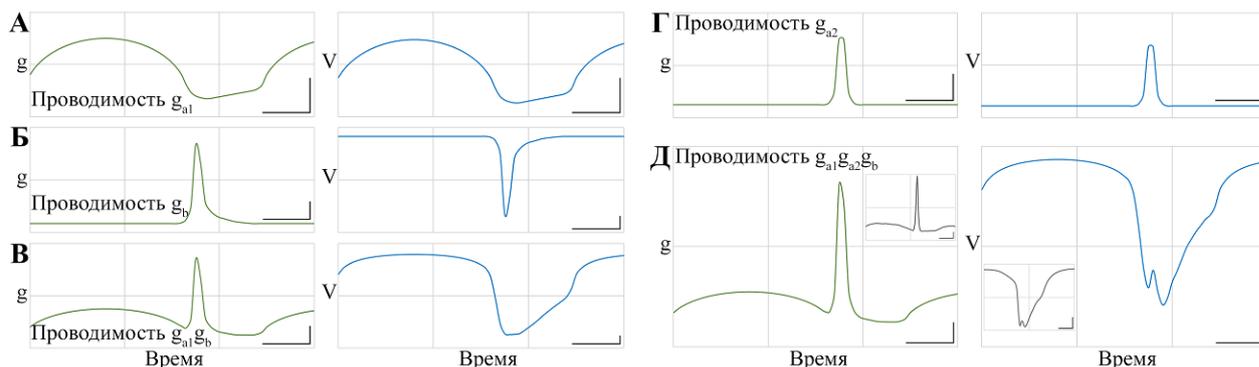


Рисунок 6 – Модель суперпозиции трех ионных каналов, обуславливающих наблюдаемые изменения мембранного потенциала в клетках кишечника нематоды *Heterorhabditis megidis* Полтора цикла изменений проводимости $g(t)$ в ходе ДМП обозначены зеленым цветом, а результирующие изменения МП $V(t)$, высчитанные согласно формулам (4)-(6) и закону Ома синим. Калибровка на каждом графике составляет 10 сек; 0,2 мкс (для проводимости); 15 мВ (для МП). А. Смоделированная на основе данных нетипичного хода ДМП изменения проводимости ионного канала g_{a1} и вызванные этим осцилляции МП. Б. Аналогичная модель для проводимости g_b . В. Суммарное изменение проводимости и МП для клетки с двумя типами ионных каналов g_{a1} и g_b . Г. Простейшее изменение проводимости при открытии канала g_{a2} и высчитанное на основе этих данных значение изменения потенциала. Д. Суперпозиция изменения проводимости от трех типов ионных каналов g_{a1} , g_{a2} , g_b и МП, Полученный результат моделирования близок к реальным экспериментальным данным, представленным в микровставках.

В Главе 4 Описан поиск и анализ потенциальных МП белков – участников дефекационной моторной программы. Как ионных каналов, соответствующих проводимостям g_{a1} , g_{a2} и g_b , так и иных молекулярных агентов, необходимых для осуществления ДМП.

Предсказанные ранее в модели каналы с проводимостями g_{a1} , g_{a2} и g_b , возможно, являются гомологами уже известных Na^+ , Ca^{2+} и K^+ каналов, описанных для *C. elegans*. На основе данных секвенирования РНК ОК, были составлены кластерная карта с дендрограммой и UMAP. Исследование охватывает два набора данных. 20271 ген или полный набор и 222 гена мембранных белков. Эти данные иллюстрируют функциональную кластеризацию генов мембранных белков *C. elegans* по разным типам тканей, подчеркивая, что большинство из них тканеспецифичны (Рисунок 7), что сильно сужает поиск потенциальных кандидатов.

Деполаризующий ионный канал с проводимостью g_{a1} мог бы являться Na^+ ионным каналом. Геномы нематод не кодируют потенциал-зависимые натриевые каналы. Данные секвенирования РНК ОК показали, что пять генов иного семейства, включая *acd-5*, *flr-1*, *del-5*,

acd-1 и *acd-2*, экспрессируются в клетках кишечника значительно сильнее по сравнению с другими тканями). В то же время, мутанты с потерей функции *flr-1* показывают сокращенные периоды цикла дефекации и одновременно низкую эффективность этого процесса.

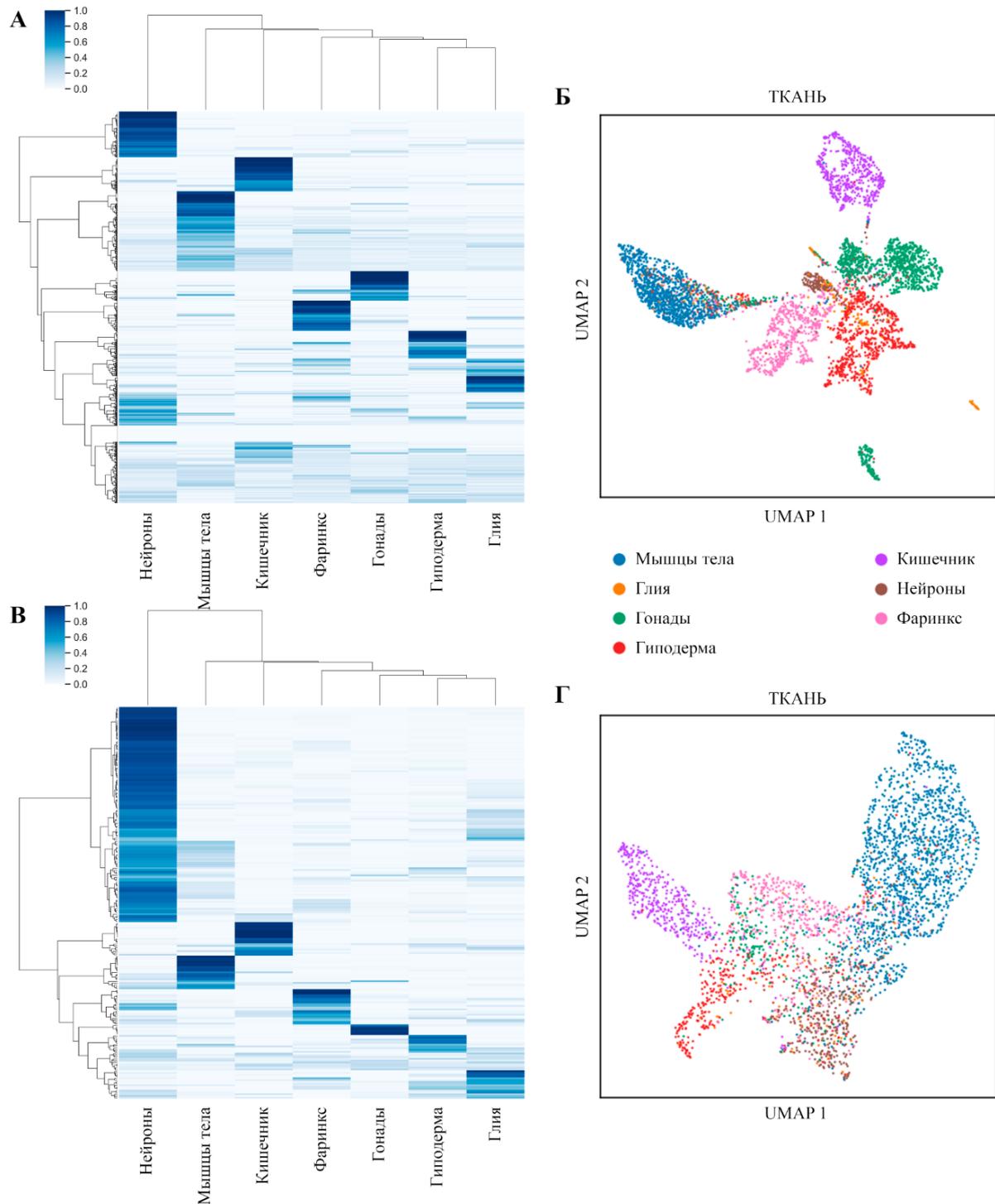


Рисунок 7 – Схожесть и различия тканеспецифичной дифференциальной экспрессия генов нематоды *Caenorhabditis elegans* Кластерная карта с дендрограммой (А, В) и метод уменьшения размерности UMAP (Б, Г) для данных секвенирования РНК ОК об экспрессии всех генов *C. elegans* (А, Б) и только мембранных белков (В, Г). Аннотация от клетки к ткани была получена из исходного набора данных. При построении кластерная карта с дендрограммой А, В для каждого гена было рассчитано соотношение экспрессии гена в специфичной ткани к общей

экспрессии этого гена. (Значение экспрессии для каждого гена в каждой ткани делили на сумму всех значений экспрессии гена для каждой ткани). Значения варьируются от 0 до 1, сумма для каждого гена равна 1. Данные сгруппированы с помощью метода Уорда. Гены с высокой мультитканевой экспрессией практически не наблюдаются. Б. UMAP сгенерированный на основе данных об экспрессии всех генов, образует очевидные кластеры. Д. Аналогичный UMAP, сгенерированный на основе данных об экспрессии 222 мембранных белков дифференцирован в меньшей степени, но клетки кишечной ткани демонстрируют результаты, аналогичные результатам UMAP по экспрессии всех генов. Выбранный набор генов мембранных белков каналов также является тканеспецифичным.

Работа ионного канала с проводимостью g_{a2} по всей видимости сопряжена с изменением концентрации ионов Ca^{2+} . Анализ данных секвенирования РНК ОК выявил, что экспрессия потенциал-зависимых натриевых каналов в кишечнике существенно ниже, чем в стандартных возбудимых тканях. Было предложено, что в данной роли могут быть привлечены каналы из семейства TRP. Три из 23 гена TRP — *gtl-1*, *trpl-2* и *trpl-5* — активно экспрессируются в клетках кишечника, в отличие от других тканей. Данные WormBase указывают на мутантный фенотип *gtl-1*, который связан с нарушениями в процессе дефекации.

Предполагается, что источником самоподдерживающейся и усиливающейся гиперполяризации плазматической мембраны является K^+ канал, показанный в модели как «г_в проводимость». Первым кандидатом на роль белка, вовлеченного в генерацию ГПД нематод, выступил белок EXP-2. Однако согласно данным секвенирования РНК ОК была выявлена значительная дифференциальная экспрессия гена *exp-2* только лишь в фаринксе *C. elegans*. По данным секвенирования РНК ОК, два калиевых потенциал-зависимых ионных канала из семейства KQT K^+ (KQT-2 и KQT-3) сверхэкспрессируются в клетках кишечника.

В отличие от ионных каналов, транспортеры работают медленнее, однако ультрадианные изменения МП в кишечнике нематод намного медленнее обычного ПД, и активность транспортеров/обменников может оказаться критической для подобных осцилляций. Интересно, что данные секвенирования РНК ОК указывают на сильную дифференциальную экспрессию генов транспортеров и обменников в клетках кишечника.

Анализ РНК ОК выявил, что три белка иннексинов/паннексинов (*inx-16*, *inx-17* и *inx-15*) особенно активно экспрессируются в кишечных клетках Мутаций *inx-16* (*ox144*), при которых отмечался запорный фенотип, показали, что INX-16 имеет ключевое значение для синхронизации кишечных клеток.

В **Главе 5** проведен сравнительный анализ электрофизиологических аспектов дефекационной моторной программы различных нематод. Вопрос о том, является ли обнаруженный механизм контроля дефекации специфичной особенностью нематод порядка Rhabditida или общей чертой всех нематод, оставался открытым. В связи с этим было проведено исследование на Euplida, одной из эволюционно удаленных групп нематод от Rhabditida. Особое внимание в ходе исследования было уделено изменениям МП и электрофизиологическим свойствам клеток кишечника *E. brevis*. Было показано, что аналогично *H. megidis*, клетки тесно связаны между собой электрически через ЩК.

В исследованиях на нематоде *E. brevis*, также были обнаружены ритмические изменения уровня МП (Рисунок 8). Эти изменения напоминают осцилляции, зафиксированные у *H. megidis*. Более того, было выявлено, что клетки кишечника *E. brevis*, подобно *H. megidis*, связаны между собой электрически через ЩК. Эти результаты указывают на возможность того, что ритмический механизм генерации ДМП, может быть общим для разных видов нематод.

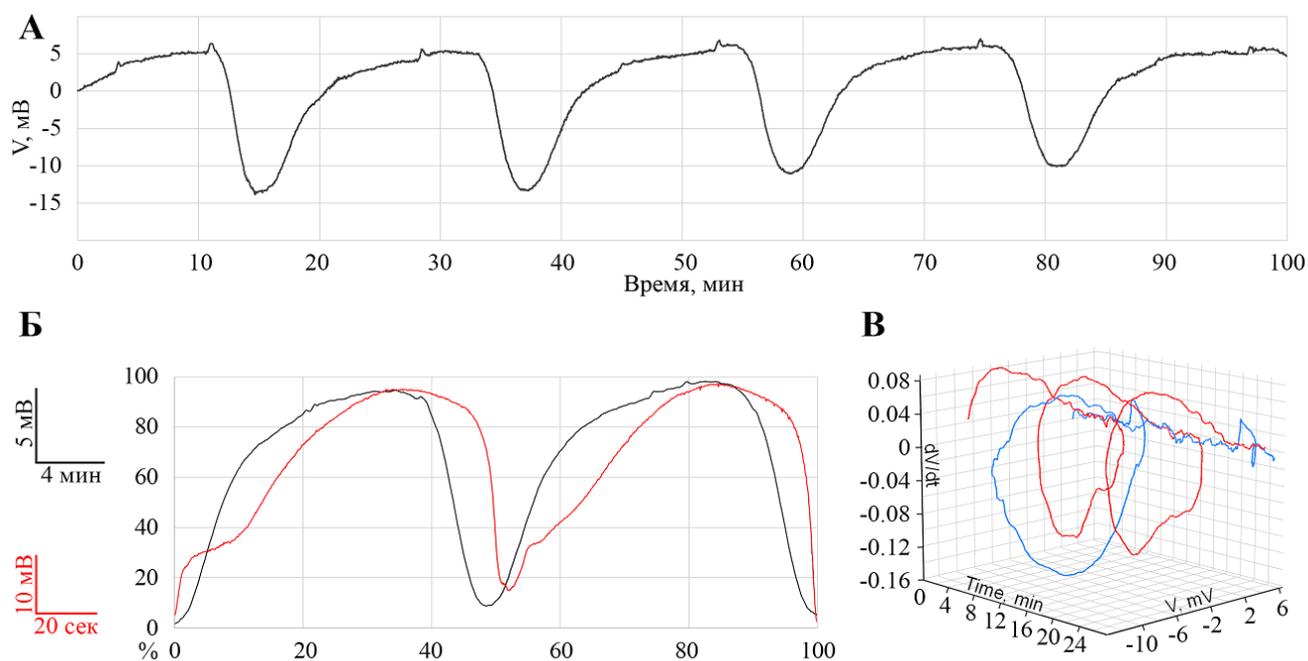


Рисунок 8 – Сравнение электрофизиологических характеристик осцилляций в клетках кишечника различных нематод А. Типичное изменение МП в клетках кишечника *E. brevis*. Б. Сравнение МП клеток кишечника *E. brevis* (черный) и *H. megidis* (красный). Для сравнения проведена нормализация периода и амплитуды из нескольких циклов различных образцов. Горизонтальная ось – процент времени; вертикальная ось – процент изменения МП. Характер циклических изменений для обоих видов сходен. Фактическое время и потенциал представлены в легенде слева цветом, соответствующим цвету нормализованной кривой изменений МП. В: 3D график, показывающий динамику изменения МП t (время), V (потенциал), dV/dt (скорость изменения МП) для двух образцов *E. brevis*, имеющих схожий паттерн, но наибольшие различия в периоде колебаний.

Мы сосредоточились на анализе четырех ключевых генов – *aex-2*, *nlp-40*, *pbo-5/6* и *exp-1*, которые считаются критически важными для функционирования ДМП у *C. elegans*. Мы провели ВВН для этих генов среди 18 доступных в настоящее время полных геномов представителей типа Нематоды, а также филогенетический анализ большого суперсемейства Cys-loop лиганд-связанных ионных каналов, в который входят белки PBO-5/6 и EXP-1

Было обнаружено, что восемь видов нематод обладают всеми четырьмя исследуемыми генами – *aex-2*, *nlp-40*, *pbo-5* и *exp-1* (Рисунок 9). Еще два вида имеют ген *nlp-40*, но у них отсутствует *pbo-5*. Семь видов лишены как *pbo-5*, так и *nlp-40*. Особо примечательным является один вид, у которого не обнаружены все четыре гена, необходимые для ДМП. *R. culicivora*, паразитическая мермитида с дегенерировавшей пищеварительной системой потеряла все четыре гена. Тот факт, что эти гены были найдены у филогенетически разнообразных видов, включая *E. brevis*, который занимает важное место в корне филогенетического дерева Nematoda, позволяет предположить, что их общий предок, вероятно, обладал всеми четырьмя характерными генами ДМП.

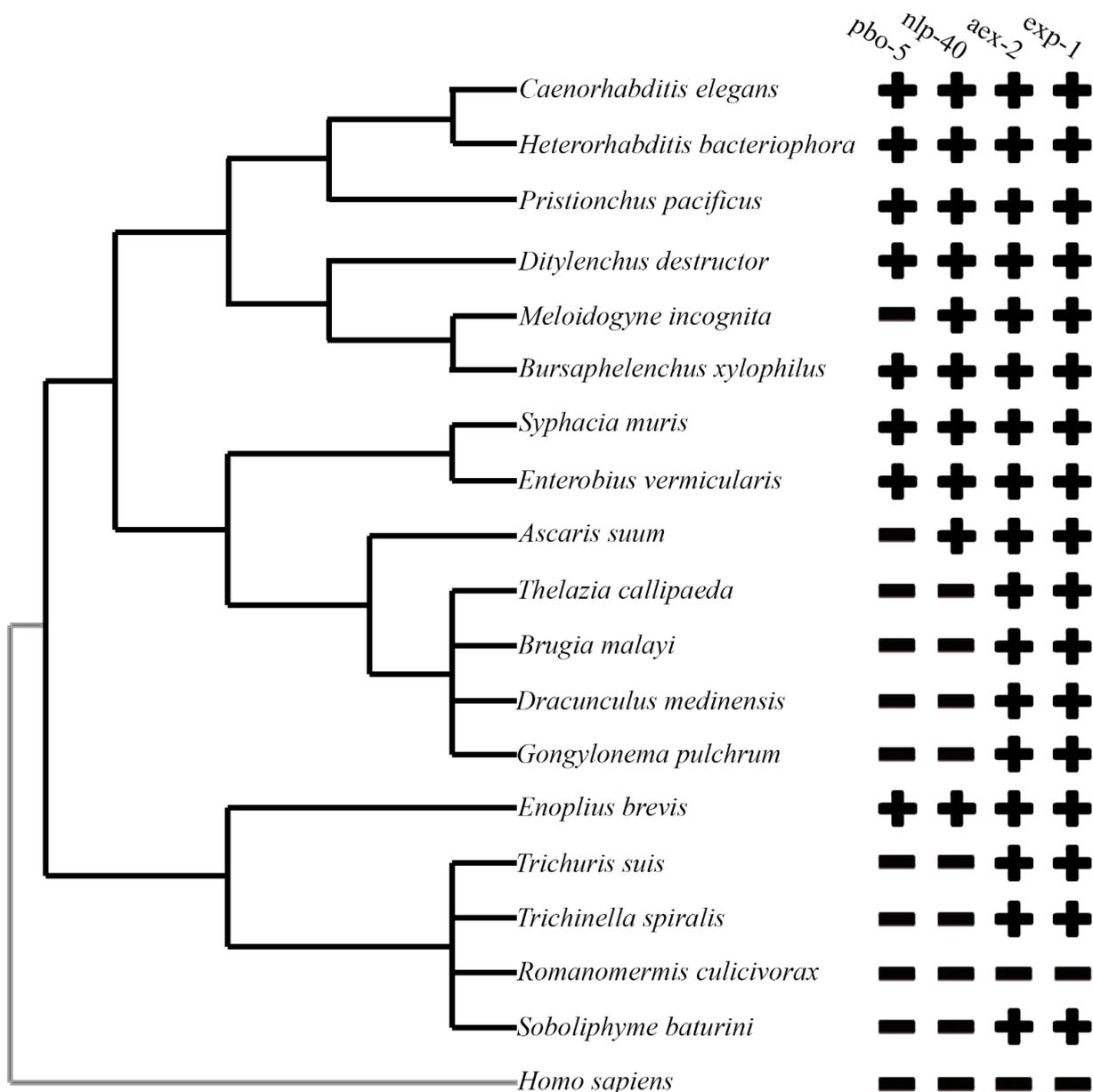


Рисунок 9 – Кладограмма нематод показывающая наличие четырех характерных белков участвующих в процессе дефекации нематод у различных видов Вид *Homo sapiens* отобран как аутгруппа. Наличие характерного белка отмечено плюсом, а отсутствие минусом.

Для проверки сделанных предсказаний был проведен физиологический эксперимент, на мышцы нематод воздействовали различными химическими агентами. Подкисление среды вокруг задних мышц тела вызывало их сокращение для *E. brevis* (Рисунок 10Б), в то время как для *R. culicivorax* такой реакции не наблюдалось (Рисунок 10Д). Введение ацетилхолина вызывало сокращение мышц у обоих видов: как у *E. brevis*, так и у *R. culicivorax* (Рисунок 10В, Е).

Эти физиологические эксперименты подтверждают наши биоинформатические предсказания о генах, связанных с ДМП у нематод. Таким образом, наше биоинформатическое и физиологическое исследование показывает, что сложный механизм ДМП, впервые обнаруженный у *C. elegans*, не является уникальным только для этого вида, а представляет собой характерное биологическое явление для нематод, возникшее у их общего предка.

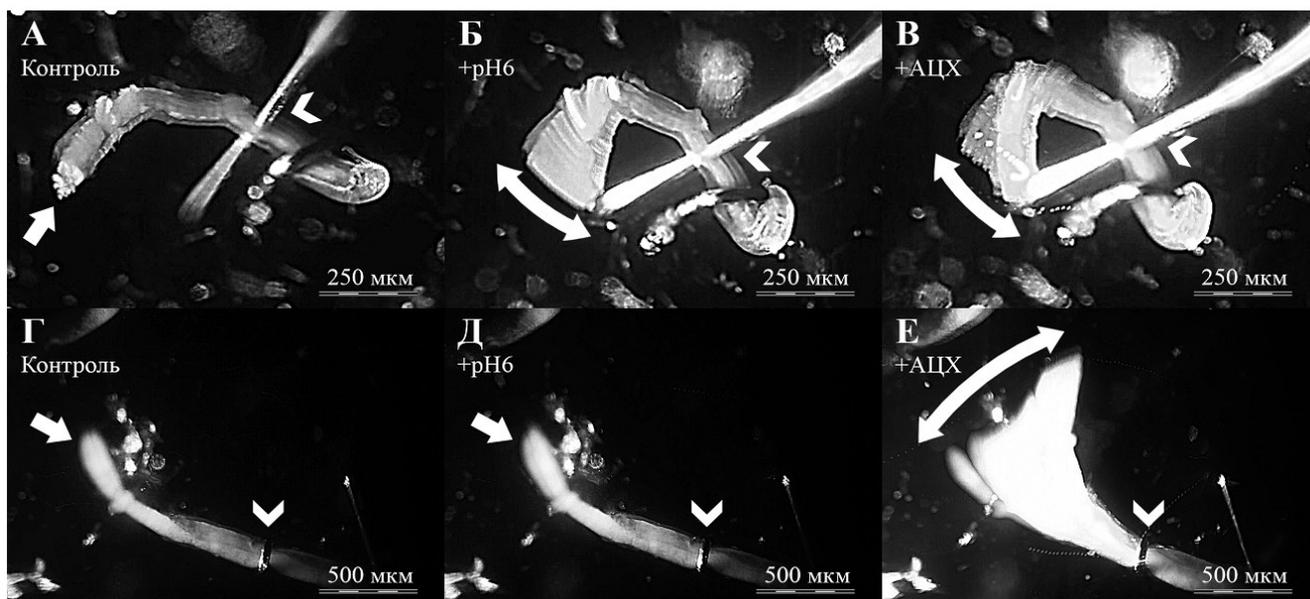


Рисунок 10 – Сокращение мышц тела нематод на различные химические агенты
 Временные проекции по максимальной интенсивности, показывающие влияние подкисления (+рН6 Б, Д) и ацетилхолина (+АЦХ В, Г) на сокращение мышц тела нематод *E. brevis* (А-В) и *R. culicivora* (Г-Е). Препараты задней части тела с обнаженными мышцами закрепляли на подложке тонкими металлическими иглами или скобками (белый наконечник стрелы), фиксируя одну точку и позволяя свободному концу (белая стрелка) свободно перемещаться. Между добавлением химических агентов проводилась отмывка. При наличии сокращения или расслабления мышц вся траектория движения складывается в единую проекцию (показано двойными стрелками). Добавление среды в контрольных экспериментах (Контроль А, Г), не дало эффекта. Применение подкисленной среды (+рН 6 Б, Д) активировало работу мышцы *E. brevis*, но не имело эффекта на *R. culicivora*. В положительном контроле при применении АЦХ (10^{-6} М) наличие сокращения наблюдалось у обоих видов (В, Е).

Глава 6 производит сравнение энтодермальных клеток кишки нематод и классических нейронов. Клетки кишечника нематод выполняют множество функций, сравнимых с работой нейронов (Рисунок 11). Способность перезапуска генерируемого ритмического сигнала двумя способами: через механическое воздействие или прямую электрическую стимуляцию напоминает функции афферентных сенсорных клеток в нервной системе.

Для *C. elegans* не было обнаружено функциональных или анатомических синапсов между нервной системой и кишечником. Однако механизмы передачи сигналов от клеток кишечника к другим клеткам в нематодах можно сравнивать с синаптическими функциями нейронов. Выброс протонов как сигнальной молекулы не имеет аналогов в нейронных синапсах, однако протонные рецепторы мышечных клеток PBO-5/PBO-6, вероятно, эволюционно произошли от обычных постсинаптических N-ацетилхолиновых рецепторов.

Пресинаптический аппарат в клетках кишечника нематод, хотя и отличается от традиционных нейронных структур, выполняет схожие функции. Кишечный пресинапс может функционировать аналогично обычному пресинапсу, где повышение концентрации кальция стимулирует высвобождение медиатора. При анализе РНК одиночных клеток нами были обнаружено, что все участники синаптического SNARE-комплекса млекопитающих, имеют свои ортологи среди белков нематод.

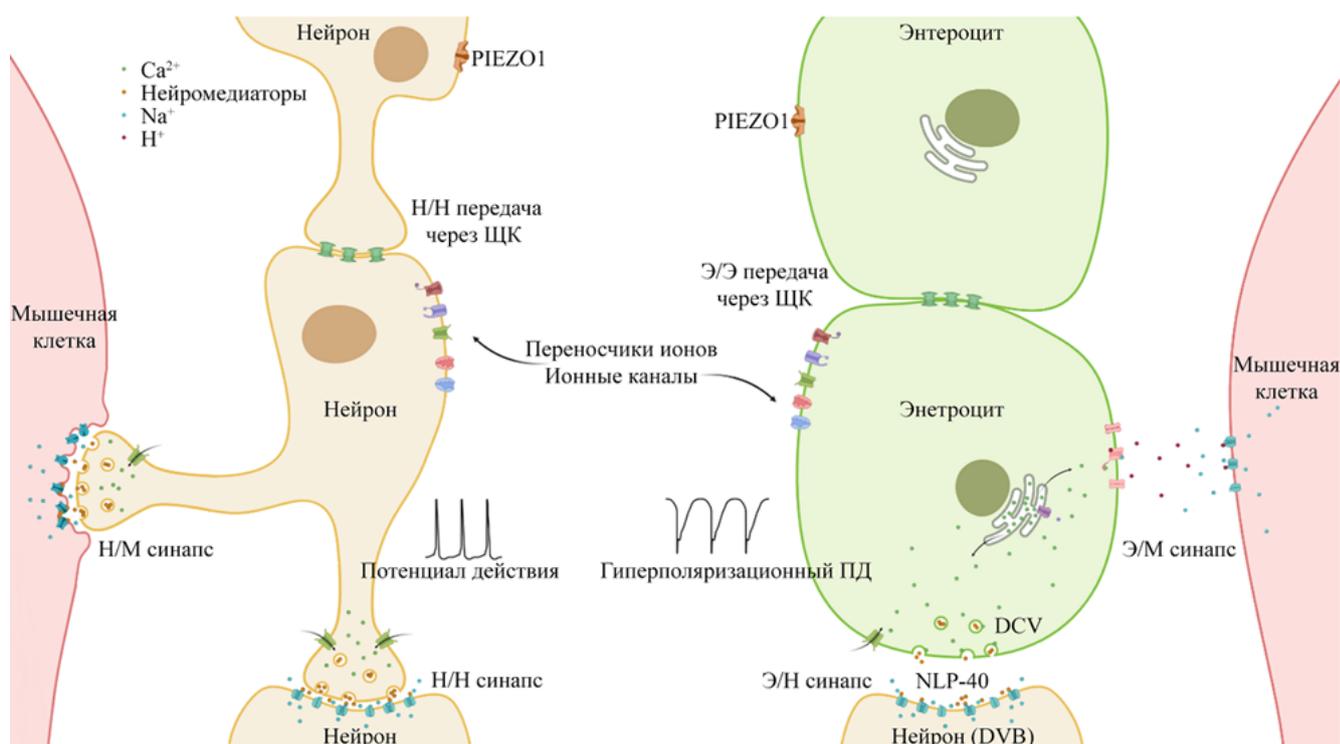


Рисунок 11 – Сравнение работы классического нейрона (бежевая, слева) и энтероцита кишечника нематоды (зеленый, справа) Оба типа клеток разделяют схожие механизмы передачи сигналов. После получения сигнала (PIEZO1), сенсорный нейрон передает сигнал другому нейрону посредством электрического синапса посредством ШЖ (зеленые бочонки; Н/Н передача через ШЖ) или посредством химического синапса (Н/Н синапс). Передача сигнала от нейронов к мышцам также включает химический синапс (Н/М синапс). Потенциал-зависимые ионные каналы нейронов участвуют в генерации быстрого деполяризационного изменения МП, работающего по принципу всё-или-ничего (ПД). Аналогичный паттерн распространения сигнала прослеживается и для энтероцитов кишечника нематод. После получения сигнала от внешних стимулов (PIEZO1), энтероцит передает сигнал дальше другому энтероциту посредством электрического синапса через ШЖ (зеленые бочонки; Э/Э передача через ШЖ). Передача сигнала к другим возбудимым тканям, включая нейроны, подразумевает формирование синапсов со сложным постсинаптическим аппаратом, зависимым от ионов Ca²⁺. Э/Н синапс между энтероцитом и нейроном осуществляется при помощи медиатора NLP-40, а Э/М синапс между энтероцитом и мышечной клеткой посредством прямой ацидификации псевдоцеломического пространства и работой протонных рецепторов PBO-5/PBO-6. Сигнал, генерируемый энтероцитами нематоды является гиперполяризационным ПД – быстрым гиперполяризационным изменением МП, работающего по принципу всё-или-ничего. Оба типа клеток электрически активны и имеют множество различных ионных каналов на своих мембранах. Ионы Ca²⁺ и каналы Ca²⁺ окрашены в зеленый цвет. Нейромедиаторы окрашены в оранжевый цвет. Ионы Na⁺ и каналы Na⁺ (в основном рецепторы нейромедиаторов) окрашены в синий цвет. Ионы H⁺ и транспортеры H⁺ окрашены в малиновый цвет. ЭПР в энтероцитах кишечника, служащий основным хранилищем Ca²⁺, окрашен зелено-белым, а IP₃R – пурпурным.

Глава 7 посвящена описанию материалов и методов проведения экспериментов, представленных в главах 1-6.

Заключение

В ходе исследований было выявлено наличие необычного изменения МП в клетках кишки нематоды *Heterorhabditis megidis*, представленного как модельный организм. Были зарегистрированы и проанализированы базовые характеристики ритма и сопоставлено реальное поведение с наблюдаемыми клеточными процессами. Была построена простейшая модель наблюдаемых осцилляций и представлены потенциальные молекулярные участники механизма.

Проведено эволюционное исследование, в ходе которого было показано, что наблюдаемые изменения присущи всему филуму Nematoda и, вероятно появились у общего предка. Физиологические эксперименты подтверждают биоинформатические предсказания о генах, связанных с ДМП.

Хотя эндодерма обычно не считается возбудимой тканью, электрические волны в кишечнике нематод напоминают потенциалы действия в возбудимых клетках. Исследование демонстрирует параллели между клетками кишечника нематод и возбудимыми клетками, такими как нейроны или мышечные клетки, расширяя традиционные представления о функциях различных клеток.

Дальнейшие исследования могут быть направлены на использование различных химических агентов и специфичных сред для получения более детальной информации о вовлеченности и свойствах предсказанных белков.

Выводы

1. Обнаружен новый тип ритмического изменения МП в новой модельной системе, нематоды – *Heterorhabditis megidis*. Обнаруженные изменения удивительно схожи с классическим ПД возбудимых клеток, имеют обратную полярность, схожую амплитуду и намного больший период колебаний. Синхронизация процесса и передача сигнала от клетки к клетке в исследуемой системе происходит посредством ШК, обеспечивающих высокий коэффициент электрической связи.

2. Механизм исследуемого ритмического поведения показывает двоякую природу. Некоторые характеристики работы ЦП являются потенциал-зависимыми, как например, возможность перезапуска при сильной краткосрочной гиперполяризации или замедление/ускорение ритма продолжительной деполяризации/гиперполяризации соответственно. Помимо этого, есть и потенциал-независимый аспект. Осцилляции продолжаются даже в экспериментах с продолжительной фиксацией потенциала на различных уровнях. Наблюдаемые колебания МП синхронизованы с кальциевой волной в клетках кишечника и наблюдались как в целом организме, зафиксированном в агарозном геле, так и в системе из нескольких изолированных клеток, так и в фрагментах передней или задней части нематоды.

3. На основании изменения базовых характеристик ритмического процесса с течением времени, исследуемый процесс был поделен на 6 фаз. Опираясь на эти данные для энтодермальных клеток нематоды *H. megidis*, была создана простейшая модель, включающая три типа проводимости (три типа ионных каналов). Для каждого типа проводимости были представлены возможные участники данного процесса, предсказанные учитывая известные литературные данные и биоинформатический анализ баз данных и данных scRNA-seq. Учитывая литературные данные и проведенные исследования, было показано, что ДМП является более комплексным процессом, чем генерация внутриклеточных колебаний МП и показана схожесть

исследуемого процесса с процессами в классических возбудимых тканях. Сгенерированный в энтодермальных клетках потенциал способен передаваться от клетки к клетке. Передача осуществляется как за счет электрических связей между клетками, обусловленных ШК, так и при помощи выброса медиаторов из клеток кишечника.

4. На основе анализа наличия белков, вовлеченных в ДМП сделано предсказание наличия и разнообразия механизма у эволюционно отдаленных видов нематод и проведено фармакологическое физиологическое исследование, подтверждающее полученные в ходе анализа данные. Показано наличие схожего ультрадианного ритма и подсчитаны базовые характеристики осцилляций для изменения МП нематоды *E. brevis*.

Список публикаций по теме диссертации

1. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Voronov D.A., Panchin Y. V. Electrophysiology of the rhythmic defecation program in nematode *Heterorhabditis megidis*. // Scientific Reports. – 2017. – 7(1), 17834. doi.org/10.1038/S41598-017-18118-Y

2. Slivko-Koltchik G.A., **Kuznetsov V.P.**, Panchin Y. V. Are there gap junctions without connexins or pannexins? // BMC Evol Biol. – 2019. – 19 (Suppl 1), 46. doi.org/10.1186/S12862-019-1369-4

3. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Popova L.B., Panchin Y. V. Gap junctions in nematodes. // Russ J Nematol. – 2016. – 24(1):1-16. doi:10.24412/cl-17707671

4. Slivko-Koltchik G.A., **Kuznetsov V.P.**, Voronov D.A., Panchin Y. V. Cyclic electrical activity in the intestine of marine nematode *Enoplus brevis*. // Russ J Nematol. – 2018. – 26(1):71-76. doi.org/10.24411/0869-6918-2018-10006

5. Slivko-Koltchik G.A., **Kuznetsov V.P.**, Mikhailov K.V., Voronov D.A., Panchin Y.V. Comparative analysis of nematode defaecation motor program. // Russ J Nematol. – 2018. – 26(2):115-122. doi.org/10.24411/0869-6918-2018-10011

6. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Isaev S.V., Voronov D.A., Panchin Y. V. Ion channels of the intestinal hyperpolarising action potential in nematodes. // Russ J Nematol. – 2019. – 27(2):69-81. doi.org/10.24411/0869-6918-2019-10008

7. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Drozd J.G., Panchin Y. V. Nematode midgut – the unique multifunctional body unit. // Russ J Nematol. – 2020. – 28(2):113-122. doi.org/10.24411/0869-6918-2020-10012

Результаты работы, опубликованные в сборниках тезисов международных конференций:

1. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Voronov D.A., Panchin YU. V. Electrophysiological study of gap junctions in *Heterorhabditis megidis* intestine cells. // 11-й Международный нематологический симпозиум Российского общества нематологов. Russian Journal of Nematology – 2015. – 23(2):74-79.

2. Slivko-Koltchik G.A., **Kuznetsov V.P.**, Panchin YU. V. Electrical oscillation potentials in intestine cells of nematode *Heterorhabditis megidis*. // 11-й Международный нематологический симпозиум Российского общества нематологов. Russian Journal of Nematology – 2015. – 23(2):80-83.

3. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Panchin Y. V. *H. megidis* – a new model organism for electrophysiological studies of the rhythmic oscillations in a nematode's gut // Сборник трудов 39-й междисциплинарной школы-конференции ИППИ РАН «Информационные технологии и системы 2015» – 2015. – 724-728 URL: <http://itas2015.iitp.ru/pdf/1570152441.pdf>
4. Slivko-Koltchik G.A., **Kuznetsov V.P.**, Panchin Y. V. Voltage dependent and intrinsic cellular mechanisms in an ultradian rhythm generator for nematode // Сборник трудов 39-й междисциплинарной школы-конференции ИППИ РАН «Информационные технологии и системы 2015» – 2015. – 730-733 URL: <http://itas2015.iitp.ru/pdf/1570152463.pdf>
5. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Panchin Y. V. Mechanism of membrane potential changes during *Heterorhabditis megidis* defecation program // Сборник трудов 41-й междисциплинарной школы-конференции ИППИ РАН «Информационные технологии и системы 2017» – 2017. – 142-146 URL: http://itas2017.iitp.ru/media/papers/1570374575_0pCnqzr.pdf
6. Panchin Y. V., **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Voronov D.A. Ion channels in defecation motor program in nematode *Heterorhabditis megidis* // Proceedings of 8-th International Moscow Conference. 2017 – 2017. – 166 URL: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_32563345_41611459.pdf
7. Slivko-Koltchik G.A., **Kuznetsov V.P.**, Voronov D.A., Panchin Y. V. Evolution of nematode defecation motor program // Contributions to the 5th Moscow International Conference «Molecular Phylogenetics and Biodiversity Biobanking». – 2018. – 116-118
8. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Voronov D.A., Panchin Y. V. Defecation motor program in nematodes // Сборник трудов 42-й междисциплинарной школы-конференции ИППИ РАН «Информационные технологии и системы 2018» – 2018. – 597-602 URL: <http://itas2018.iitp.ru/media/papers/1570472495.pdf>
9. **Kuznetsov V.P.**, Slivko-Koltchik G.A., Drozd J.G., Panchin Y. V. Gut synapses and enterocytes as interneurons // Сборник трудов 44-й междисциплинарной школы-конференции ИППИ РАН «Информационные технологии и системы 2020» – 2020. – 309-314 doi: 10.53921/itas2020_309