

В критический период эмбрионального развития серотонин ограничивает образование хромаффинных клеток медуллы надпочечников и меняет стратегии поведения потомков.

Надпочечники являются основным нейроэндокринным органом, продуцирующим катехоламины и регулирующим реакцию организма на стресс. Мы впервые обнаружили серотонин-опосредованный молекулярный механизм, контролирующий образование хромаффинных клеток надпочечников в эмбриогенезе и определяющий стратегии поведения особи в течение всей последующей жизни. В работе использовали самые современные подходы, от анализа транскриптома единичных клеток, прослеживания судьбы клеток-предшественников у генетически модифицированных животных, до анализа поведения лабораторных мышей и крыс и миграционных процессов в популяции диких полевков.

Мы показали, что серотонин лимитирует образование хромаффинных клеток, действуя через рецептор Htr3a клеток-предшественников и удлиняя их клеточный цикл (рис. 3). За счет этого повышенный уровень серотонина у плода в период образования хромаффинных клеток приводит к уменьшению размеров медуллы надпочечников и снижению секреции адреналина и норадреналина, что сохраняется в течение всей последующей жизни (рис. 1). Такие особи менее агрессивны и тревожны, зато более любознательны и дружелюбны. В дикой популяции полевков именно такие животные обеспечивают миграцию вида при волнах расселения у грызунов (рис. 2). В естественных условиях уровень серотонина в организме эмбриона очень лабилен и зависит от физиологического состояния матери. Обнаруженный нами серотонин-зависимый механизм эпигенетической регуляции (рис. 4) лежит в основе пренатального программирования долгосрочных изменений паттернов поведения потомков в постнатальной жизни, что обеспечивает адаптационную устойчивость вида и способствует освоению новых ареалов.

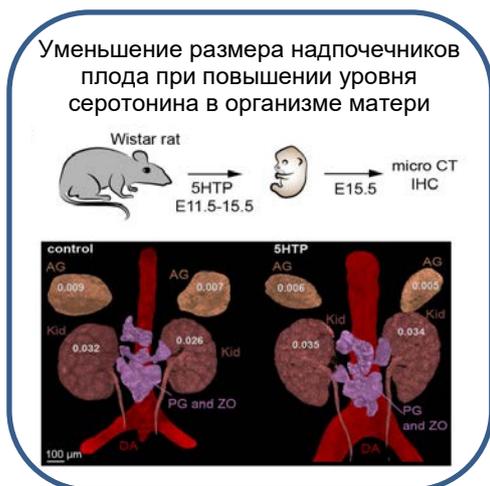


Рис. 1

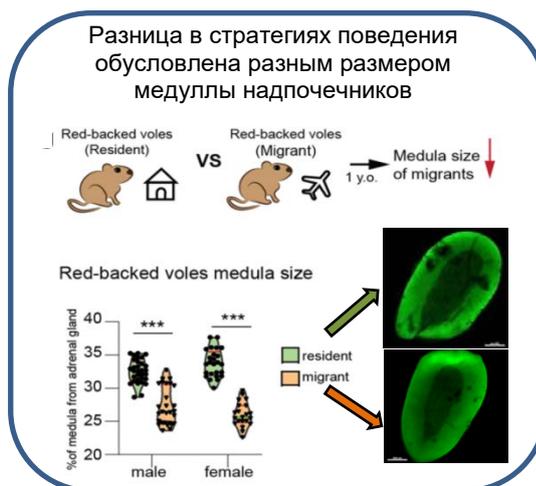


Рис. 2

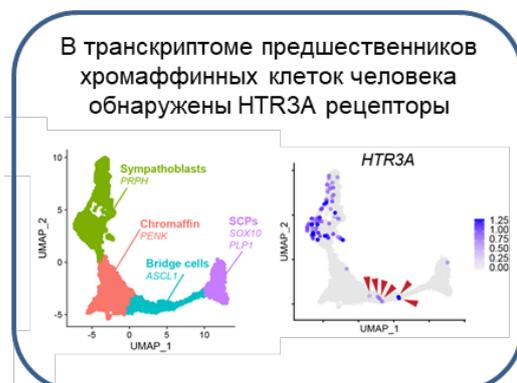


Рис. 3



Рис. 4

Совместный проект ИБР РАН и лаборатории профессора И.И. Адамейко в Медицинском Университете г. Вены (Австрия) и Каролинском Институте г. Стокгольм (Швеция). Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № # 17-14-01353, с использованием оборудования ЦКП ИБР РАН.

Kameneva P.#, Melnikova V.I.#, Kastriti M.E., Kurtova A., Kryukov E., Murtazina A., Faure L., Artemov A.V., Kalinina T.S., Kudryashov N.V., Bader M., Skoda J., Chlapek P., Curylova L., Sourada L., Neradil J., Tesarova M., Pasqualetti M., Gaspar P., Yakushov V.D., Sheftel B.I., Zikmund T., Kaiser J., Fried K., Alenina N., Voronezhskaya E.E.*, Adameyko I.* Serotonin limits generation of chromaffin cells during adrenal organ Development//Nature Communications. 2022. Vol. 13. Art. no 2901. DOI: 10.1038/s41467-022-30438-w. – Q1. #- авторы с равным участием * - авторы для переписки

Эпителиальная инвагинация - морфогенез, считающийся консервативным у Metazoa. Инвагинационная гастрюла рассматривается как базовая для разных таксонов, от кишечнополостных до хордовых. Мы показали, что в гастрюляции кишечнополостных, принадлежащих к разным классам – сцифоидная медуза *Aurelia aurita* и актиния *Nematostella vectensis*, – инвагинация, сходная на уровне макроморфологии, различается на клеточном уровне. Количество клеток, участвующих в инвагинации (рис. 1А, Б, Д, Е и рис. 1В, Г, И, К), динамика формы клеток архтерона (рис. 1Ж, З и рис. 1Л, М), стадия эпителиально-мезенхимального перехода (ЕМТ), которой могут достичь эти клетки (рис. 1Н), различаются у изученных видов. Мы показали, что инвагинация кишечнополостных - многокомпонентный процесс, включающий изгибание эпителия, инволюцию губы бластопора, а также миграцию клеток, подвергающихся ЕМТ. Важно, что относительная роль этих компонентов в инвагинации разных видов различается. Это позволяет говорить об отсутствии консервативности инвагинации на клеточном уровне. Данные по разнообразию вклада клеточных механизмов в инвагинацию – основа для изучения эволюции молекулярных механизмов гастрюляционных морфогенезов.

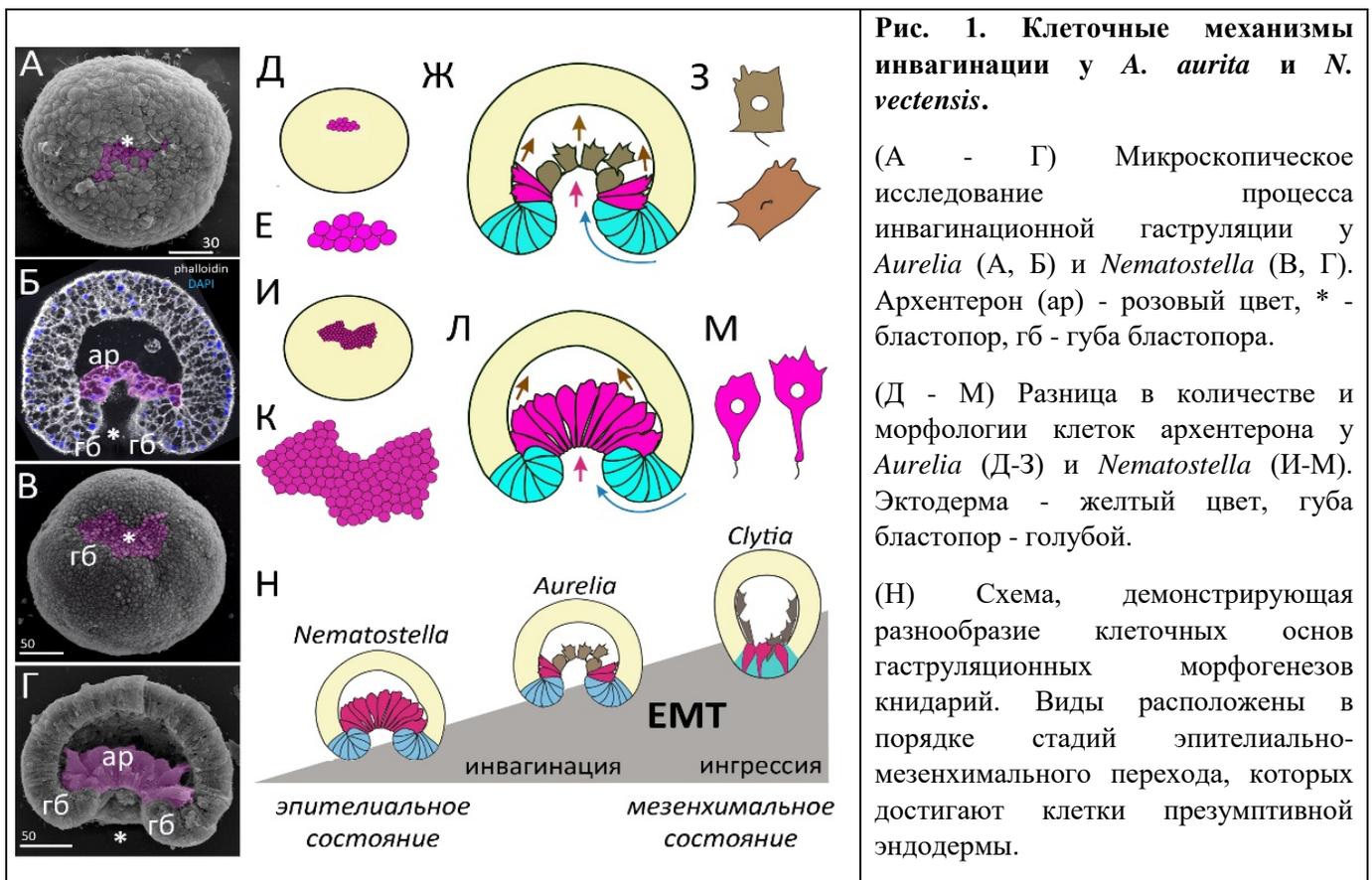


Рис. 1. Клеточные механизмы инвагинации у *A. aurita* и *N. vectensis*.

(А - Г) Микроскопическое исследование процесса инвагинационной гастрюляции у *Aurelia* (А, Б) и *Nematostella* (В, Г). Архтерон (ар) - розовый цвет, * - бластопор, гб - губа бластопора.

(Д - М) Разница в количестве и морфологии клеток архтерона у *Aurelia* (Д-З) и *Nematostella* (И-М). Эктодерма - желтый цвет, губа бластопор - голубой.

(Н) Схема, демонстрирующая разнообразие клеточных основ гастрюляционных морфогенезов кишечнополостных. Виды расположены в порядке стадий эпителиально-мезенхимального перехода, которых достигают клетки презумптивной энтодермы.

Важнейший практический результат 2022 - лаборатория клеточной биологии Воротеляк Е.А.

Совместно с МНИОИ им. П.А. Герцена была разработана методика реконструкции слизистой гортаноглотки с использованием преламинированных пекторальных лоскутов с аналогом эпителия слизистой оболочки из аутологических эпителиальных пластов. Девяти пациентам выполнена реконструкция гортаноглотки с использованием разработанной методики. Для создания биоинженерных лоскутов аутологичные эпителиальные клеточные пласты выращенные *in vitro* из клеток кожи (рис.1), были преламинированы на фасции большой грудной мышцы (рис.2). Через две недели преламинации лоскуты «на ножке» мобилизовали от грудной стенки и перемещали на область дефекта, ориентируя эпителием в просвет глотки. Во всех случаях у пациентов было восстановлено пероральное питание. Многослойный плоский эпителий на фасции пекторального лоскута выявлен в 67% случаев через 2 недели после преламинации, в 89% случаев через 4 недели после реконструкции и в 100% случаев через 3, 6, 12, 24 месяцев после реконструкции (рис).

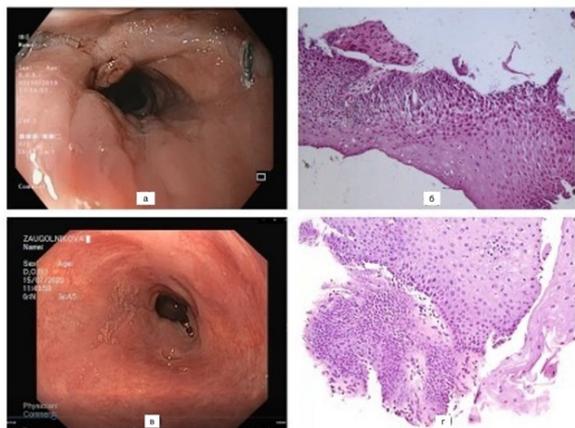


Рисунок 1. Подготовка клеточного трансплантата: культура аутологических кератиноцитов больного через 4 недели культивирования: (а) фазовый-контраст; (б) иммунофлуоресцентное обнаружение специфического маркера кератиноцитов - sk14 (зеленое окрашивание); специфического эпидермального фактора транскрипции p63 (красное окрашивание), ядра окрашены DAPI (синее окрашивание). Готовый к использованию трансплантат, внешний вид (в) Микрофотография кератиноцитов человека, выращенных на поверхности матрицы выращенных на поверхности матрикса, выявление жизнеспособных клеток с помощью витального красителя Calcein AM (зеленое окрашивание) (г).

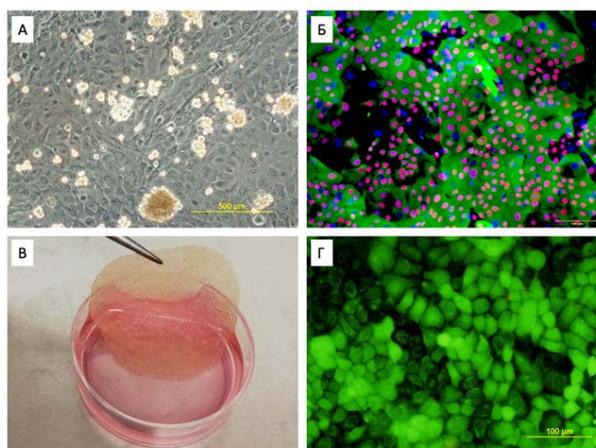
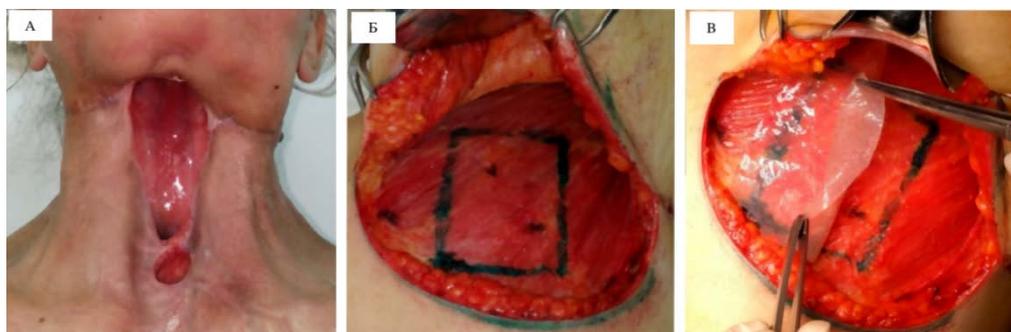


Рисунок 2. (а) Пациентка с фарингостомой после комбинированного лечения рака гортани IVa стадии; (б) хирургический доступ для преламинации; (в) имплантация пласта эпителиальных клеток на фасцию большой грудной мышцы.

Рис. 3. (а) Видеофарингоскопия через 4 недели после фарингопластики; (б) Гематоксилин и эозин (ГиЭ), при 100-кратном увеличении показан многослойный плоский эпителий; (в) видеофарингоскопия через 24 месяца после фарингопластики; (г) Гематоксилин и эозин (ГиЭ), при 100-кратном увеличении показан многослойный плоский эпителий с пролиферацией базальных слоев.



Публикация:

1. И.В. Ребрикова, Е.А. Воротеляк, О.С. Рогова, А.П. Поляков, А.В. Мордовский, М.В. Ратушный, А.Д. Каприн, А.В. Васильев. Реконструкция гортаноглотки с использованием аутологических тканеинженерных эпителизованных лоскутов // Вестник трансплантологии и искусственных органов -2022. №4, С. 135 – 145. Q4.

Лаборатория клеточной биологии

Лаборатория биохимии процессов онтогенеза

50 Биология развития и эволюция живых систем

В клеточной модели лице-плече-лопаточной мышечной дистрофии (FSHD) показано, что миобласты от больных доноров стимулируют миграцию и пролиферацию мезенхимальных стромальных клеток (МСК). Используя синтетический ингибитор рецептора CXCR4 (AMD3100) и нейтрализующие антитела к этому рецептору, показали, что сигнальная ось CXCL12-CXCR4 вовлечена в индуцируемую миобластами миграцию МСК. Секретируемые миобластами от больных доноров факторы стимулируют пролиферацию МСК. В условиях воспаления кондиционированная миобластами среда стимулирует секрецию белков внеклеточного матрикса, в частности коллагена (рис.1). Присутствие МСК тормозит дифференцировку миобластов в миотубулы (рис.2).

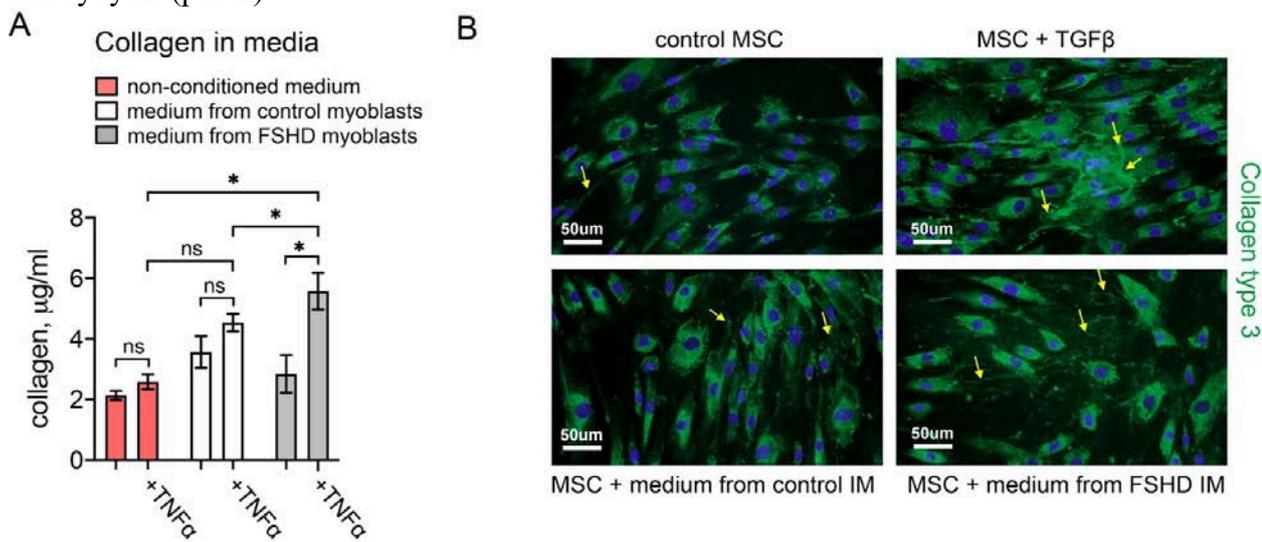


Рисунок 1. Кондиционированная миобластами от больных доноров (FSHD myoblasts) в условиях воспаления стимулирует МСК секретировать коллаген. А – количественный анализ коллагена в среде культивирования; В – иммуноцитохимическое окрашивание на коллаген 3 типа в культурах МСК. Стрелки указывают на фибриллы коллагена во внеклеточном пространстве.

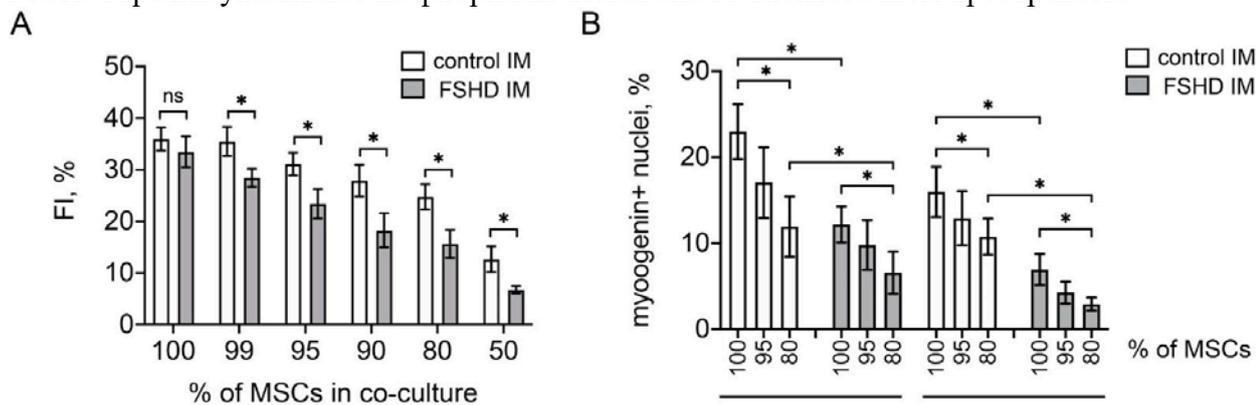
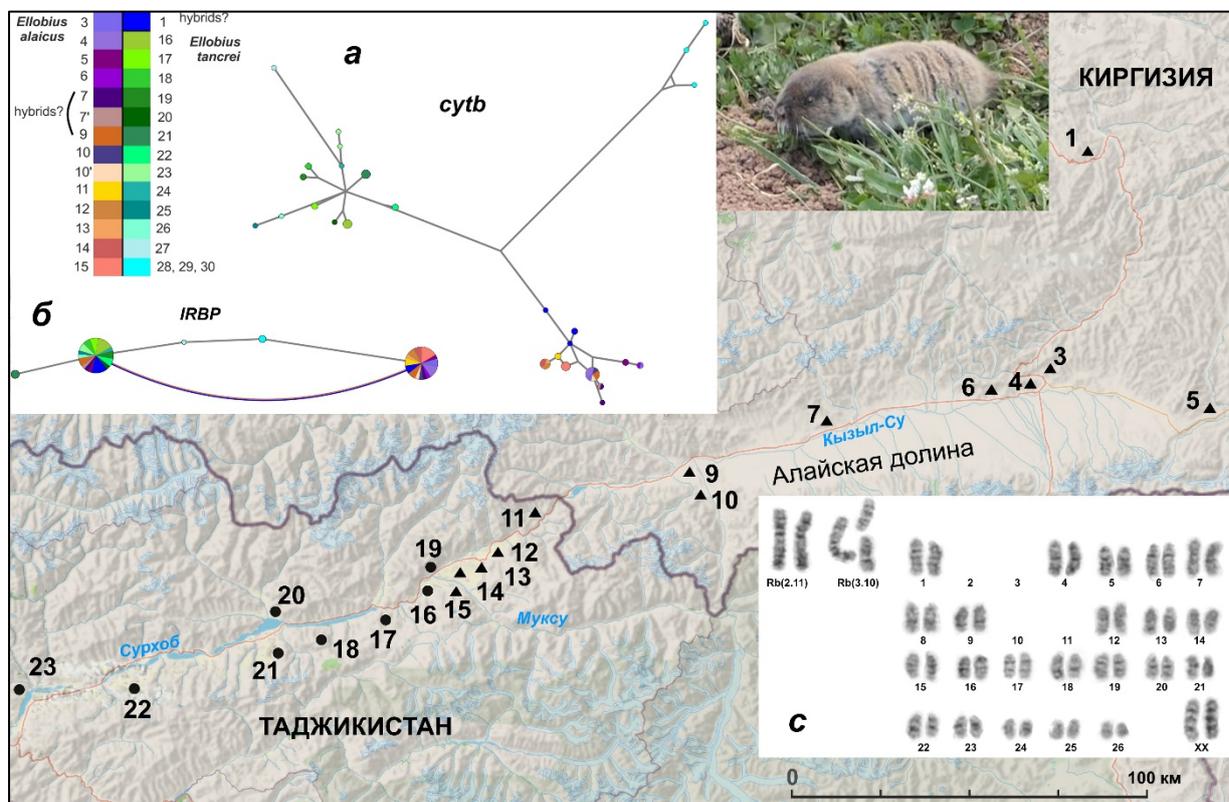


Рисунок 2. Присутствие МСК нарушает миогенную дифференцировку. А- индекс слияния (FI) миобластов контроля и FSHD, совместно культивируемых с МСК в различных соотношениях; В- процент миогенин-положительных ядер в совместных культурах миобласты-МСК через 48 часов и 72 часа после индукции дифференцировки (* p < 0, 05, n ≥ 9).

Публикации:

1. **Kiseleva E, Serbina O, Karpukhina A, Mouly V, Vassetzky YS.** Interaction between mesenchymal stem cells and myoblasts in the context of facioscapulohumeral muscular dystrophy contributes to the disease phenotype. *J Cell Physiol.* 2022;237(8):3328-3337. doi: 10.1002/jcp.30789. **Q1**
2. **Сербина О.О., Киселева Е.В., Васецкий Е.С.** (2022) Мультипотентные стромальные клетки (МСК) тормозят дифференцировку миобластов при моделировании ЛЛПМД in vitro. *Гены и клетки*, Т. XVII, №3, С. 207. **Q4**

Географическая мозаика генетической изменчивости у слепушонок *Ellobius alaicus* как следствие фрагментации среды обитания и гибридизации.



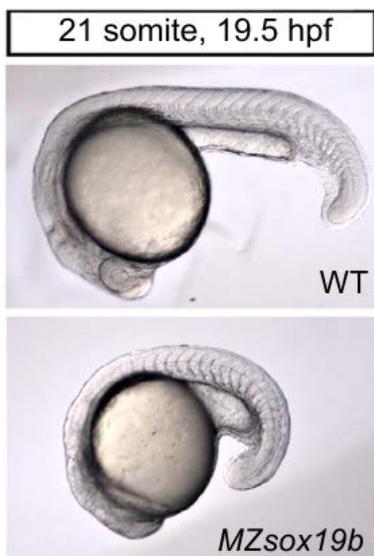
Формирование видовых барьеров у видов-двойников – сложный процесс, в котором ведущая роль может принадлежать различным генетическим механизмам. На основе изучения маркерных последовательностей митохондриальной (*cytb*, ген *cytochrome b*) и ядерной ДНК (*XIST*, X-inactive specific transcript, и *IRBP*, interphotoreceptor retinoid-binding protein), а также структуры кариотипа, нами была показана сложнейшая географическая мозаика генетической изменчивости, которая отражает несогласованность временных изменений отдельных признаков и чрезвычайно высокую скорость хромосомной эволюции видов-двойников слепушонок *E. alaicus* и *E. tancrei* в Памиро-Алае и Алайской долине. Такую "временную развертку" эволюционного процесса редко удается наблюдать для природных объектов.

Рис. 1. Регион исследований и данные по генетической изменчивости: *a*, *b* - сети гаплотипов, сгенерированные HarlowebMaker для генов *cytb* (*a*) и *IRBP* (*b*); *c* – кариотип алайской слепушонки *E. alaicus*, гетерозиготной по робертсоновской транслокации.

Tambovtseva V.¹ Bakloushinskaya I.¹ Matveevsky S. Bogdanov A.¹ Geographic mosaic of extensive genetic variations in subterranean mole voles *Ellobius alaicus* as a consequence of habitat fragmentation and hybridization//Life. 2022. Vol. 12. 728. <https://doi.org/10.3390/life12050728> Q2

Факторы плюрипотентности определяют репертуар экспрессии генов при активации зиготического генома.

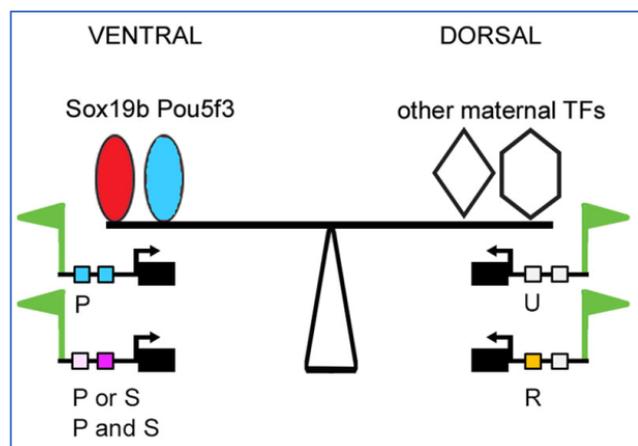
Запуск экспрессии генов при активации зиготического генома (ZGA) происходит в результате многоступенчатой регуляторной программы, включающей быструю последовательность изменений в доступности хроматина, модификации гистонов и транскрипции. В данном исследовании изучена роль Pou5f3 и Sox19b в формировании доступности хроматина, транскрипцию и процессы развития эмбриона *Danio rerio*. Показано, что Sox19b и Pou5f3 участвуют в формировании доступа к хроматину на стадии бластулы и действуют в основном независимо друг от друга. Полученные результаты свидетельствуют о том, что становление транскрипционной компетентности в начале ZGA является региональным. ZGA инициируется Pou5f3 и Sox19b на вентральной стороне эмбриона и, независимо от Pou5f3 и Sox19b, - на дорсальной стороне. Более того, Pou5f3 и Sox19b контролируют очередность запуска транскрипции для зиготических генов не только путем активации ранних генов, но и путем непрямого блокирования генов, запускающих более поздние программы развития. Pou5f3 и Sox19b регулируют доступность хроматина в большей степени для энхансеров, чем для промоторов генов. Одновременная потеря Pou5f3 и Sox19b приводит к преждевременной экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию органогенеза и дифференцировки.



Полученные результаты свидетельствуют о том, что становление транскрипционной компетентности в начале ZGA является региональным. ZGA инициируется Pou5f3 и Sox19b на вентральной стороне эмбриона и, независимо от Pou5f3 и Sox19b, - на дорсальной стороне. Более того, Pou5f3 и Sox19b контролируют очередность запуска транскрипции для зиготических генов не только путем активации ранних генов, но и путем непрямого блокирования генов, запускающих более поздние программы развития. Pou5f3 и Sox19b регулируют доступность хроматина в большей степени для энхансеров, чем для промоторов генов. Одновременная потеря Pou5f3 и Sox19b приводит к преждевременной экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию органогенеза и дифференцировки.

Рис. 1. Нарушения развития мутантов по гену *Sox19b*.

Рис. 2. Модель дорсо-вентрального баланса в ZGA: Pou5f3 и Sox19b праймируют вентральные и эктодермальные гены для активации, активируя Pou5f3-зависимые, козависимые и дублирующие энхансеры ("P", "P и S", "P или S").



Gao M., Veil M., Rosenblatt M., Riesle A.J., Gebhard A., Hass H., Buryanova L., Yampolsky L.Y., Grüning B., Ulianov S.V., Timmer J., **Onichtchouk D.**³ Pluripotency factors determine gene expression repertoire at zygotic genome activation//Nature Communications. 2022. Vol. 13(1). P. 788. [DOI: 10.1038/s41467-022-28434-1](https://doi.org/10.1038/s41467-022-28434-1). – Q1.

Лаборатория проблем регенерации

50 Биология развития и эволюция живых систем

Тема № 3. Механизмы регуляции раннего онтогенеза: гаметогенез, оплодотворение и раннее развитие животных.

Раздел № 2. Медиаторные механизмы регуляции гаметогенеза и раннего эмбриогенеза.

Фолликулярные клетки формируют функциональный барьер, изолирующий созревающий ооцит от материнского серотонина

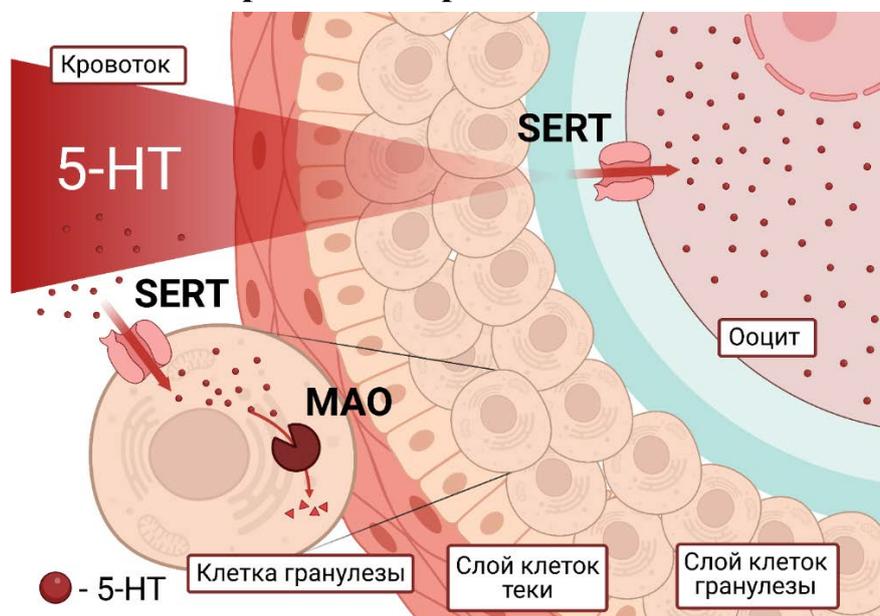


Рисунок 1. На пути между циркулирующим в кровотоке серотонином (5-НТ) и ооцитом лежит слой клеток гранулезы, которые способны захватывать серотонин (SERT) и активно его метаболизируют (MAO). Это формирует функциональный барьер, который изолирует созревающий ооцит в растущем овариальном фолликуле от материнского серотонина.

Серотонин, циркулирующий в кровотоке, способен накапливаться в ооцитах и может оказывать влияние на процесс их созревания. Активность SERT в ооцитах млекопитающих показана *in vitro*, однако *in vivo* выраженного накопления серотонина в созревающих ооцитах в норме не наблюдается. Оогенез происходит в окружении фолликулярных клеток, которые чувствительны к серотонину и тоже экспрессируют SERT. Мы предположили, что клетки гранулезы могут влиять на процесс накопления серотонина в растущем овариальном фолликуле мыши.

В ходе работы выявлено, что клетки гранулезы способны захватывать серотонин с помощью SERT и активно его метаболизируют посредством моноаминоксидаз (Рис. 1). Этот механизм может лежать в основе функционального барьера, который изолирует созревающий ооцит от циркулирующего серотонина. Также показано, что накопление серотонина изолированными ооцитами происходит при гораздо меньшей его концентрации в среде, чем интактными ооцитами в составе фолликула. Таким образом, клетки гранулезы действительно препятствуют накоплению серотонина ооцитами и формируют в растущем овариальном фолликуле функциональный барьер для этого трансммиттера.

Alyoshina N.M., Tkachenko M.D., Malchenko L.A., Shmukler Y.B., Nikishin D.A. Uptake and Metabolization of Serotonin by Granulosa Cells Form a Functional Barrier in the Mouse Ovary // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, № 23. P. 14828. DOI: [10.3390/ijms232314828](https://doi.org/10.3390/ijms232314828) Published: 27 November 2022 – Q1.

Автор: к.б.н. Коршунова Т.А.

Представлена новая модель общего предка билатерально-симметричных животных - седентарно-пелагическая модель, которая предлагает малоподвижного, несегментированного предка на взрослой стадии развития и пелагического на личиночной стадии.

Происхождение билатерий является одним из фундаментальных вопросов биологии. Современные модели общего предка билатерий (LCBA) предполагают, что он напоминал либо микроскопическую, несегментированную подвижную взрослую особь, либо был подвижным сегментированным организмом. Накопившиеся онтогенетические, палеонтологические и молекулярно-филогенетические данные выявляют фундаментальные противоречия таких моделей и поддерживают седентарно-пелагическую модель LCBA, а именно: данные в поддержку седентарных на взрослой стадии губок, как сестринским всем другим Metazoa; сходство молекулярных путей в онтогенезе, как у взрослых особей, так и у личинок сидячих губок, книдарий и билатерий; сестринские отношения книдарий и билатерий, включая уникальное наличие кластера настоящих Нох-генов, эволюционное формирование которого не связано напрямую с подвижной организацией билатерий; присутствие в раннем кембрии сидячих и обитающих в трубках представителей основных групп билатерий; отсутствие определенной таксономической принадлежности эдиакарских таксонов, реконструированных, как подвижные, к какому-либо типу настоящих Bilateria; сходство морфологии трубок (и явное присутствие протоконхоподобной апикальной структуры эдиакарских седентарных Cloudinidae) с раковинами раннекембрийских и более поздних настоящих билатерий, таких как полуседентарные хиолиты и подвижные моллюски; современные данные, которые предоставляют все больше свидетельств существования сложных предков билатерий, несмотря на продолжающиеся противоречия на уровне молекулярной филогенетики.

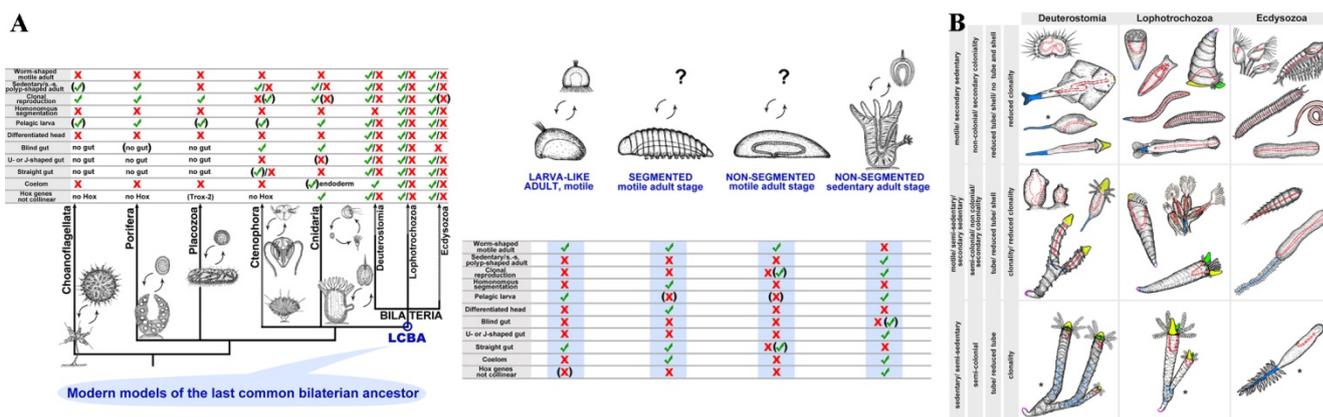


Рис. 1. А. Сравнение моделей предка билатерально-симметричных животных. В. Реконструкции взрослых состояний седентарных, полуседентарных и подвижных животных базальных групп с хорошо выраженной клональной репродукцией, а также групп с редукцией клонального размножения в основных линиях Deuterostomia, Lophotrochozoa и Ecdysozoa.

Martynov A.V., Korshunova T.A. Renewed perspectives on the sedentary-pelagic last common bilaterian ancestor//Contributions to Zoology. 2022. Vol. 91, Is. 4-5, P. 285–352.

DOI: 10.1163/18759866-bja10034 – Q1.

Лаборатория эволюции морфогенеза

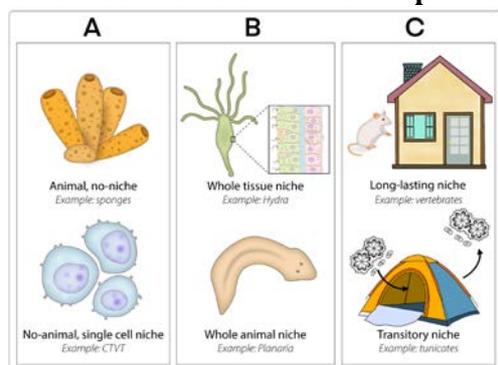
50 Биология развития и эволюция живых систем

Автор: д.б.н. Ересковский А.В. «Формулировка парадигмы «ниши стволовых клеток» через призму немодельных водных беспозвоночных»

Соматические стволовые клетки ССК располагаются в компартаментах, называемых нишами стволовых клеток (НСК), со специфическим микроокружением, которое выполняет важные регуляторные функции в выживании и пролиферации ССК. НСК характеризуется специфическими морфологическими свойствами, адгезивными взаимодействиями, модификациями клеточного цикла и межклеточными сигналами, которые коллективно контролируют статусы ССК. Единой концепции НСК в настоящее время не существует. Имеющийся пробел в знаниях о клеточном, молекулярном и системном уровнях НСК у большинства групп животных побудил предположить, что свойства, связанные с НСК, основаны исключительно на косвенных доказательствах. Молекулярные взаимоотношения внутри НСК были охарактеризованы лишь в единичных случаях и в основном на позвоночных животных.

Была пересмотрена концепция НСК, основанная на сравнительном анализе немодельных водных беспозвоночных, классических моделей биологии развития и позвоночных животных и сформулирована новая парадигма «ниши соматических стволовых клеток» через призму немодельных водных беспозвоночных. В работе основными объектами анализа окружения ССК послужили представители типов Cnidaria, Platyhelminthes, Acoelomorpha, Tunicata. У них с разной степенью подробности описаны определенные области тела, где ССК поддерживаются и активируются во время регенерации, почкования и гомеостаза. Показано, что о цитоархитектуре этих предполагаемых НСК, природе сигнальных путей внутри резидентных ССК или даже существовании регуляторных сигналов известно очень мало. В этих случаях термин «ниша стволовых клеток» часто используется вольно без подтверждающих доказательств.

Предложено три типа организации ниши стволовых клеток: А, В, С (рис. 1). Для них выделено 12 свойств. Поскольку архитектуры и конструкции НСК являются результатом естественного отбора, то в реальности возможны различные комбинации и взаимопереходы различных свойств того или иного типа выделенной авторами ниши. **Архитектура А** (отсутствие очевидной ниши) применяется к животным, у которых нет структурированных ниш. Такие животные имеют либо высокопластичный репертуар ССК, либо каждая стволовая клетка создает свою интимную неструктурированную среду вместо оформленной ниши. **Архитектура В** применяется к животным, которые демонстрируют характерные группы ССК, распределенные по всему телу, и не проявляют региональной экспрессии генов. Животные, имеющие ниши В, либо содержат отдельный орган-тканевый НСК, либо все животное является нишей. **Архитектура С** имеется у тех животных, которые обладают



пространственно ограниченными нишами ССК (млекопитающие и насекомые). Таким образом показано, что НСК у многоклеточных животных характеризуются гораздо большим разнообразием структур и свойств, чем представлялось на основе исследования лишь модельных организмов.

Рис. 1. Концептуальная схема, представляющая три различные архитектуры ниши стволовых клеток у многоклеточных животных. А, В и С относятся к трем структурно определенным состояниям для описания постепенно усложняющейся архитектуры

ниш и родственных им мест в теле животного.

Martinez P, Ballarin L, **Ereskovsky, A.V.**, Gazave E, Hobmayer B, Manni L, Rottinger E, Sprecher SG, Tiozzo S, Varela-Coelho A, and Rinkevich B. 2022. Articulating the “stem cell niche” paradigm through the lens of non-model aquatic Invertebrates. BMC Biology. 20:23. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01230-5> Q1, IF = 7,364

Остеосаркома - наиболее распространенная злокачественная опухоль кости с быстрым прогрессирующим ростом, ранним отдаленным метастазированием и частыми рецидивами после оперативного лечения. Остеосаркома характеризуется изменениями соотношения и экспрессии различных изоформ цитохрома P450 (CYP), которые могут влиять на эффективность противоопухолевой терапии. Индукция экспрессии генов *CYP1* зависит от лиганд-зависимой функции арил-гидрокарбонового рецептора (AHR). Мы исследовали сигнальный путь AHR/CYP1 в четырех клеточных линиях остеосаркомы (MG63, HOS, SAOS2 и U2OS), индуцированный известными лигандами AHR: индирубином, индол-3-карбинолом и бета-нафтофлавоном. С помощью qPCR и Вестерн-блоттинга мы изучили корреляцию между ответной реакцией *CYP1* на обработку лигандами AHR и уровнями экспрессии мРНК и белка AHR и ядерного транслокатора AHR (ARNT). Это первое исследование, оценивающее активность сигнального пути AHR/CYP1 в клеточных линиях остеосаркомы. Мы показали, что сигнальный путь AHR/CYP сохранил свои функции только в клетках MG63 и HOS и был нарушен в клетках SAOS2 и U2OS (Рис. 1). Наши данные следует учитывать при оценке новых терапевтических противоопухолевых препаратов и при составлении новых стратегий терапии остеосарком.

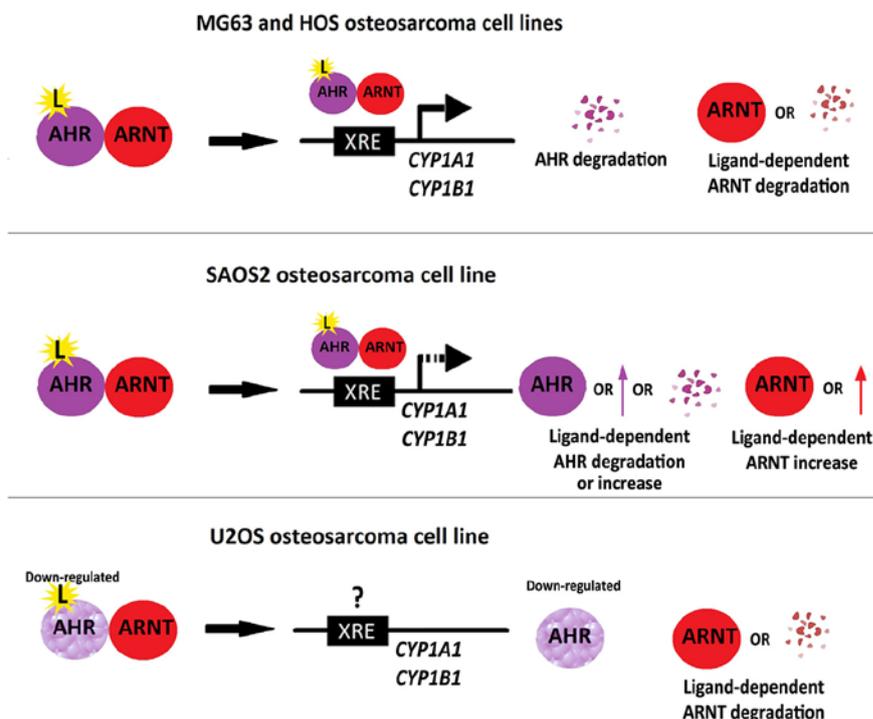


Рис. 1. Модели, описывающие сигнальный путь AHR/CYP1 и его нарушения, в клетках остеосарком. В клетках MG63 и HOS индуцируется лиганд-зависимая (L) экспрессия генов *CYP1A1* и *CYP1B1*, сопровождаемая деградацией AHR и ARNT. В клетках SAOS2 лиганд-зависимая индукция *CYP1A1* и *CYP1B1* идёт слабо, деградации белков AHR и ARNT часто не происходит. В клетках U2OS, где отсутствует белок AHR, отсутствует и лиганд-зависимая индукция генов *CYP1A1* и *CYP1B1*.

Vorontsova J.E., Akishina A.A., Cherezov R.O., Simonova O.B. A new insight into the Aryl Hydrocarbon Receptor/Cytochrome 450 signaling pathway in MG63, HOS, SAOS2, and U2OS cell lines // Biochimie. – 2022. - DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.10.018> **Impact Factor (2022): 4.372 Q2**

Авторы: Шкиль Ф.Н., Капитанова Д.В.

Внутривидовая и межвидовая изменчивость онтогенетической последовательности событий в ходе формирования костного черепа карповых рыб *Barbus sensu lato*

Анализ изменчивости последовательности онтогенетических событий позволяет получить информацию, связывающую онтогенез и филогенез изучаемых объектов. Нами был проведен сравнительный анализ изменчивости последовательности онтогенетических событий в ходе формирования костного черепа полифилетичной и экологически разнообразной группы карповых рыб *Barbus sensu lato* (Cypriniformes, Teleostei). Была проведена оценка внутри- и межвидовой изменчивости последовательности; проведено сравнение последовательности онтогенетических событий, как у близкородственных «молодых» симпатрических, так и у филогенетически удаленных видов; реконструирована «предковая» последовательность; и проведена оценка эволюционной значимости перестроек в онтогенетической последовательности или гетерохронных сдвигов последовательности. В результате удалось показать, что гетерохронии в последовательности событий в формировании костного черепа возникают на внутри- и межвидовом уровне. Наиболее изменчивыми являются отделы черепа, относящиеся к спланхнокраниуму. Основной причиной возникновения гетерохроний являются внутренние, по всей видимости, генетические или эпигенетические факторы. Большинство гетерохроний не имеют ярко выраженного адаптивного потенциала и являются нейтральными с точки зрения естественного отбора. По мере увеличения филогенетической дистанции между сравниваемыми объектами происходит рост числа несовпадений в их онтогенетических последовательностях. Это позволяет использовать сравнительный анализ онтогенетических последовательностей в филогенетических реконструкциях, что особенно ценно при работе с объектами, сравнение генетического материала которых невозможно.

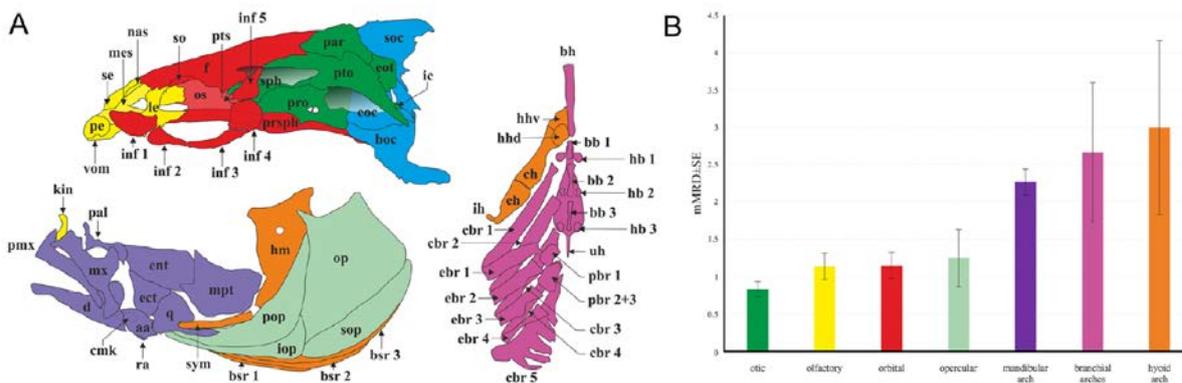


Рис. 1. Изменчивость последовательности онтогенетических событий в ходе формирования различных отделов черепа. А – схематичное представление черепа карповой рыбы *Barbus sensu lato*. Отделы черепа выделены разными цветами. В – уровень изменчивости различных отделов черепа (цвета соответствуют цветам отделов на рисунке А).

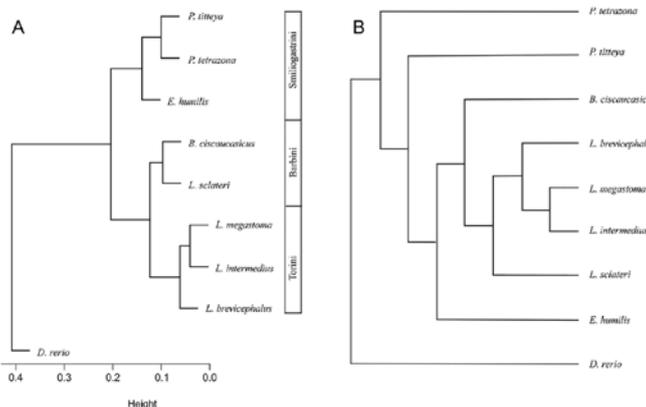


Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа онтогенетических последовательностей карповых рыб *Barbus sensu lato* с использованием коэффициента корреляции Кеделла (А) и парсимоний, PAUP phylogenetic analysis using parsimony (В).

Лаборатория проблем регенерации.

50 Биология развития и эволюция живых систем

ГЗ № 0108-2018-0005 «Клеточные и молекулярные механизмы развития и регенерации тканей и органов у низших и высших позвоночных. Поиск способов регуляции восстановительных процессов».

Раздел 3. Молекулярные механизмы изменений регенерационных процессов у позвоночных животных под влиянием факторов внешней среды.

Автор: д.бн Григорян Э.Н.

Самоорганизация сетчатки в ходе развития глаза, регенерации *in vivo* и формировании органоидов сетчатки *in vitro*

Важным результатом работы в 2022 году явился детальный анализ и выявление закономерностей феномена самоорганизации сетчатки глаза позвоночных и человека. Работа помогает ответить на ключевой вопрос биологии развития - каким образом сложно организованный орган, являющийся координированной системой для выполнения сложных функций, складывается из просто организованного эмбрионального зачатка. Явление самоорганизации чрезвычайно сложно в силу разнообразия его механизмов, генетической, физической и химической основ. Сложность процесса является причиной недостаточного его исследования и понимания. В работе явление описано в развитии сетчатки позвоночных *in vivo* (рисунок) и при ее регенерации у взрослых амфибий *in situ*. *In vitro* процесс самоорганизации рассмотрен на примерах гистотипических 3D структур, получаемых из ретинальных клеток предшественников птиц, а также при формировании органоидов сетчатки из плюрипотентных стволовых клеток мыши и человека. На этих примерах механизмы самоорганизации сетчатки рассмотрены в пространственно-временном контексте. На клеточном уровне учтены: компетенция и дифференцировка, пролиферация, миграция и апоптоз клеток, регуляторная роль макроглии и ретинального пигментного эпителия. На физическом уровне учтены изменения механических свойств клеточных пластов, механических сил, работающих на уровне отдельных клеток, и механотрансдукция. На молекулярном - молекулярно-генетические факторы регуляции экспрессии генов: факторы транскрипции и сигнальные молекулы, эпигенетические механизмы, факторы межклеточной коммуникации. В настоящее время феномен самоорганизации лег в основу получения органоидов сетчатки – очень активно изучаемой и перспективной модели. Этому направлению посвящен отдельный раздел работы, где обозначены цели применения 3D органоидов сетчатки и методы их достижения.

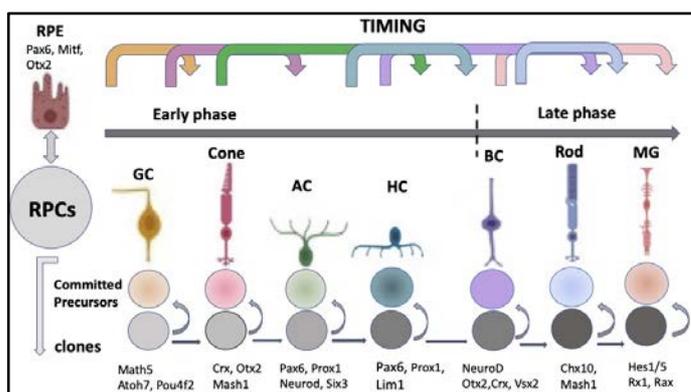


Рисунок. Схематическое изображение классической модели смены компетенций клеток эмбриональной сетчатки. Модель предусматривает прохождение ретинальных прогениторов через определенные стадии компетенции для последовательной генерации специфических клеточных типов сетчатки. RPCs – ретинальные прогениторы; RPE – ретинальный пигментный эпителий; GC – ганглиозные клетки; AC – амакриновые клетки; HC – горизонтальные клетки; BC – биполяры; MG – клетки Мюллера. В процессе различают ранние и поздние стадии. Схема отражает общую закономерность, однако условную, поскольку стадии перекрывают друг друга, а процесс обнаруживает видоспецифические отличия.

Grigoryan E.N. «Self-Organization of the Retina during Eye Development, Retinal Regeneration In Vivo, and in Retinal 3D Organoids // Biomedicines. 2022. 10:1458. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061458>. Q2.

Аденокарцинома поджелудочной железы: микроокружение опухоли и проблемы в развитии новых терапевтических стратегий.

Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (англ. pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) является наиболее распространенной и трудно поддающейся лечению формой рака. В более чем 90% опухолей PDAC наблюдаются мутации гена *KRAS*, реципрокная передача сигналов которого показана между опухолевыми и стромальными клетками *in vitro*. Несмотря на выявление большого числа aberrантных мутаций при PDAC, попытки создания эффективных терапевтических средств на основе выявленных генетических или эпигенетических вариаций не привели к успеху. Роль микроокружения опухоли (англ. tumor microenvironment, TME) в опухолевой прогрессии в настоящее время является популярной темой. PDAC и другие солидные виды рака помимо опухолевых клеток содержат нормальные клетки соединительной ткани, называемые стромальными клетками или опухоль-ассоциированными фибробластами (CAFs), которые ответственны за избыточную продукцию внеклеточного матрикса (ВКМ). CAFs являются основными компонентами стромы опухоли, играя важную роль в пролиферации, инвазивности и метастазировании рака. Предшественниками активированных фибробластов или CAFs считаются стромальные звездчатые клетки поджелудочной железы (англ. pancreatic stellate cell, PSCs), которые представляют собой увеличивающуюся популяцию клеток, размножающихся *in situ* или рекрутируемых в опухоль. CAFs – это неоднородная популяция стромальных фибробластов с различным молекулярным профилем, изменяемым во время туморогенеза. В строме одной опухоли могут сосуществовать как иммуносупрессивные, так и иммуноподдерживающие субпопуляции CAFs. На основании гено- и фенотипических различий стромы предпринимаются попытки классификации PDAC и прогнозирования течения заболевания. Однако, механизмы, лежащие в основе влияния CAFs и ВКМ на прогрессирование рака, до сих пор неясны. Последние научные исследования, направленные на изучение компонентов стромы и блокирования различных сигнальных путей, внесли некоторый оптимизм в эту область (рис.1). Ориентация на CAFs становится одной из самых привлекательных стратегий противоопухолевой терапии. Попытки нацелиться или перепрограммировать определенные подтипы CAFs открывают большие возможности для лечения рака. Кроме того, новая информация о роли TME приведет к разработке таргетных методов лечения или комбинаций с современной химиотерапией при PDAC, что может принести большую клиническую пользу больным раком.

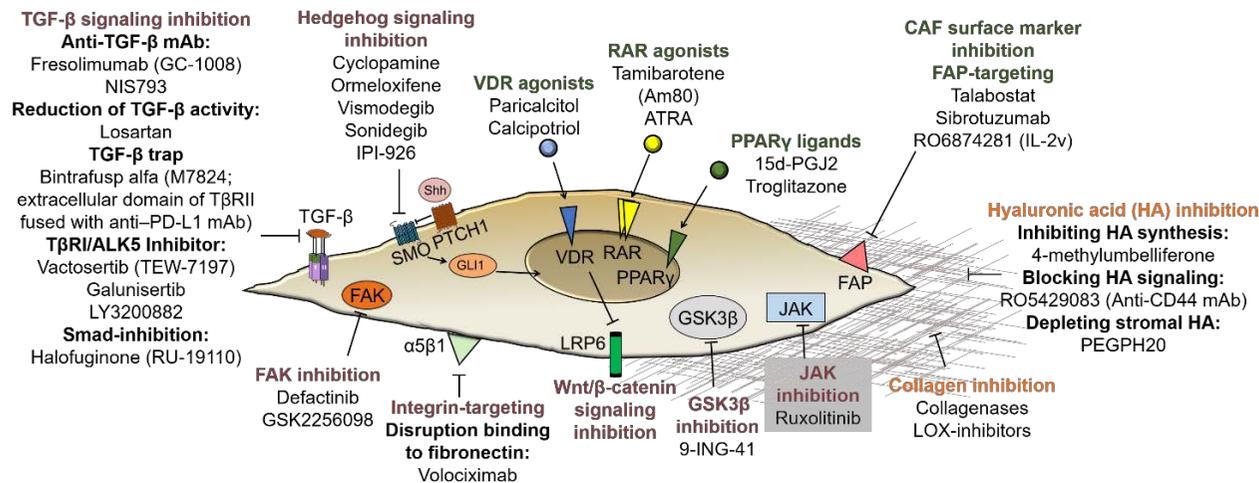


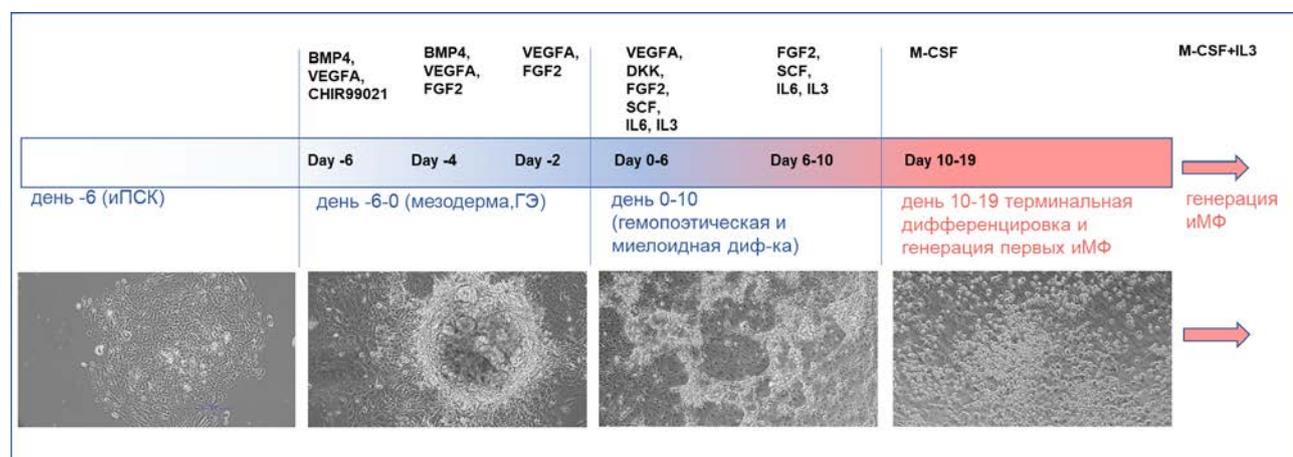
Рисунок 1. Стратегии нацеливания на опухоль-ассоциированные фибробласты (CAF) и внеклеточный матрикс (ВКМ) при аденокарциноме поджелудочной железы: (1) истощение/делеция CAFs или нормализация CAFs от проонкогенного состояния до покоящегося или опухолесупрессивного состояния (выделено зеленым цветом), (2) профибротические сигнальные пути в CAFs – инактивация CAFs и индукция ремоделирования ВКМ (выделено коричневым цветом), (3) делеция непосредственно ВКМ (выделено оранжевым цветом).

Получение геномодифицированных макрофагов человека

Генетическая модификация макрофагов является, с одной стороны актуальной и важной, а с другой стороны – довольно трудной задачей. Сниженная способность к пролиферации в культуре, значительная вариабельность и зависимость от условий получения, а также наличие PRR-рецепторов, препятствующих введению в макрофаги чужеродной ДНК, усложняют подходы к генетическому редактированию этих клеток. В последние годы получил распространение метод генерации макрофагов из геномодифицированных индуцированных плюрипотентных клеток (мод-иПСК).

В нашей лаборатории была проведена работа по созданию *in vitro* платформы генерации, анализа и генетической модификации макрофагов человека. Платформа включает три этапа – (1) создание генетической конструкции, содержащей таргетный ген; (2) введение конструкции в иПСК человека с помощью CRISPR-Cas9 системы и электропорации – получение мод-иПСК; (3) генерация и анализ геномодифицированных макрофагов человека (мод-иМФ). Впервые были получены макрофаги с доксициклин-управляемой оверэкспрессией *TNFAIP3*. Экспрессия оставалась на одном и том же уровне на протяжении всего периода генерации моноцитов. Мы показали, что такаястройка таргетного гена не влияет на основные свойства макрофагов – фенотип, способность к фагоцитозу, ответ на стимулы, что очень важно с практической точки зрения из-за высокой пластичности макрофагов.

Рис. 1. Генерация мод-иМФ из мод-иПСК человека по модифицированному нами протоколу



Разработанная платформа уже сейчас может применяться для исследования функционирования различных генов в макрофагах и для моделирования различных заболеваний, а в дальнейшем открывает новые возможности для получения и генетической коррекции макрофагов от доноров с генетическими нарушениями.

По результатам работы были опубликованы тезисы в сборнике «Коллекция культур клеток человека и животных: современные вызовы и сетевые решения (Шевелева и др. «Получение генетически модифицированных иПСК с повышенной экспрессией гена *TNFAIP3*», г. Санкт-Петербург, 22-23 июня 2022 г., doi:10.18720/SPBPU/2/id22-153), сделан постерный доклад на V Национальном конгрессе по регенеративной медицине 23-25 ноября 2022 г. (Шевелева О.Н. и др. «Получение и характеристика макрофагов человека с индуцибельной экспрессией гена *TNFAIP3*», «Гены и клетки», 2022, том XVII, №3, стр. 261, ISSN 2313-1829), статья готовится к публикации.